

Министерство
образования и науки
Российской Федерации

Вестник МИТХТ

2/2011

апрель

Научно-технический
журнал

Издается с февраля 2006 г.
Выходит один раз
в два месяца

Учредитель
МИТХТ им. М.В. Ломоносова

Главный редактор:
проф. Тимофеев В.С.
Зам. главного редактора:
проф. Фролова А.К.
проф. Фомичев В.В.

Редакционная коллегия:
доц. Биглов Р.Р.
проф. Дробот Д.В.
проф. Корнюшко В.Ф.
акад. РАН Кузнецов Н.Т.
акад. РАН Мирошников А.И.
проф. Мирошников Ю.П.
чл.- корр. РАН Озерин А.Н.
проф. Серафимов Л.А.
проф. Сухорукова С.М.
проф. Тверской В.А.
акад. РАН Цивадзе А.Ю.
акад. РАМН Швеи В.И.
доц. Юловская В.Д.

ISSN 1819-1487

СОДЕРЖАНИЕ

25 ЛЕТ КАФЕДРЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

Поздравление ректората МИТХТ им. М.В. Ломоносова	3
Академику РАМН В.И. Швецу – 75 лет	4
<i>Швец В.И.</i> 25 лет учебной и научной деятельности кафедры биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова	5
<i>Пиеничникова А.Б., Швеи В.И.</i> Подготовка кадров на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова	8
<i>Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Демин О.В., Складнев Д.А., Тюрин С.А., Швеи В.И.</i> Гибридные аналоги ретиноидов как инструменты для исследований в области нанобиофотоники	15
<i>Лепарская Н.Л., Сорокоумова Г.М., Сычева Ю.В., Хорошилова-Маслова И.П., Каплун А.П., Кереев И.И., Гундорова Р.А., Нероев В.В., Швеи В.И.</i> Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии	37
<i>Пиеничникова А.Б., Гаврилова Е.С., Швеи В.И.</i> Влияние физико-химических свойств клеточной поверхности грамотрицательных бактерий на резистентность к стрептомицину	43
<i>Рафиева Л.М., Сафина Д.Р., Демидюк И.В., Костров С.В.</i> Получение рекомбинантных нейротрофинов человека для биомедицинских исследований	51
<i>Степанов А.Е., Швеи В.И.</i> Оптическое расщепление рацемических производных мио-инозита на энантиомеры в синтезе инозитсодержащих фосфолипидов природного строения	58
<i>Степанов А.Е., Люттик А.И., Швеи В.И.</i> Производные мио-инозита нелипидной природы – получение и применение для биомедицинских целей	62
<i>Чудинов М.В., Матвеев А.В., Журило Н.И., Простакова В.В., Швеи В.И.</i> Новые подходы к синтезу низкомолекулярных производных 1,2,4-триазола	66
<i>Шастина Н.С., Баранова Е.О., Дьякова Л.Н., Лонишаков Д.В., Швеи В.И.</i> Липидная стратегия повышения биодоступности нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ	71
<i>Ширяева М.В., Кириллова Ю.Г., Есипова О.В., Еремин С.В., Лукьянова Т.А., Швеи В.И.</i> Твердофазный синтез отрицательно заряженных олигомеров полиамидных миметиков нуклеиновых кислот	81

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

<i>Берлинер Л.Б., Гвелесиани Л.А.</i> Численное исследование влияния свободной конвекции для процесса направленной кристаллизации CdZnTe	86
<i>Гордеева Ю.Л., Ивашкин Ю.А., Гордеев Л.С.</i> Моделирование процесса непрерывной ферментации с нелинейной кинетикой роста	94
<i>Серафимов Л.А., Фролова А.В., Илларионов В.В.</i> Классификация диаграмм состояния тройных расслаивающихся систем	98
<i>Серафимов Л.А., Фролова А.В., Медведев Д.В., Семин Г.А.</i> Синтез фазовых портретов диаграмм четырехкомпонентных систем. Определение знака индекса особой точки, соответствующей четырехкомпонентному азеотропу	104
<i>Солнцев С.А., Нагорнов К.О., Капустин В.И.</i> Поверхностная ионизация органических соединений азота, серы, фосфора и мышьяка	112
<i>Тархов К.Ю., Серафимов Л.А.</i> Свойства матрицы относительных летучестей многокомпонентных азеотропных и азеотропных смесей	119
<i>Тархов К.Ю., Серафимов Л.А., Андреева А.М.</i> Изомногообразия минимального флегмового числа для случая ректификации смеси хлороформ–бензол–толуол в режиме первого класса фракционирования	126

Review MITHT

2/2011

Редакция:
Агаянц И.М.
Наумова Ю.А.
Семерня Л.Г.
Середина Г.Д.

Адрес редакции:
119571, г. Москва,
пр. Вернадского, 86,
к. Л-119
телефон: (495) 936-82-88
е-mail: vestnik@mitht.ru

Подписано в печать
14.04.2011 г. Формат 60х90/8.
Бумага офсетная.
Гарнитура Times.
Печать офсетная.
Уч. изд. листов 4,4.
Заказ № 105.
Тираж 500 экз.

Отпечатано с оригинал-макета в
«ГЕЛИОПРИНТ»

119602, Москва, Ак. Анохина, 38, к. 1

CONTENTS

25TH ANNIVERSARY OF THE DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY AND BIONANOTECHNOLOGY

Congratulation by the administration of M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology	3
Academician of RAMS V.I. Shvets is 75 years old	4
<i>Shvets V.I.</i> 25 years of training and research activities of the department of biotechnology and bionanotechnology of M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology	5
<i>Pshenichnikova A.B., Shvets V.I.</i> Training of personnels at the department of biotechnology and bionanotechnology of M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology	8
<i>Khodonov A.A., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Fomin M.A., Demina O.V., Skladnev D.A., Tyurin S.A., Shvets V.I.</i> Hybrid retinoid analogs as instruments for the nanobiophotonic researches	15
<i>Leparskaya N.L., Sorokoumova G.M., Sycheva Yu.V., Horoshilova-Maslova I.P., Kaplun A.P., Kereev I.I., Gundorova R.A., Neroev V.V., Shvets V.I.</i> Liposomes containing dexamethasone: preparation, characteristics and application in ophthalmology	37
<i>Pshenichnikova A.B., Gavrilova E.S., Shvets V.I.</i> Influence of physico-chemical properties of the gram-negative bacteria cell surface on the resistance to streptomycin	43
<i>Rafieva L.M., Safina D.R., Demidyuk I.V., Kostrov S.V.</i> Production of human recombinant neurotrophins for biomedical studies	51
<i>Stepanov A.E., Shvets V.I.</i> Optical resolution of racemic <i>myo</i> -inositol derivatives into enantiomers for the synthesis of inositol-containing phospholipids with natural structures	58
<i>Stepanov A.E., Lyutik A.I., Shvets V.I.</i> Nonlipid <i>myo</i> -inositol derivatives: preparation and biomedical applications	62
<i>Chudinov M.V., Matveev A.V., Zhurilo N.I., Prostakova V.V., Shvets V.I.</i> Novel approaches to the synthesis of low-molecular derivatives of 1,2,4-triazole	66
<i>Shastina N.S., Baranova E.O., Dyakova L.N., Lonshakov D.V., Shvets V.I.</i> Lipidic strategy for improving bioavailability of nucleoside HIV reverse transcriptase inhibitor	71
<i>Shiryaeva M.V., Kirillova Yu.G., Esipova O.V., Eremin S.V., Lukyanova T.A., Shvets V.I.</i> Solid-phase synthesis of negatively charged oligomeric polyamide mimetics of nucleic acids	81
THEORETICAL BASES OF CHEMICAL TECHNOLOGY	
<i>Berliner L.B., Gvelesiani L.A.</i> Numerical study of free convection effect for directional crystal growth of CdZnTe single-crystals	86
<i>Gordeeva J.L., Ivashkin J.A., Gordeev L.S.</i> Modeling of continuous fermentation with nonlinear growth rate	94
<i>Serafimov L.A., Frolkova A.V., Illarionov V.V.</i> Triple stratified systems equilibrium diagrams classification	98
<i>Serafimov L.A., Frolkova A.V., Medvedev D.V., Semin G.A.</i> Residue curve maps of 4-component systems. Poincare index determination for 4-component azeotrope	104
<i>Solntsev S.A., Nagornov K.O., Kapustin V.I.</i> Surface ionization of organic compounds on the basis of nitrogen, sulfur, phosphorus, and arsenic	112
<i>Tarkhov K.Yu., Serafimov L.A.</i> Properties of the matrix of relative volatilities of multicomponent zeotropic and azeotropic mixtures	119
<i>Tarkhov K.Yu., Serafimov L.A., Andreeva A.M.</i> The minimum reflux ratio manifolds for the case of chloroform–benzene–toluene mixture rectification in the mode of the first class fractionalization	126

ПОЗДРАВЛЕНИЕ
ректората МИТХТ им. М.В. Ломоносова
в связи с 25-летием
кафедры биотехнологии и бионанотехнологии

В этом году исполнилось 25 лет со дня образования кафедры биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ и 75 лет ее создателю и заведующему, академику Российской Академии медицинских наук Виталию Ивановичу Швецу.

Идея организации кафедры биотехнологии была сформулирована В.И. Швецом в 1985 году в связи с развитием биотехнологического направления на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ, где он в то время работал профессором. Вместе с В.И. Швецом большую роль в организации и становлении кафедры биотехнологии сыграл ряд преподавателей и сотрудников кафедры ХТТОС. Это – проф. Е.Н. Звонкова, проф. А.П. Каплун, проф. А.Е. Степанов, проф. И.А. Василенко, доц. Б.И. Мицнер, доц. А.С. Бушнев, с.н.с. А.И. Лютик, доц. Е.Н. Карнаухова и др. В настоящее время в работе кафедры активное участие принимают проф. А.А. Ходонов, проф. Е.И. Финкельштейн, доц. Г.М. Сорокумова, доц. Н.С. Шастина, доц. А.Б. Пшеничникова, доц. Ю.Г. Кириллова, доц. О.В. Есипова, доц. М.В. Чудинов, ст. преп. С.В. Еремин, асс. А.Ю. Лукин, асс. Д.А. Безруков, н.с. Д.И. Прохоров, н.с. А.В. Лаптев. В 2009 году кафедра была переименована в кафедру биотехнологии и бионанотехнологии в связи с модификацией учебного и научного процессов в ходе современного развития этого передового направления в области живых систем.

В настоящее время кафедра биотехнологии и бионанотехнологии, одна из ключевых и наиболее успешных кафедр МИТХТ, считается ведущим центром российской науки и высшего образования в области биотехнологии. Общеизвестны приоритетные научные и технологические работы кафедры в области получения природных соединений различных классов, создания на этой основе лекарственных и диагностических препаратов нового поколения, в том числе с помощью нанобиотехнологии, внедрение их в практическую медицину. Результаты научных, методических работ кафедры широко опубликованы в учебных пособиях, монографиях, обзорах, статьях, патентах, доложены на российских и международных конференциях и съездах. Специалисты названного направления относят кафедру к основным структурам по созданию многоуровневой системы биотехнологического образования. Для кафедры характерен высокий уровень подготовки выпускаемых специалистов, признаваемый в России и за рубежом.

Ректорат, все сотрудники, аспиранты и студенты МИТХТ поздравляют коллектив кафедры биотехнологии и бионанотехнологии со знаменательной датой и желают дальнейших успехов в развитии в МИТХТ биотехнологического направления в науке и подготовке кадров!

А.К. Фролова, В.С. Тимофеев

**Академику РАМН, заведующему кафедрой
биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ
ШВЕЦУ ВИТАЛИЮ ИВАНОВИЧУ – 75 лет**



19 марта 2011 года исполнилось 75 лет заведующему кафедрой биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Заслуженному деятелю науки РФ, лауреату Государственной премии СССР в области науки и техники, лауреату премии Правительства России в области образования, доктору химических наук, профессору, действительному члену Российской Академии медицинских наук Виталию Ивановичу Швецу.

Ученик выдающегося российского ученого и педагога в области химии и технологии лекарственных веществ и витаминов, Героя Социалистического труда, профессора Николая Алексеевича Преображенского В.И. Швец всю свою научную и педагогическую деятельность связал с МИТХТ им. М.В. Ломоносова. Он много сделал для развития образования и научных исследований в МИТХТ, где прошел путь от ассистента до профессора, декана ведущего факультета, заведующего кафедрой, проректора по учебной работе. Виталий Иванович пользуется всеобщим признанием и громадным авторитетом среди преподавателей, сотрудников, аспирантов и студентов.

Академик РАМН В.И. Швец – известный ученый в области разработки методов выделения, химического и биологического синтеза различных типов липидов, их комплексов с пептидами, нуклеотидами и другими биологически активными веществами.

В.И. Швец создал в 1985 году в МИТХТ кафедру биотехнологии – одну из первых в нашей стране (в 2009 г. в связи с изменением профиля учебной и научной деятельности переименованную в кафедру биотехнологии и бионанотехнологии), которую и возглавляет до сих пор. Кафедра активно функционировала все эти годы, прогрессивно развивая свою педагогическую и научную деятельность, став в последние годы ведущим научно-методическим биотехнологическим центром России.

Ректорат, все сотрудники, студенты и аспиранты МИТХТ сердечно поздравляют заведующего кафедрой биотехнологии и бионанотехнологии, академика РАМН Виталия Ивановича Швеца с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, счастья, дальнейших творческих успехов и плодотворной работы на благо МИТХТ!

25 ЛЕТ УЧЕБНОЙ И НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КАФЕДРЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ МИТХТ им. М.В. ЛОМОНОСОВА

В.И. Шве́ц, академик РАМН, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии

МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: biotechnology@mtu-net.ru

В статье представлены сведения об истории создания кафедры биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова, изложены данные об организации учебного процесса, методической работе при подготовке бакалавров, магистров, инженеров. Сообщена информация о достижениях кафедры в области послевузовского образования, аспирантуры, докторантуры, о месте кафедры в организации выпуска специалистов и планировании системы подготовки кадров, о научной и технологической работе в области биотехнологии и бионанотехнологии.

The article informs about the history of the creation of the department for biotechnology and bionanotechnology. Data on the educational process and methodical work in the preparation of bachelors, masters and engineers are presented. Information on the achievements of the department in the field of postgraduate education, doctoral studies, on the place of the department in organizing graduation, on the planning of training, on the scientific and technological work in the field of biotechnology and bionanotechnology is given.

Ключевые слова: биотехнология, бионанотехнология, биотехнологическое образование, научно-исследовательская работа, организации-партнеры.

Key words: bionanotechnology, biotechnological education, scientific research, partner organizations.

В декабре 2010 года исполнилось 25 лет со дня образования кафедры биотехнологии и бионанотехнологии. Несколько слов об истории этого события. Нашим патриархом является профессор Николай Алексеевич Преображенский, и уже более полувека назад его идеология как гениального ученого и педагога стала основой развития нашего направления, хотя понятия «биотехнология» в то время не существовало. Все мы, причем многие из которых по возрасту не знали Николая Алексеевича лично, всегда с гордостью будем считаться его учениками. После смерти Николая Алексеевича в 1968 г. верным продолжателем его идеологии и деловых традиций стала чл.-корр. РАН Рима Порфирьевна Евстигнеева, которая возглавила кафедру Н.А. Преображенского – кафедру химии и технологии тонких органических соединений (ХТТОС). Уже в то время, к концу 70-х годов прошлого столетия, развитие биоорганической химии, химии лекарственных веществ оказалось неразрывно связанным со становлением научных исследований и подготовки кадров в области биотехнологии, и наша историческая родина – кафедра ХТТОС – начала активно развивать эту идеологию в своей учебной и научной деятельности, что привело к идее создания новой кафедры – кафедры биотехнологии, основным направлением которой стала медицинская биотехнология.

В 2009 году в связи со значительной модификацией биотехнологии элементами нанотехнологии и созданием бионанотехнологического направления и отражением этих изменений в педагогической и научной деятельности кафедры она была переименована в кафедру биотехнологии и бионанотехнологии.

Хочется назвать тех людей, которые вместе со мной осваивали этот новый для того времени вид учебной и научной деятельности, получивший в 1985 году статус кафедры биотехнологии. Это, прежде всего, профессор Елена Николаевна Звонкова, а также другие преподаватели и сотрудники кафедры ХТТОС, с которыми мы создали новую кафедру и вот уже 25 лет работаем или работали вместе: проф. А.П. Каплун, проф. А.Е. Степанов, проф. И.А. Василенко, доц. Б.И. Мицнер, доц. А.С. Бушнев, доц. Е.Н. Карнаухова, ст. преп. О.В. Богомолов, к.х.н. А.И. Лютик, к.х.н. В.Н. Крылова и др. В последующие годы к ним присоединились проф. А.А. Ходонов, доц. Г.М. Сорокоумова, доц. Н.С. Шастина, доц. А.Б. Пшеничникова, доц. Ю.Г. Кириллова, доц. О.В. Есипова, доц. М.В. Чудинов, ст. преп. С.В. Еремин, асс. А.Ю. Лукин, асс. Д.А. Безруков, к.х.н. Д.И. Прохоров, к.х.н. А.В. Лаптев и др. В разные годы на кафедре работали и работают сейчас акад. РАН В.А. Ткачук, чл.-корр. РАН С.В. Костров, чл.-корр. РАН Е.С. Северин, чл.-корр. РАМН В.С. Репин, чл.-корр. РАМН С.Е. Северин (наш выпускник), проф. Д.Г. Победимский, проф. А.М. Юркевич, проф. Е.И. Финкельштейн, доц. И.В. Демидюк и др.

Кафедра активно функционировала все эти годы, прогрессивно развивая свою педагогическую и научную деятельность, став в последние годы ведущим научно-методическим биотехнологическим центром России, что отмечено премией Правительства РФ в области образования в 2007 г.

За прошедший период на кафедре и в других организациях в плане интеграции учебной и научной деятельности успешно

осуществлялась подготовка бакалавров, магистров, инженеров дневной и вечерней форм обучения, специалистов в рамках послевузовской подготовки, аспирантов, докторантов со специально созданным фундаментальным обучением. Следует отметить, что кафедра в составе МИТХТ одной из первых в России 15 лет назад разработала двухступенчатую систему подготовки (бакалавр–магистр, инженер) и реализовала ее на практике.

Юридически связи с научными организациями-партнерами оформлены много лет назад вхождением в состав официально поддержанного Минобрнауки РФ Научно-образовательного центра Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) и созданного в 2009 г. Научно-образовательного центра МИТХТ в области биотехнологии, в который входят, кроме кафедры, Опытное производство ИБХ РАН, Институт молекулярной генетики РАН (ИМГ РАН), Институт общей патологии и патофизиологии РАМН (ИОПП РАМН). Основой этих центров являются соответствующие базовые кафедры.

На кафедре ведется подготовка бакалавров по направлению «Химическая технология и биотехнология», магистров по программам «Молекулярная и клеточная биотехнология» и «Технология биофармацевтических препаратов», инженеров по специальности «Биотехнология» со специализациями «Технология белковых и биологически активных веществ», «Медицинская биотехнология», по специальности «Стандартизация и сертификация» со специализацией «Стандартизация и сертификация биологически активных соединений и лекарственных препаратов». За прошедший период выпущено в среднем в каждом году – бакалавров 20-25, магистров – 15-18, инженеров – 8-12.

Выпускники кафедры успешно обучаются в аспирантуре или работают в ведущих биотехнологических и фармацевтических институтах (как правило, кафедра проводит с этими организациями совместные научные и технологические исследовательские работы), таких как ИБХ РАН, ИМГ РАН, ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН, Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Институт физико-химической медицины, ГосНИИ прикладной микробиологии, Институт вирусологии РАМН, Институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, фирмы «ХимРар», «Низар», «Микроген», «Мастерклон», «Наносистема», «Фарм-стандарт», Опытное производство ИБХ РАН и др.

Успешно работают выпускники кафедры и за рубежом в известных университетах и

фирмах США, Великобритании, Австралии, Нидерландов, Австрии, Германии, Канады, Украины и др.

Высокий уровень качества подготовки выпускаемых специалистов, постоянная модификация образования на кафедре обусловлены методической работой преподавателей [1, 2], что признается в общероссийских масштабах. Пример этому – поручение Минобрнауки РФ составить образовательные стандарты третьего поколения по направлению «Биотехнология» для бакалавров и магистров, что и было успешно реализовано.

Общероссийское лидерство кафедры в указанных областях учебного процесса признается в стране. Недавно заведующий кафедрой В.И. Швец назначен руководителем секции «Биотехнология» Учебно-методического объединения (УМО) по химическому образованию Минобрнауки РФ. Он организует и направляет работу по созданию методического обеспечения во всех 29 вузах России, где есть кафедры биотехнологии.

Более подробно информация об учебной и методической работе кафедры изложена в статье А.Б. Пшеничниковой и В.И. Швеца «Подготовка кадров на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии», опубликованной в этом номере журнала.

Некоторая самая общая информация о научных исследованиях кафедры. Более подробно развитие основных тенденций кафедральных научных исследований отражено в статьях преподавателей и сотрудников кафедры, опубликованных в этом номере журнала.

Основным направлением прорывных исследований кафедры является изучение химических, биологических и фармакологических свойств отдельных липидов, их фрагментов и комплексов с пептидами, белками, нуклеозидами, нуклеотидами и другими биологически активными соединениями и создание на основе этих данных технологичных методов получения лекарственных и диагностических препаратов нового поколения [3–7].

Фундаментальные исследования кафедры последних лет в области липидов посвящены установлению молекулярных основ организации и функционирования биологических мембран с помощью биохимических, биофизических и иммунологических методов. Особенно важными оказались результаты с использованием в качестве инструмента исследования специально полученных липидов, меченных флуоресцентными, спиновыми и изотопными метками. Разработаны эффективные методы получения различных типов фосфолипидов с помощью химического или ферментативного синтеза или выделения из природных источников. Пионерскими, общепризнанными во всем мире являются наши работы по

химическому синтезу фосфоинозитидов всех типов [3, 7].

Все эти исследования легли в основу серии медико-биологических разработок, результатом которых явилось создание ряда лекарственных и диагностических препаратов, где фосфолипидные надмолекулярные комплексы играют структурообразующую, а в некоторых случаях и функциональную роль. В основу технологий положены биотехнологические методы, что и предопределило их жизнеспособность. Реализовано получение биохимических препаратов основных классов сложных липидов, биологически активных эмульсий, комплексных систем для приготовления кровезаменителей, препаратов для лечения онкологических, вирусных заболеваний, липидных иммуномодуляторов, веществ общеукрепляющего действия, противотуберкулезных препаратов, диагностикумов и др. [5–7]. Всего внедрено в производство 20 лекарственных, диагностических и биохимических препаратов, 15 проходят клинические и биологические испытания.

В последние годы на кафедре реализуется современная технология создания лекарственных препаратов нового поколения на основе принципов фармацевтической бионанотехнологии. Главные достижения кафедральных работ в этом направлении связаны с исследованиями в области нанокапсулированных лекарственных препаратов, в частности, липосом [5–7] и полимерных наносом [8].

Работы кафедры активно публикуются в России и за рубежом, докладываются на российских и международных конференциях и съездах, патентуются в России и других странах; среди них свыше 40 монографий и обзоров, более 800 статей и 90 патентов. Кафедра активно занимается подготовкой кадров высшей квалификации. За годы существования кафедры в докторантуру принято 9 человек, в аспирантуру ежегодно принимается 7–8 человек. Выпущено 19 докторов наук,

ежегодно защищается 5–7 кандидатов наук. Кафедра является организационной ячейкой Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (председатель Совета – проф. В.И. Шве́ц). Ежегодно на Совете защищается 2–3 докторские и 15–17 кандидатских диссертаций из Москвы, разных городов России и других стран.

Научно-педагогический рейтинг кафедры высоко оценивается в России и за рубежом. Коллектив кафедры в течение последних 8 лет официально признается ведущей научной школой России в области живых систем. Кафедра постоянно выигрывает престижные российские и зарубежные гранты, что высоко характеризует уровень научной и прикладной работы кафедры. Такое же признание получают отдельные преподаватели, аспиранты, студенты, выигрывая различные научно-исследовательские конкурсы, получая стипендии Президента РФ, Правительства РФ.

Многообразна научно-организационная деятельность кафедры. Ряду ведущих преподавателей и сотрудников приходится участвовать в организации исследований на общегосударственном уровне, в разработке, руководстве, экспертизе программ по биотехнологии, постановке производства лекарственных препаратов, совершенствованию медицинской промышленности, в работах в составе научных, научно-технических, координационных Советов и секций Госдумы РФ, ряда Министерств, Правительств РФ и Москвы, РАН, РАМН, Общества биотехнологов РФ, Российских биохимического и химического обществ, в деятельности редколлегии 5 научных журналов.

Коллектив кафедры встречает свою знаменательную дату с реальными планами и кадровыми, творческими и материальными возможностями для решения в будущем задач подготовки кадров и проведения научных и технологических работ в области биотехнологии и бионанотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Носов Г.А., Зиновкина Т.В., Одинцов К.Ю., Лапшенков Г.И., Победимский Д.Г., Шве́ц В.И. Инженерные основы биотехнологии: учебное пособие. – М.: ИПЦ МИТХТ. 1-е издание – 1998. 388 с. 2-е издание – 2004. 379 с.
2. Лапшенков Г.И., Победимский Д.Г., Шве́ц В.И. Введение в инженерные проблемы биотехнологии: учеб. пособие. – М.: ИПЦ МИТХТ. 2010. 420 с.
3. Шве́ц В.И., Степанов А.Е., Крылова В.Н., Гулак П.В. *Мио-инозит* и фосфоинозитиды. – М.: Наука, 1987. 247 с.
4. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Шве́ц В.И. Физиологически активные липиды. – М.: Наука, 1991. 136 с.
5. Дудниченко А.С., Краснопольский Ю.М., Шве́ц В.И. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике. – Харьков: Изд. группа «РА-Каравелла», 2001. 144 с.
6. Шве́ц В.И., Каплун А.П., Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Чехонин В.П. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века // Рос. нанотехнологии. 2008. Т. 3. № 11–12. С. 52–66.
7. Шве́ц В.И. Фосфолипиды в биотехнологиях // Вестник МИТХТ. 2009. Т. 4. № 4. С. 4–25.
8. Гельперина С.Э., Шве́ц В.И. Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц // Биотехнология. 2009. № 3. С. 8–23.

ПОДГОТОВКА КАДРОВ НА КАФЕДРЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ МИТХТ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

А.Б. Пшеничникова, доцент, В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Рассмотрены этапы становления современной системы подготовки биотехнологических кадров – специалистов, бакалавров, магистров, аспирантов, докторантов – на кафедре Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова. Разработанная научно-методическая база и методология подготовки биотехнологических кадров была использована при разработке новых ФГОС ВПО третьего поколения по направлению 240700 «Биотехнология» (уровни подготовки – бакалавр и магистр).

Stages of formation of the modern system of training of highly-skilled biotechnological personnel – specialists, bachelors, masters, graduate and doctoral students – at the department of Biotechnology and bionanotechnology of M. V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology are reviewed. The scientific and methodological framework and methodology for biotechnology training were used in the development of the third generation of new State Educational Standards of Higher Professional Education in the direction 240700 Biotechnology (levels of training: bachelor and master).

Ключевые слова: высшее профессиональное образование, биотехнология, государственные образовательные стандарты.

Key words: higher professional education, biotechnology, state educational standards.

Введение

Структура подготовки квалифицированных кадров по биотехнологии в Российской Федерации в настоящее время включает специалитет 240901 «Биотехнология», бакалавриат (240100.62) и магистратуру (240100.68) по направлению «Химические технологии и биотехнология». В соответствии с действующим Государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования (ФГОС ВПО) второго поколения подготовка ведется по двум профилям: 1) биотехнология и 2) пищевая биотехнология. Реформа высшей школы, вызванная острой потребностью развивающейся инновационной экономики России в высококвалифицированных специалистах, способных эффективно адаптироваться к разным видам профессиональной деятельности в ответ на изменения на рынке труда, предусматривает переход на ФГОС ВПО третьего поколения. Двухуровневая система подготовки бакалавров и магистров предполагает введение широкой бакалаврской программы с последующей специализацией в магистратуре или на производстве.

Учитывая особую важность и специфику подготовки кадров в области биотехнологии – приоритетного направления науки и практики, из направления подготовки бакалавров и магистров 550800 «Химическая технология и биотехнология» было выделено отдельное направление 240700 «Биотехнология». В МИТХТ им. М.В. Ломоносова по заданию Минобрнауки РФ и Учебно-методического объединения (УМО) вузов по образованию в области химической технологии и биотехнологии были разработаны ФГОС ВПО третьего поколения по направлению подготовки 240700 «Биотехнология» (уровни подготовки – бакалавр и магистр)

(Приказы Минобрнауки РФ от 22 декабря 2009 г. №№ 808 и 816) [1, 2]. Поскольку направление «Биотехнология» является вновь открытым, разработанный стандарт не имеет аналогов в отечественной практике.

Основным отличием ФГОС третьего поколения от предыдущих образовательных стандартов является модульно-компетентностный подход. Компетенции – это алгоритм действий специалиста, которые выявляются в практической деятельности и социальных взаимодействиях. Если прежний ФГОС предполагал продолжение обучения бакалавров в магистратуре и обеспечивал им широкую фундаментальную подготовку, то ФГОС третьего поколения нацелен на подготовку бакалавра, который сможет найти себе место в обществе как специалист с высшим образованием. Виды профессиональной деятельности являются общими для бакалавра и магистра, но уровень овладения ими различен: научно-исследовательский, проектно-конструкторский, организационно-управленческий, производственно-технологический виды деятельности выпускника. Магистры будут подготовлены еще и к педагогической деятельности. Формирование компетенций бакалавра, которые позволят ему найти достойное место на рынке труда, причем в рамках полученной специальности, самая сложная задача нового ФГОС. Без участия в этой работе потенциальных работодателей, представителей академического сообщества и бизнеса она не может быть решена. При разработке ФГОС по направлению «Биотехнология» использовался многолетний опыт подготовки высококвалифицированных биотехнологических кадров кафедры Биотехнологии и бионанотехнологии (БТ и БНТ). В настоящей работе

рассмотрены основные этапы формирования современной системы биотехнологического образования РФ на примере опыта кафедры Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова.

Результаты и их обсуждение

Пик интенсивности развития биотехнологической отрасли в России и стран ближнего зарубежья, а следовательно, и потребности в квалифицированных специалистах, приходится на 70-80-е годы XX века. В этот период были открыты кафедры, готовящие специалистов-биотехнологов, в различных вузах, прежде всего в химико-технологических (МИТХТ им. М.В. Ломоносова, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Казанский химико-технологический университет (КХТУ) и др.). В МИТХТ им. М.В. Ломоносова в 1985 г. была создана кафедра Биотехнологии (с 2009 г. – кафедра БТ и БНТ), которую возглавил профессор, академик РАН Виталий Иванович Шве́ц – крупнейший специалист в области липидзависимых биологических систем, конструирования на их основе новых лекарственных и диагностических препаратов, в том числе наноструктурированных, в современной терминологии – липосомальных наноконтейнеров лекарственных субстанций. Сегодня кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ – признанный лидер в области биотехнологического образования в России, что отмечено премией Правительства РФ в 2007 г., и представляет научную школу (НШ-5799.2006.4, НШ-903.2008.4, НШ-3468.2010.4) в области биотехнологии [3, 4].

Основным научным направлением работы кафедры Биотехнологии МИТХТ с момента ее образования было исследование фундаментальных основ организации и функционирования биологических мембран. Разработка первой образовательной программы подготовки квалифицированных биотехнологических кадров базировалась на ГОС по специальности «Биотехнология» и на опыте родственных кафедр – кафедры молекулярной биотехнологии СПбГИ (ТУ), кафедры биотехнологии КХТУ, кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева [5]. Первый учебный план включал дисциплины: «Химия и технология биологически активных соединений», «Методы получения биологически активных соединений», «Общая микробиология и биотехнология», «Методы выделения и исследования биологически активных соединений». Для преподавания таких важнейших, с точки зрения модели специалиста-биотехнолога, дисциплин, как «Биотехнология белков», «Прикладная молекулярная биотехнология», «Оборудование и основы проектирования биотехнологических производств» были приглашены ведущие

специалисты в области фундаментальной и прикладной биотехнологии, которые совместно с преподавателями кафедры разработали учебные и рабочие программы соответствующих дисциплин на современном методическом и научном уровнях. В дальнейшем преподавание этих дисциплин перешло к преподавателям кафедры Биотехнологии.

Для формирования компетенций, необходимых выпускникам для работы на биотехнологических предприятиях, в 1996-98 гг. в рамках действующего учебного плана был создан оригинальный учебный план, в котором был предусмотрен межкафедральный комплекс дисциплин. В его создании участвовали преподаватели кафедр: Процессы и аппараты химической технологии, Системы управления и автоматизации химико-технологических процессов, Общей химической технологии, Биотехнологии. Инженерный блок состоял из дисциплин «Биоинженерия», «Контроль и управление биотехнологическими процессами», «Компьютерное конструирование биотехнологических процессов», «Технологический менеджмент в биотехнологии» и первоначально преподавался в ходе производственной практики 5 курса. Затем, после введения подготовки бакалавров и магистров, эти дисциплины были интегрированы в учебный план подготовки инженеров-биотехнологов. Объединенный коллектив преподавателей вышеперечисленных кафедр создал учебник «Инженерные основы биотехнологии» [6, 7], который выдержал три переиздания и активно используется и сегодня в учебном процессе.

Реализация разработанной образовательной программы показала, что в химико-технологическом вузе подготовка инженеров-биотехнологов имеет некоторые особенности. Несмотря на требования ФГОС включать в базовую часть естественнонаучного цикла такие дисциплины, как «Общая биология и микробиология» и «Биохимия и прикладная молекулярная биология», действующий в то время общепитутский учебный план не позволял реализовать это требование. Как известно, основные образовательные программы (ООП) подготовки специалистов предусматривают изучение следующих циклов учебных дисциплин: гуманитарных и социально-экономических, математических и естественнонаучных, профессиональных. Каждый цикл учебных дисциплин имеет обязательную (базовую) часть и вариативную (профильную) часть, устанавливаемую вузом. Вариативная (профильная) часть должна предоставлять студентам возможность расширения или углубления знаний, умений и навыков, определяемых содержанием базовых дисциплин, и получения дополнительных знаний и навыков для успешной профессиональной

деятельности. Каждой группе компетенций соответствует свой модуль (группа дисциплин) содержания программы определенной трудоемкости, а методическая составляющая стандарта нацелена на формирование и развитие компетенций обучающихся.

В результате отсутствия дисциплин биологической составляющей в учебном плане на первом этапе создания современной системы подготовки биотехнологических кадров в химико-технологических вузах возникали трудности преподавания специальных дисциплин. Адаптация к действующей образовательной системе заключалась в формировании отсутствующих в естественнонаучном цикле дисциплин знаний, умений и навыков в ходе освоения специальных дисциплин. Так, в плане дисциплины «Общая биотехнология» содержались темы программы дисциплины «Общая биология и микробиология», а в плане дисциплины «Химия и технология биологически активных соединений» – темы дисциплины «Биохимия и прикладная молекулярная биология». Терминологические проблемы, таким образом, разрешались, студенты понимали в общем виде содержание специальных курсов, однако системная естественнонаучная база знаний, включающая необходимые биологические составляющие, гармонично сочетающиеся с другими естественнонаучными разделами, сформирована не была. Частично эту проблему удавалось решать на стадии выполнения дипломных работ, которые студенты выполняли как в МИТХТ, так и на базовой кафедре в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и в других отраслевых и академических институтах. Однако качество подготовки выпускников, таким образом, зависело от качества руководства дипломными работами, места выполнения и тематики дипломных работ, что, несмотря на отдельные успехи, не может быть оценено положительно. Вместе с этим выпускники, подготовленные по этой образовательной программе, были востребованы как в России, так и за рубежом, и практически все до настоящего времени работают по специальности.

В 1992-93 уч. г. МИТХТ им. М.В. Ломоносова принял участие в эксперименте по переходу на многоуровневую систему подготовки кадров и практическим опытом работы доказал ее высокую эффективность, на протяжении 18 лет реализую двухуровневую систему подготовки бакалавров (4 года) и магистров (2 года после окончания бакалавриата) по направлению «Химические технологии и биотехнология» (квалификация выпускников – бакалавр или магистр техники и технологии). Кафедра Биотехнологии одной из первых в России создала свой проект учебного плана подготовки

бакалавров [8]. Для бакалавриата были разработаны программы дисциплин вариативной части учебного плана – «Основы биохимии», «Основы биотехнологии», «Современные методы исследования биологически активных соединений», «Химия и технология биологически активных соединений», «Промышленная биотехнология». В системе подготовки бакалавров также успешно используются возможности уникального Учебно-научного центра ИБХ РАН. Включение в план бакалавриата научно-исследовательской практической работы студентов в рамках практикумов и квалификационной работы бакалавра в сочетании с фундаментальными знаниями позволяет сформировать у выпускников бакалавриата компетенции, необходимые для работы на предприятиях отрасли, в научно-исследовательских институтах или для продолжения обучения в магистратуре.

На второй ступени ВПО в магистратуре подготовка кадров с 1996 г. и поныне осуществляется по магистерской программе 550822 «Молекулярная и клеточная биотехнология» [9, 10]. Магистерская программа «Молекулярная и клеточная биотехнология» создана и реализована с целью подготовки научных кадров в области современной биотехнологии, молекулярной биологии, генетической и клеточной инженерии. Основным отличием магистратуры по программе «Молекулярная и клеточная биотехнология» является нацеленность на научные исследования для медицины, получение диагностических и лекарственных препаратов. Учебный план, обеспечивающий получение таких компетенций магистрам, включает следующие основные дисциплины: «Молекулярные основы биотехнологии», «Структура и функции белков и нуклеиновых кислот», «Структура и функции биологических мембран», «Общая микробиология», «Белковая инженерия», «Регуляция клеточной активности», «Биоинженерия (промышленная биотехнология)», «Методы выделения и исследования биологически активных соединений», «Синтетические методы в биотехнологии и биоорганической химии», «Конструирование лекарственных и диагностических препаратов», «Информационные технологии в биотехнологии».

Для качества подготовки особое значение имеет интеграция учебного процесса и научных исследований. Магистерские диссертации выполняются как в МИТХТ, так и на базовых кафедрах в ИБХ РАН и Институте молекулярной генетики РАН, а также в других институтах РАН и РАН. Магистры биотехнологии, выполнившие и защитившие магистерскую диссертацию (эта диссертация может быть основой следующей квалификационной работы – диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических или биологических наук), являются специалистами, способными самостоятельно решать научные задачи в области молекулярной и клеточной биотехнологии.

Наряду с подготовкой бакалавров и магистров, с 1992 года и по настоящее время кафедра БТ и БНТ осуществляет подготовку инженеров на очном и очно-заочном отделениях по специальности 07.01 «Биотехнология», по специализации 07.01.01 «Технология белковых и биологически активных веществ» [11]. В создании учебного плана приняли участие наряду с кафедрой Биотехнологии другие кафедры МИТХТ: Процессы и аппараты химической технологии (дисциплина «Биоинженерия»), Системы управления и автоматизации химико-технологических процессов («Контроль и управление биотехнологическими процессами»), Общей химической технологии («Компьютерное конструирование биотехнологических процессов»). На кафедре Биотехнологии будущие инженеры изучали специальные дисциплины: «Биологическая подготовка биотехнологического производства», «Специальные главы к дисциплине «Основы биотехнологии», «Химия и технология биологически активных соединений», «Технологический менеджмент в биотехнологии», «Современные методы выделения, очистки и анализа биологически активных соединений», «Технология препаратов с совмещенными химико-технологическими и биотехнологическими процессами». Освоение информационного массива современных данных в области инженерных проблем биотехнологии, прохождение производственной практики и выполнение дипломной работы или проекта обеспечивает получение высшего квалификационного звания в сфере технологического образования – инженер.

Среди новых наукоемких направлений биотехнологии наиболее быстро развивается биофармацевтическая отрасль. Биофармацевтика является стратегической перспективой фармацевтической промышленности. Среди лекарственных препаратов, предназначенных для решения проблем современной медицины, решающая роль принадлежит наукоемким биотехнологическим продуктам. Среди них инсулин, интерфероны, гормон роста, вакцины, антибиотики, диагностикумы, пробиотики. Основа производства этих продуктов – современные биотехнологии, которые вошли в «Перечень критических технологий», утвержденный Президентом Российской Федерации 21 мая 2006 г. № Пр-842. Переориентация отечественной фармацевтической промышленности на инновационный путь развития предусматривает совершенствование структуры и содержания подготовки высококвалифицированных кадров в области разработки и производства лекарственных и диагно-

стических средств. В настоящее время в России наблюдается дефицит высококвалифицированных кадров для современного биофармацевтического производства и индустриальной науки. Проблема заключается не столько в отсутствии кадров как таковых, сколько в дефиците кадров, подготовленных для современного уровня развития этой отрасли.

Для обеспечения современной биофармацевтической отрасли научно-технологическими кадрами была поставлена задача разработать новую методологию их подготовки, которая должна базироваться на фундаментальных и прикладных основах биотехнологии и знании химии, химических и фармацевтических технологий. На кафедре БТ и БНТ была разработана и с 2009 г. реализуется новая магистерская программа «Технология биофармацевтических препаратов», нацеленная на формирование выпускника, соответствующего профессионально-ориентированной модели специалиста в области биофармацевтики в контексте компетентностного подхода [12–15]. Задачей магистратуры «Технология биофармацевтических препаратов» является подготовка высококвалифицированных кадров, способных к организации, планированию и управлению биофармацевтическими производствами. Программа подготовки включает фундаментальные биотехнологические дисциплины и дисциплины технологического блока: «Конструирование продуцентов активных фармацевтических субстанций», «Технология производства активных фармацевтических субстанций», «Технологии готовых лекарственных форм», «Организация биофармацевтических производств в соответствии с GMP», «Структура, функции и методы исследования белков и нуклеиновых кислот», «Иммунобиотехнология», «Методы создания активных фармацевтических субстанций», «Основы фармакологии», «Экономика, организация и управление биофармацевтическими предприятиями».

Важнейшей составной частью учебной программы является практическая работа на базе действующих современных биофармацевтических производств. Студенты магистратуры «Технология биофармацевтических препаратов» выполняют магистерские диссертации на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН, в Гематологическом научном центре РАМН, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, НИИ экспериментальной онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Разработанная научно-методическая база и методология подготовки кадров для биофармацевтической отрасли может быть положена в основу обеспечения отечественной фармацевтической промышленности высококвалифицированными кадрами.

Переход в 2011 г. на ФГОС ВПО третьего поколения по направлению 240700 «Биотехнология» позволит существенно повысить качество профессиональной подготовки выпускаемых бакалавров и магистров. МИТХТ им. М.В. Ломоносова является разработчиком ФГОС ВПО по направлению 240700 «Биотехнология» [1, 2], а также Примерной образовательной программы подготовки бакалавра, рекомендуемой УМО для реализации всем вузам России, осуществляющих подготовку бакалавров и магистров по этому направлению. С этой целью Примерная образовательная программа подготовки бакалавра, включающая Примерный учебный план и учебные программы дисциплин, размещена на официальном сайте МИТХТ [16]. В соответствии с разработанным при активном участии преподавателей кафедры БТ и БНТ Примерным учебным планом, в базовую часть естественнонаучного цикла включены такие важные для биотехнологов дисциплины, как «Химия биологически активных веществ», «Общая биология и микробиология» и «Основы биохимии и прикладной молекулярной биологии». Преподавание этих дисциплин предполагается на 2 и 3 курсах, следовательно, к освоению профессиональных дисциплин студенты бакалавриата приступят с достаточными знаниями биологии, биохимии и биоорганической химии. В базовой части цикла профессиональных дисциплин предусмотрены: «Основы биотехнологии», «Процессы и аппараты биотехнологии», а в вариативной части, для профиля «Биотехнология» – «Процессы и аппараты биотехнологии (проект)», «Оборудование биотехнологических производств», «Теоретические основы биотехнологии», «Биотехнологические производства», «Методы контроля и сертификации биотехнологических продуктов», «Системы управления технологическими процессами, проектирование биотехнологических производств». Поскольку дисциплины вариативной части выбираются и утверждаются вузом в зависимости от профиля подготовки и вида профессиональной деятельности выпускника, данный раздел Примерного учебного плана носит рекомендательный характер. Вариативная часть профессионального цикла содержит раздел «Дисциплины по выбору студента», в который нами рекомендовано для подготовки бакалавра, способного работать в области промышленной биотехнологии (производственно-технологический вид деятельности), включить следующие дисциплины: «Методы получения промышленных штаммов микроорганизмов», «Культивирование промышленных продуцентов», «Основы асептики в биотехнологических производствах», «Методы выделения и очистки биотехнологических продуктов», «Технологический

менеджмент в биотехнологии», «Экологическая биотехнология». Для формирования компетенций, необходимых выпускникам бакалавриата для других видов деятельности, например, научно-исследовательской и продолжения обучения в магистратуре, содержание раздела «Дисциплины по выбору студента» необходимо корректировать.

ФГОС ВПО для подготовки магистров по направлению 240700 «Биотехнология» предполагает в базовой части общенаучного цикла освоение следующих дисциплин: «Современные проблемы биотехнологии», «Информационные технологии в науке и образовании», «Философские проблемы естествознания», «Экономика, менеджмент и инновации в биотехнологии», «Иностранный язык». В базовую часть профессионального цикла включена одна дисциплина – «Методологические основы исследований в биотехнологии», трудоемкость которой составляет от 10 до 25% объема всего профессионального цикла. Следовательно, вузы смогут в соответствии с собственной магистерской программой включить в учебный план дисциплины, необходимые для формирования требуемых компетенций выпускника.

Учитывая высокие темпы развития современной биотехнологии, внедрения новых технологий в практику, стремительную динамику обновления знаний в этой области, реализация системы биотехнологического образования невозможна без постоянного повышения уровня и качества знаний специалистов. Продолжением образования в магистратуре является система послевузовской подготовки, к которой относятся аспирантура и докторантура. Тематика кандидатских и докторских диссертаций, выполняемых на базе МИТХТ и совместно с академическими и отраслевыми центрами медико-биологического направления, отражает тенденции и основные направления развития новейших биотехнологий в России.

В МИТХТ им. М.В. Ломоносова имеется многолетний опыт подготовки аспирантов и докторантов по специальностям 03.00.23 «Биотехнология» и 02.00.10 «Биоорганическая химия». Составной частью общего обучения аспиранта служит теоретическое обучение – основа высокой квалификации и компетенции специалиста в данной области, обеспечивающее необходимый комплекс новых знаний наряду с экспериментальными навыками и владением информационными технологиями. Используемая методология теоретического обучения аспирантов продиктована как современным развитием данной отрасли знаний вообще, так и определенной научной тематикой обучающих кафедр, направлениями собственных исследований аспирантов. Методическая проработка научно-учебного процесса включала разработку

программы теоретического курса «Современные достижения, проблемы и перспективы развития биоорганической химии и биотехнологии», проведение методических семинаров, формирование электронной библиотеки, создание комплекта учебно-методической документации [17–19].

Теоретический курс «Современные достижения, проблемы и перспективы развития биоорганической химии и биотехнологии» разработан на основе программ кандидатского минимума по специальностям 02.00.10 «Биоорганическая химия» и 03.00.23 «Биотехнология» с использованием 40-летнего опыта подготовки специалистов высшей квалификации (кандидатов и докторов наук) в МИТХТ им. М.В. Ломоносова. В составе лекторов – доценты и профессора из МИТХТ им. М.В. Ломоносова, а также ведущие специалисты – профессора, члены-корреспонденты РАН и РАМН из профильных институтов РАН и РАМН, а также ученые, работающие в университетах зарубежных стран. Самостоятельная работа аспиранта направлена на изучение научной литературы и имеет целью написание реферата по теме диссертации. По окончании курса проводится аспирантская конференция, на которой с краткими сообщениями по современным проблемам и перспективам в области биотехнологии и биоорганической химии выступают слушатели – аспиранты 2 и 3 года обучения.

Кроме лекционного курса, аспиранты, докторанты, молодые преподаватели и сотрудники кафедры БТ и БНТ активно участвуют в работе научного семинара, руководимого академиком РАМН В.И. Швецом, по теме «Создание адресных лекарственных препаратов нового поколения методами нанобиотехнологии». Этот научный семинар проводится на базе МИТХТ им. М.В. Ломоносова с периодичностью не менее одного раза в месяц, его тематика охватывает новейшие химические и биотехнологические подходы к созданию сложных лекарственных препаратов направленного действия, разработку систем их направленной доставки, что полностью соответствует и дополняет программу лекционного курса; с докладами выступают как ведущие ученые в области бионанотехнологий из других организаций, так и профессора и доценты кафедры БТ и БНТ.

В рамках созданной системы подготовки кадров для биофармацевтической отрасли раз-

работана программа профессиональной переподготовки и повышения квалификации руководителей и кадровых специалистов, что особенно актуально при нехватке специалистов современного уровня. Одним из направлений, предложенным коллективом профессоров МИТХТ им. М.В. Ломоносова и Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, является разработанная и внедренная в практику программа дополнительного образования по квалификации «Менеджер фармацевтического инжиниринга» [20]. Программа удовлетворяет комплексу требований по осуществлению постдипломного образования (переподготовки) в целях обеспечения унифицированного статуса специалиста для отрасли биомедицинских технологий (бывшего до переподготовки технологом, фармацевтом или медицинским работником). В процессе переподготовки слушателям предложено более глубоко изучить учебные дисциплины, которые при получении титульного высшего образования были изучены недостаточно из-за сравнительно узкой специализации, например, «Фармацевтическая технология» для биотехнологов, «Фармакогнозия» для биотехнологов и фармацевтов, «Фармакология» для биотехнологов и медиков, «Информатика» для фармацевтов и медиков и др. Проведение маркетинга среди руководителей медико-биологической отрасли показало большую потребность в подобных специалистах нового поколения на рынке управленческих ресурсов.

Заключение

На кафедре БТ и БНТ МИТХТ им. М.В. Ломоносова создана система вузовской и послевузовской подготовки квалифицированных биотехнологических кадров, подготовленных для различных видов деятельности выпускников. Научно-методическая база и методология подготовки биотехнологических кадров была использована при разработке новых ФГОС ВПО третьего поколения по направлению подготовки 240700 «Биотехнология» (уровни подготовки – бакалавр и магистр).

Данная работа была выполнена при поддержке Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» Минобрнауки РФ, регистрационный номер: 3.1.1/9247.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Сайт Минобрнауки www.edu.ru/db-mon/mo/Data/d_09/m816.html
2. Сайт Минобрнауки www.edu.ru/db-mon/mo/Data/d_09/m808.html
3. Береговых В.В., Быков В.А., Иванов В.Т., Миронов А.Ф., Овчинникова Т.В., Победимский Д.Г., Симонов-Емельянов И.Д., Соломонов В.А., Фролова А.К., Швеиц В.И. Российский инновационный учебно-научный комплекс для подготовки кадров в области биотехнологии // Вестник МИТХТ. 2007. Т. 2. № 1. С. 34–40.

4. Шве́ц В.И., Побе́димский Д.Г., Лапше́нков Г.И., Соломо́нов В.А., Фро́лкова А.К. Принципы построения и опыт организации образовательной системы нового поколения в области биотехнологии на основе интеграции многоуровневой фундаментальной подготовки и использования достижений российской науки // Биотехнология. 2005. № 4. С. 84–94.
5. Каплун А.П. «Плюс биотехнологизация...». История кафедры биотехнологии // Газета «Ломоносовец». № 3. 16 марта 1996 г. С. 4–5.
6. Носов Г.А., Зиновкина Т.В., Одинцов К.Ю., Лапшенков Г.И., Победимский Д.Г., Шве́ц В.И. Инженерные основы биотехнологии: учеб. пособие. – М.: ИПЦ МИТХТ. 1998. 396 с.
7. Носов Г.Н., Зиновкина Т.В., Одинцов К.Ю., Лапшенков Г.И., Победимский Д.Г., Шве́ц В.И. Инженерные основы биотехнологии: учеб. пособие (2-е изд.) / Под ред. Д.Г. Победимского. – М.: ИПЦ МИТХТ, 2005. 380 с.
8. Сборник учебных программ, типовых заданий и вопросов: учеб. пособие для бакалавров по направлению 550800 «Химическая технология и биотехнология» / Под ред. В.И. Шве́ца – М.: ИПЦ МИТХТ. 2002. 61 с.
9. Пшеничникова А.Б., Шве́ц В.И. Подготовка научных кадров в соответствии с магистерской программой 550822 «Молекулярная и клеточная биотехнология» / Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы II Московского Междунар. конгресса. Т. 2. Москва. 10–14 ноября 2003. – М., 2003. С. 275.
10. Молекулярная и клеточная биотехнология: сборник учебных программ профилирующих дисциплин магистерской программы 550822: учеб. пособие для магистров / Под ред. В.И. Шве́ца. – М.: ИПЦ МИТХТ. 2006. 56 с.
11. Биотехнология: сборник учебных программ профилирующих дисциплин специальности 07.01.00 «Биотехнология» и специализаций: 07.01.01 «Технология белковых и биологически активных веществ», 07.01.02 «Технология биоорганического синтеза», 07.01.03 «Технология лекарственных препаратов»: учеб. пособие для студентов высшей инженерной школы. Руководство для постдипломного образования / Под ред. В.И. Шве́ца, А.Ф. Миронова, Д.Г. Победимского. – М.: ИПЦ МИТХТ. 2004. 69 с.
12. Шве́ц В.И., Побе́димский Д.Г., Лапше́нков Г.И., Баирамашвили Д.И., Фро́лкова А.К. Новая магистерская программа «Технология биофармацевтических препаратов» // Вестник МИТХТ. 2007. Т. 2. № 1. С. 26–33.
13. Пшеничникова А.Б., Брагина Н.А., Биглов Р.Р., Баирамашвили Д.И., Шве́ц В.И. Система подготовки высококвалифицированных кадров для биофармацевтической отрасли в МИТХТ им. М.В. Ломоносова // Биофарм. журн. 2010. Т. 2. № 4. С. 32–39.
14. Пшеничникова А.Б., Брагина Н.А., Биглов Р.Р., Баирамашвили Д.И., Шве́ц В.И. Подготовка высококвалифицированных кадров для биофармацевтической отрасли в МИТХТ им. М.В. Ломоносова // Биофарма-2010. От науки к промышленности: сб. тезисов Рос. симпозиума с междунар. участием. 17–20 мая 2010, Ереван, Армения. С. 36–37.
15. Пшеничникова А.Б., Шве́ц В.И. Система подготовки высококвалифицированных кадров для биофармацевтической отрасли / Сб. научных трудов Научно-практ. конференции, посвященной 65-летию факультета промышленной технологии лекарств Санкт-Петербургской государственной фармацевтической академии. 03 декабря 2010, С.-Пб. С. 90–92.
16. <http://www.mitht.ru/pages/549>.
17. Биотехнология: сборник учебно-методической документации для аспирантов по специальности 03.00.23 / Под ред. В.И. Шве́ца. – М.: ИПЦ МИТХТ. 2006. 76 с.
18. Современные достижения, проблемы и перспективы развития биоорганической химии и биотехнологии. Программа теоретического обучения аспирантов по специальностям 02.00.10 «Биоорганическая химия» и 03.00.23 «Биотехнология»: учеб.-метод. пособие / Под ред. В.И. Шве́ца. – М.: ИПЦ МИТХТ. 2006. 44 с.
19. Брагина Н.А., Кириллова Ю.Г., Лютик А.И., Миронов А.Ф., Шве́ц В.И. Организация и методическое обеспечение теоретического обучения аспирантов по специальностям «Биоорганическая химия» и «Биотехнология» // Вестник МИТХТ. 2009. Т. 4. № 6. С. 52–55.
20. Фармацевтический инжиниринг: сб. учебных программ дисциплин дополнительной профессиональной образовательной программы для получения дополнительной квалификации «Менеджер фармацевтического инжиниринга» // Под ред. В.В. Береговых – М.: ИПЦ МИТХТ. 2006. 28 с.

ГИБРИДНЫЕ АНАЛОГИ РЕТИНОИДОВ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ НАНОБИОФОТОНИКИ

А.А. Ходонов, профессор, А.В. Лаптев, научный сотрудник, А.Ю. Лукин, ассистент, Н.Е. Беликов, аспирант, М.А. Фомин, студент, *О.В. Демина, старший научный сотрудник, **Д.А. Складнев, ведущий научный сотрудник, ***С.А. Тюрин, генеральный директор, В.И. Шве́ц, заведующий кафедрой
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

** Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

*** ООО «БИОС»

e-mail: ovd@sky.chph.ras.ru

В настоящем мини-обзоре представлены собственные экспериментальные данные, полученные авторами в рамках цикла структурно-функциональных исследований бионанофотохрома бактериородопсина в течение последних 10 лет. Рассмотрены методы получения, свойства и взаимосвязь структура–спектральные параметры в нескольких сериях гибридных аналогов ретиноидов и аналогов бактериородопсина на их основе.

This mini-review presents experimental data obtained by the authors in the context of a cycle of structural-functional research on bionanophotochrome bacteriorhodopsin carried out during the past 10 years. We reviewed the synthetic routes and structure-spectral parameters-properties relationship for a number of series of hybrid retinoid analogs and bacteriorhodopsin analogs based on them.

Ключевые слова: нанобиофотоника, ретиноиды, ретиналь, бактериородопсин и его аналоги, фотоцикл, фотохромы, спиропираны, дитиенилэтены, краун-эфиры.

Key words: nanobiophotonics, retinoids, retinal, bacteriorhodopsin and its analogs, photocycle, photochromes, spiropyrans, dithienylethenes, crown-ethers.

Введение

В течение последних 20 лет сформировалась новая междисциплинарная область науки, объединяющая ряд направлений фотохимии, биоорганической химии и физико-химической биологии и получившая название нанобиофотоника. Одной из ее основных задач является изучение молекулярных механизмов преобразования световой энергии и связанных с этим фотохимических процессов и реакций в различных природных или модельных системах на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

Фундамент данного научного направления исследований в МИТХТ им. М.В. Ломоносова был заложен проф. Н.А. Преображенским в 50-70-х годах, затем оно получило свое дальнейшее развитие в 80-90-х годах прошлого века на кафедре биотехнологии МИТХТ в трудах его учеников профессора В.И. Швеца, профессора Е.Н. Звонковой, доцента Б.И. Мицнера и др. [1–8]. Окончательно это направление науки было сформировано и оформлено в течение последних 20 лет на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ в работах группы проф. А.А. Ходонова [9–71] в сотрудничестве с рядом научных организаций (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Центр фотохимии РАН, Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов и др.).

Объектами исследования в этом цикле работ служили уникальные биологические молекулярные преобразователи и конверторы энергии светового кванта в разнообразные виды химического или физиологического ответа. Они представляют собой сложнейшие супрамолекулярные системы, созданные природой в процессе эволюции, и подразделяются на ковалентные (хромопротеины – ретиналь-содержащие белки) и нековалентные (RAR и RXR – ядерные рецепторы ретиноевой кислоты, ретиноид-транспортные белки) комплексы ретиноидов с макромолекулярными белковыми рецепторами, в которых молекула ретиноида представляет собой уникальную природную фототрансформирующую антенну с большим разнообразием функций. Геометрия полиеновой цепи молекулы ретиноида служит определяющим фактором, детерминирующим вид физиологического ответа в организме хозяина.

Витамин А и его производные – ретиноиды (2–4) (рис. 1) характеризуются широким спектром физиологической и фармакологической активности. Поскольку исходные производные ретиноидов нерастворимы в воде и в водных растворах, то по принятой классификации их относят к группе жирорастворимых витаминов.

Центральное место по своей биологической значимости среди производных витамина А занимает ретиналь (3), который в виде определенных стереоизомеров (*all-E*-, *11Z*-, *13Z*-) формирует хромофорные группы большого

семейства ретиналь-содержащих белков, ответственных за ряд важнейших фотобиологических функций. Хромопротеины, относящиеся к этому семейству, осуществляют светозависимый транспорт ионов-протонов (бактериородопсин и галородопсин), процесс зрительной рецепции

(родопсин), т.е. преобразуют энергию светового кванта в зрительный импульс в зрительных пигментах фоторецепторных клеток, ответственные за фототаксис (сенсорные фобо- и протородопсины, представленные в различных группах организмов) [2, 12, 61, 71, 73].

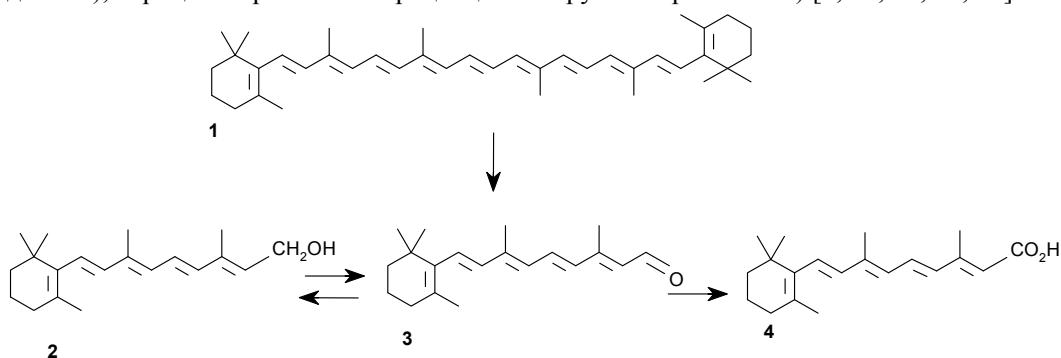


Рис. 1. Основные представители природных ретиноидов: 2 – ретинол (витамин А); 3 – ретиналь; 4 – ретиновая кислота. 1 – β -каротин (предшественник витамина А).

Ретиналь-содержащие белки. Основные представители, особенности структуры и функции

Ретиналь-содержащие белки имеют следующие общие особенности:

1) по своей структуре они представляют собой мембранные белки, состоящие из 7 трансмембранных тяжей;

2) в состав хромофорной группы входит определенный изомер ретиналя (*all-E*- в пигментах микроорганизмов и *11Z*- в зрительных

пигментах), который соединен с ϵ -аминогруппой остатка лизина белка через протонированную альдиминную связь;

3) обладают общностью функциональной активности, связанной с преобразованием энергии светового кванта в различные химические или физиологические ответы (светозависимый транспорт ионов, инициирование каскада зрительной трансдукции или фототаксис) (табл. 1).

Таблица 1. Основные представители ретиналь-содержащих белков и их функции [2, 12].

Белок	Хромофор	Объект	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	Функция
Зрительные пигменты палочек родопсины	<i>11Z</i> -изомер ретиналя	Бык	498	Фоторецепция
		Лягушка	502	
		Осьминог	475	
		Карась	522	
		Насекомые	345-610	
Зрительные пигменты колбочек порфиросины и иодопсины	<i>11Z</i> -изомер ретиналя и его 3,4-дидегидропроизводного	Цыпленок	562	Фоторецепция
Бактериородопсин (БР)	<i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя	<i>Halobacterium salinarum</i>	558 568	Светозависимый транспорт H^+ -ионов
		<i>H. salinarum</i>	578	
Галородопсин	<i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя	<i>H. salinarum</i>	587 373	Светозависимый транспорт Cl^- -ионов
Сенсорные родопсины	<i>all-E</i> -изомеры ретиналя	<i>H. salinarum</i>	587 373	Фототаксис
Ретинохром	<i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя	Кальмар <i>Todares pacificus</i>	496	Фотоизомеризация <i>all-E</i> -ретиналя в <i>11Z</i> -изомер ретиналя
Фараонисродопсин Галородопсин	<i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя	<i>Natronobacterium pharaonis</i>	590 577	Светозависимый транспорт Cl^- -ионов
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	501-505	
Хламиродопсин	<i>all-E</i> - и <i>13Z</i> -изомеры ретиналя	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	501-505	Фототаксис

Бактериородопсин

Бактериородопсин (БР) – наиболее хорошо изученный объект-бионамишень среди других ретиналь-содержащих белков. БР был выделен в 1971 году Остерхельтом и Стокениусом из экстремально галофильной бактерии *Halo-bacterium salinarum* (*halobium*) в виде пурпурных мембран [2, 12, 72]. Он функционирует как светозависимый протонный насос; хромофором БР является протонированный альдимин *all-E*-ретиналя с ϵ -аминогруппой остатка Lys216 апобелка бактериородопсина (БО). Поглощая квант света, БР претерпевает цикл спектральных переходов, сопровождающихся изомеризацией и реизомеризацией полиеновой цепи хромофора с депротонированием и репротонированием его альдимины, причем в ходе фотоцикла происходят значительные конформационные изменения белковой части молекулы БР, особенно на стадиях образования и релаксации ключевого интермедиата М ($\lambda_{\text{макс}}$ 412 нм, ϵ 45.000 М⁻¹ см⁻¹) и последующих интермедиатов его фотоцикла (рис. 2).

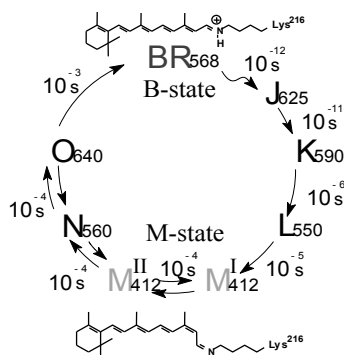


Рис. 2. Фотоцикл бактериородопсина.

На свету исходное основное состояние (B-state) характеризуется *all-E*-конфигурацией хромофора ($\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм, ϵ 63.000 М⁻¹ см⁻¹). В начале этого цикла наблюдается депротонирование альдимины и выброс протона с внешней стороны пурпурной мембраны в окружающую среду. Возврат молекулы в исходное состояние сопровождается репротонированием альдимины, поглощением H⁺ с цитоплазматической стороны мембраны и изомеризацией полиеновой цепи. В результате, при каждом обороте фотохимического цикла через мембрану переносится один протон. Таким образом, БР и его аналоги относятся к семейству бионанофотохромов, трансформирующих энергию кванта света в трансмембранный электрохимический градиент протонов на пурпурной мембране клеток галобактерий. Первые работы по практическому применению препаратов БР и его аналогов (АБР) в различных областях техники и нанобиофотоники были развернуты сразу после установления его функции в клетках галобактерий.

Первые пионерские работы по возможности технического применения пленок БР и АБР как

элементов оптической памяти были проведены в России совместными усилиями коллективов ученых Института биофизики РАН Пущино, Центра фотохимии РАН, кафедры биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ. В 1980-х годах была продемонстрирована эффективность и перспективность применения таких материалов, названных «Биохром», в качестве фотохромных материалов и среды для голографической записи. В последующие годы различными группами исследователей была показана реальная возможность применения получаемых препаратов БР, его аналогов и мутантов для создания опытных образцов, а в перспективе – промышленных образцов и прототипов оптических устройств и материалов для обработки и защиты информации.

Уникальность данного белка – природной фотоуправляемой фотосинтетической системы – для нужд молекулярной нанобиофотоники определяется его следующими свойствами:

- 1) БР – наиболее просто устроенный и необычайно стабильный протонный насос;
- 2) доступен в больших количествах (простая, легко масштабируемая процедура выращивания биомассы культуры *H. salinarum* и выделения мембранных препаратов БР при достаточно низкой ее стоимости);
- 3) стабилен к интенсивному освещению, действию кислорода, в широком диапазоне температур (–196 ÷ 70°C), значений pH (0–11), концентраций солей, в водно-глицериновых средах;
- 4) «первичный акт» после поглощения кванта света (B → J) – чрезвычайно быстрый процесс (10⁻¹² с);
- 5) высокое значение квантового выхода реакции фотоизомеризации C₁₃=C₁₄-связи хромофора;
- 6) наличие технологической возможности встраивания в полимерную матрицу различного состава для получения «сухих» пленок;
- 7) наличие технологической возможности использования изменяющихся оптической или электрической компонент сигнала как в оптических, так и в электронных устройствах для практического применения.

Хотя исследованием БР занимаются десятки лабораторий во всем мире, детальный молекулярный механизм светозависимого транспорта протонов до сих пор еще не известен.

Общий план проведения исследований в данной области на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова представлен ниже.

Основные этапы исследований взаимосвязи структура–функция в ретиналь-содержащих белках [1–72]

1. Моделирование пространственных ограничений хромофорной полости БР с использованием программ HyperChem v. 8.0; опреде-

ление критериев, позволяющих с высокой степенью вероятности прогнозировать результат взаимодействия аналога ретиналя с апобелком и свойства образующихся АБР. Создание двух баз данных, суммирующих свойства аналогов БР, содержащих или аналог ретиналя в качестве хромофора и/или несущих точечную замену аминокислотной последовательности в белковой части. Проведение критического анализа и экспертной оценки взаимосвязи влияния строения хромофора и конкретных точечных мутаций на фотохимические свойства АБР.

2. Оптимизация лабораторной технологии культивирования и выделения мембранных препаратов бактериородопсина (БР) из различных штаммов *H. salinarum* (ET1001, D96N, JW-5). Нарботка препаративных количеств образцов биомассы *H. salinarum* для получения препаратов пурпурных мембран.

3. Разработка универсальных и эффективных синтетических приемов, методик и стратегии создания молекулы ретиноида с заданной структурой. Синтез и наработка препаратов избранных серий уже известных аналогов ретиналя и дизайн молекул и разработка методов синтеза новых серий ретиноидов.

4. Исследование процесса взаимодействия серий синтезированных аналогов ретиналя с БР из апомембран разных штаммов с образованием АБР с разнообразными спектральными свойствами.

5. Комплексное исследование спектральных и кинетических фотохимических характеристик аналогов ретиноидов и АБР в водных суспензиях. Исследование кинетики образования и релаксации основных интермедиатов (М-типа) фотоцикла АБР в водной суспензии.

Создание баз данных фотохимических свойств аналогов бактериородопсина (АБР)

На основе результатов собственных исследований и литературных данных нами создана база данных 1 («Свойства АБР с модифицированным хромофором»), суммирующая сведения о способности апобелка бактериородопсина (БО) к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с различными полиеновыми соединениями и об их фотохимических свойствах. Она включает перечисленные ниже структурные, спектральные и фотохимические параметры, а также другие сведения о продуктах взаимодействия более 350 полиеновых соединений с апобелком БО. Основными дескрипторами являются: структура конкретного тестируемого изомера полиенового соединения; максимум поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$): исходного соединения, моделей (оснований Шиффа с *n*-бутиламином в определенном органическом растворителе, в непротонированной и протонированной формах), нековалентного комплекса с апобелком, пигмента (адаптированных к свету и

темноте форм); наличие и тип фотоцикла; эффективность протонного транспорта; изомерный состав хромофора (соотношение *all-E*- и *13Z*-изомеров); «опсиновый» сдвиг; устойчивость продуктов взаимодействия к гидроксил-амину и *all-E*-ретиналю и прочие дополнительные данные.

Замена природного ретиналя его аналогами – один из основных и наиболее перспективных подходов к изучению хромофорного центра БР. Эта процедура позволяет варьировать как максимум поглощения основного состояния пигмента в широких пределах (412-830 нм, причем для пигментов с $\lambda_{\text{макс}}$ в интервале 460-625 нм показано наличие фотоцикла), так и другие важные фотохимические параметры (квантовый выход, скорость распада М-интермедиата, эффективность протонного транспорта и др.). Проведенные нами критический анализ и экспертная оценка позволят в будущем в рамках определенных серий модификаций хромофора осуществлять прогнозирование фотохимических параметров (особенно $\lambda_{\text{макс}}$ для новых пигментов на основе $\lambda_{\text{макс}}$ исходных полиеналяей) и их структурных особенностей.

Дополнительные изменения фотохимических свойств БР могут быть достигнуты путем использования ряда подходов:

1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы БР методами сайт-специфического мутагенеза или генетической инженерии;

2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги;

3) использованием физических воздействий различного рода (низких температур, электрических полей, изменение уровня влажности, pH и др.);

4) сочетанием нескольких перечисленных выше методов.

За прошедшее время был накоплен большой массив информации о свойствах около 150 мутантов БР с единичными и множественными заменами аминокислот. Однако полученные результаты до сих пор не были систематизированы. По этой причине было необходимо провести сравнительный анализ опубликованных в литературе сведений по влиянию точечных замен аминокислотных остатков в молекуле БР на его свойства. Такой анализ позволил выделить области структуры белка, в которых замена аминокислотных остатков вызывает значительные изменения важнейших характеристик БР.

В базе данных 2 («Свойства мутантов БР») нами собраны опубликованные в литературе данные по влиянию точечных мутаций на следующие свойства и параметры мутантов БР: $\lambda_{\text{макс}}$ пигмента, наличие и тип световой адаптации, наличие и тип фотоцикла и эффективность протонного транспорта. Анализ этих

данных позволил выявить мутации, которые значительно изменяют свойства БР:

а) были выявлены те мутации, которые изменяют $\lambda_{\text{макс}}$ пигмента более чем на 10 нм. При выборе этого значения было учтено то, что в области 570 нм БР имеет достаточно широкую полосу поглощения (с полушириной около 70 нм), в связи с этим точность определения положения максимума поглощения составляет ~1-2 нм. Кроме того, следует отметить, что $\lambda_{\text{макс}}$ пигмента изменяется почти при всех заменах аминокислот в результате небольших изменений, вносимых ими в третичную структуру белка. В связи с этим, для отбора достаточно узкого ряда аминокислотных остатков, оказывающих наиболее сильное влияние на положение максимума поглощения БР, и принято значение 10 нм.

б) учитывая, что при световой адаптации дикого штамма БР сдвиг максимума поглощения составляет 10 нм, для анализа было принято считать, что световая адаптация не нарушена, если сдвиг максимума поглощения происходит более чем на 7 нм;

в) выявлены аминокислотные остатки, снижающие эффективность транспорта протонов как минимум на один порядок;

г) представлена выборка тех аминокислотных остатков, замена которых изменяет кинетику образования и распада М-интермедиата более чем в 5 раз (т. е. если среднее время соответствующего процесса изменяется по крайней мере в 5 раз).

Моделирование пространственных ограничений хромофорной полости бактериородопсина (БР)

В последние годы были достигнуты впечатляющие успехи в кристаллографических исследованиях молекулы БР (файл 1C3W.pdb с разрешением 1.55 Å из Brookhaven Protein Data bank), и на основании полученных данных была предложена модель части канала светозависимого переноса протона через пурпурную мембрану [73]. Хромофорная группа расположена в полости, формируемой боковыми радикалами аминокислотных остатков ряда трансмембранных α -спиральных тяжей, и разделяет канал передачи протона на две части: цитоплазматическую и внеклеточную. Донором и акцептором протона служат карбоксильные остатки Asp96 и Asp85. С цитоплазматической стороны клеточной мембраны канал формируется двумя молекулами воды (H_2O^{501} , H_2O^{502}) и следующими аминокислотными остатками: (Asp96-COOH --- OH-Thr46); (Thr46-C=O --- H_2O^{502} --- O=C-Lys 216); (Ala215-C=O --- H_2O^{501} --- HN(индол)-Trp 182). С внешней стороны протонного канала в трехмерной цепи межмолекулярных водородных связей участвуют семь молекул воды ($\text{H}_2\text{O}^{401-407}$),

Asp85, Asp212, Thr89, Tyr185, Tyr57, Arg82, Glu194, Glu204 и Ser193.

Нами было проведено исследование топографии хромофорной полости БР с помощью пакета HyperChem v. 8.0 (HyperCub, США). Оценка производилась по пяти реперным точкам: C₁- и C₄-атомы триметилциклогексенового кольца, C₁₉- и C₂₀-атомы метильных групп полиеновой цепи и N^ε-атом основания Шиффа Lys216 хромофорной группы БР. Анализ данных показывает, что близлежащие к триметилциклогексеновому кольцу аминокислотные остатки расположены на α -спиральных тяжях С, D и Е. В районе триметилциклогексенового кольца хромофорную полость формируют следующие остатки аминокислот: Pro186, Ser141, Trp189, Trp138, Tyr185, Trp86, Tyr83, Thr142, Met118. Минимальное расстояние от атомов кислорода гидроксильных групп остатков Ser141, Thr142 до C₄-атома хромофора R составляет 3.14-3.50 Å. Результаты, полученные ранее в нашей лаборатории, позволяют утверждать, что различные типы модификации триметилциклогексенового кольца хромофорной группы БР (замена его циклами различной природы и размера или его удаление) не препятствуют образованию искусственных пигментов из БО и аналогов ретиналя такого рода. Этот факт подтверждают проведенные нами компьютерные оценки размеров хромофорной полости БР в районе триметилциклогексенового кольца (7.5-10 Å).

С другой стороны, в области полиеновой цепи и альдиминной связи белковое микроокружение накладывает жесткие стерические ограничения на структуру хромофора. Ранее нами было показано, что даже небольшое различие между двумя группами структур аналогов (1.5-2 Å) является критическим для образования искусственных пигментов из БО с 10,12-этан- и 10,12-пропаноретиналем, а также БО с 20,14-этан- и 20,14-пропаноретиналем, соответственно [12].

С помощью программы HyperChem, v. 8.0 проведены моделирование и компьютерные расчеты целевых структур молекул ряда полиенов и их предшественников, поиск конформации с минимальной энергией. Оценка относительных размеров производилась путем суперпозиции нескольких структур с учетом максимального перекрытия по нескольким реперным точкам.

Оптимизация лабораторной технологии культивирования и выделения мембранных препаратов БР из различных штаммов *H. salinarum* (ET1001, D96N, JW-5)

Нами были проведены исследования по оптимизации методов культивирования и выделения биомассы культуры галофильного микроорганизма

H. salinarum (штаммы ET1001, JW5, D96N).

Отбор штаммов *H. salinarum*, использованных для получения АБР, проводился на основании следующих требований, обусловленных технологической направленностью исследования: 1) простота выделения препаратов БР, не содержащих каротиноидов, поскольку их примеси мешают определению спектральных характеристик препаратов БР; 2) возможность уменьшения числа стадий процесса получения аналогов БР, поскольку необходимо было получить препаративные количества аналогов БР (~100 мг и более); 3) значительно замедленная кинетика релаксации М-интермедиата фотоцикла. В результате, с учетом приведенных выше ограничений, из набора доступных штам-

мов было выбрано три: ET1001, JW5 и D96N. Краткие характеристики этих штаммов, а также штамма 353П, использовавшегося ранее, приведены в табл. 2.

Для выбранных штаммов *H. salinarum* (ET1001, JW5, D96N) были подобраны условия культивирования (температура, освещенность, аэрация, время культивирования), позволяющие получать БР с высоким выходом. Выход БР с 1 л культуры составил около 45 мг для штаммов ET1001 и D96N и 13-15 мг для штамма JW5, тогда как по литературным данным наилучший выход составляет 40-50 мг с 1 л культуры. Нарботаны партии мембранных препаратов БР в препаративных количествах (до 10 г).

Таблица 2. Характеристика штаммов *H. salinarum*.

Штамм	Бактериоопсин	Ретиналь	Каротиноиды	Скорость релаксации М-интермедиата фотоцикла БР
353П	++	+	++	Быстрая
ET1001	++	+	±	Быстрая
JW5	+	—	—	БР не синтезируется
D96N	++	+	±	Медленная

«++» – повышенное содержание; «+» – стандартный уровень штаммов дикого типа;

«±» – пониженное содержание; «—» – не синтезируется.

Нами был проведен поиск условий для наиболее эффективного получения препаратов пурпурных мембран (ПМ), используемых для дальнейшего исследования. Хотя методы культивирования *H. salinarum* и получения ПМ достаточно подробно описаны в литературе, нам пришлось «адаптировать» их к реальным

экспериментальным условиям. В результате этой части экспериментов было сделано несколько промежуточных наблюдений и выводов, позволивших в итоге получить препараты ПМ с достаточно высоким выходом (до 50 мг/л культуры) (рис. 3, табл. 3).

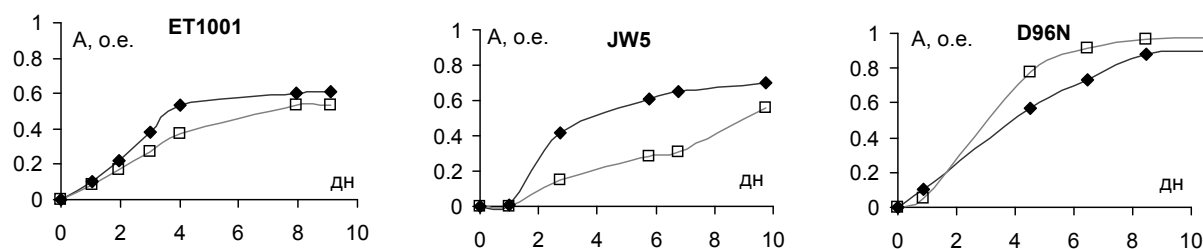


Рис. 3. Сравнение кривых роста *H. salinarum* штаммов ET1001 (37°C), JW5 (37°C), D96N (34°C).

Обозначения: ♦ – оптическая плотность культуры при 650 нм, □ – накопление БР по оптической плотности супернатанта лизированных клеток при 570 нм.

Таблица 3. Условия культивирования *H. salinarum* (скорость аэрации 0.45 (л воздуха)/(л среды)/мин).

Штамм	t, °C	Время, сут	Выход с 1 л культуры	
			биомасса, г	БР, мг
ET1001	37	8	5	45
JW5	37	10	3.2	13 (15*)
D96N	34	10	5.5	47

*При культивировании добавляли 3,4-дидегидроретиналь.

Обесцвечивание пурпурных мембран осуществляли в соответствии со стандартной методикой: суспензию мембран с концентрацией белка около 0.5 мг/мл в 1 М растворе гидроксилamina, pH 7.0, при температуре 7-12°C освещали светом 2-х галогеновых ламп мощностью по 500 Вт, пропущенным через тепловой фильтр (0.2% водный раствор сульфата меди, в круглодонной колбе объемом 1 л), который одновременно обеспечивает фокусировку луча света на ячейке, содержащей суспензию мембран. Прохождение процесса контролировали

по уменьшению оптической плотности при 563 нм. В зависимости от концентрации белка время обесцвечивания составляло от 17 до 26 ч. Несмотря на то, что у БР_{D96N} фотоцикл значительно замедлен, время его обесцвечивания практически не отличается от БР с природной аминокислотной последовательностью.

Концентрацию «активного» БО в составе апомембран определяли по поглощению при 568 нм после регенерации действием 1.5-го

избытка *all-E*-ретинаяля.

Показано, что приготовленные в данных условиях препараты апомембран обладали достаточно воспроизводимыми характеристиками. Так, степень встраивания ретинаяля была практически одинакова для апомембран в независимых экспериментах, однако сам процесс происходил медленнее, если увеличивалось время обесцвечивания ПМ (рис. 4).

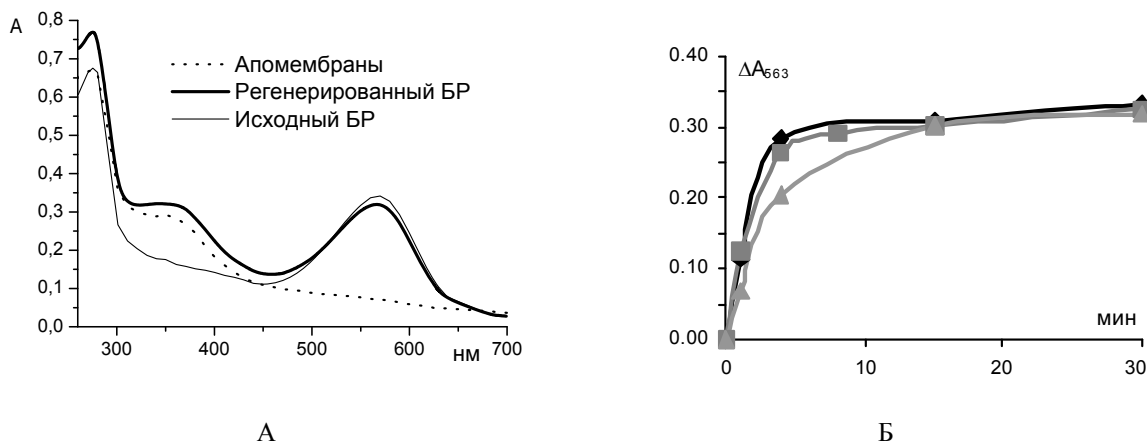


Рис. 4. Реконструкция бактериородопсина. Спектры нормализованы по белковой полосе поглощения препаратов мембран до добавления ретинаяля. А) Спектры препаратов. Б) Кривые встраивания *all-E*-ретинаяля в апомембраны D96N, время обесцвечивания при получении апомембран составляет: ♦ – 17 ч, ■ – 21 ч, ▲ – 26 ч.

Дизайн целевых структур молекул и разработка методов синтеза аналогов ретинаяля

В течение последних 25 лет на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова развернуты систематические исследования в области нанобиофотоники, объектом которых являются новые гибридные материалы (ГАБР), получаемые на основе функционализированных молекул ретиноидов, содержащих определенного типа репортерные группы (изотопные, электроно-плотные [18, 19], флуоресцентные, ионофорные [17, 18, 24–37, 45, 48, 61] и фотохромные метки [30, 36, 38–41, 43, 47, 49–58, 61, 62–68]), и их комплексов с бионамишенью – апобелком бактериородопсином (БО) (схема 1).

В ходе цикла проделанных работ были разработаны новые эффективные методы получения ретиноидов различного строения, а также изучено влияние элементов их структуры на функционирование некоторых ретиноид-белковых комплексов (БР и ядерных рецепторов ретиноевой кислоты). Основные направления модификации структуры молекулы ретинаяля представлены на рис. 5. Изменения структуры молекулы ретиноида затрагивали: 1) конфигурацию двойных связей; 2) триметилциклогексеновое кольцо, включая его замену на аромати-

ческое; 3) введение заместителей при C(13)-атоме; 4) удлинение полиеновой цепи на два и пять атомов углерода; 5) закрепление *E*- или *Z*-конфигурации путем введения в полиеновую цепь циклов различной природы и размеров; 6) введение тройной связи в C(11)-C(12) положение; 7) введение в различные положения молекулы репортерных групп различной природы (спиновые, флуоресцентные, изотопные, электроно-плотные метки).

Все известные синтетические методы могут быть условно разделены на две группы:

а) стереоселективный синтез определенных изомеров ретиноидов;
б) синтез наиболее доступного из изомеров или их смеси с последующей фото- или термоизомеризацией и выделением требуемого изомера из реакционной смеси при помощи препаративной ВЭЖХ.

Основные методологические подходы и приемы дизайна и синтеза различных аналогов ретинаяля ранее были достаточно подробно освещены в обзорах [2, 12] и ряде последующих публикаций [18, 22, 34, 43, 45, 54–56, 74]. Поэтому в рамках настоящего обзора мы ограничимся лишь кратким описанием и критическим анализом использованных методов и схем получения аналогов ретинаяля, разработанных впервые на кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ, а также анализом

полученных результатов по изучению свойств ГАБР. Таким образом, в настоящем обзоре мы представляем наши результаты цикла работ по изучению спектральных, ионофорных или фотохромных свойств нескольких серий гибридных ретиноидных молекул, у которых триметилцик-

логексеновое кольцо природного ретиноида заменено на сенсорное (краун-эфир) или фотохромное звено и находится в сопряжении с формильной группой через линкер – систему C=C-двойных связей (полиеновую цепь) различной длины.

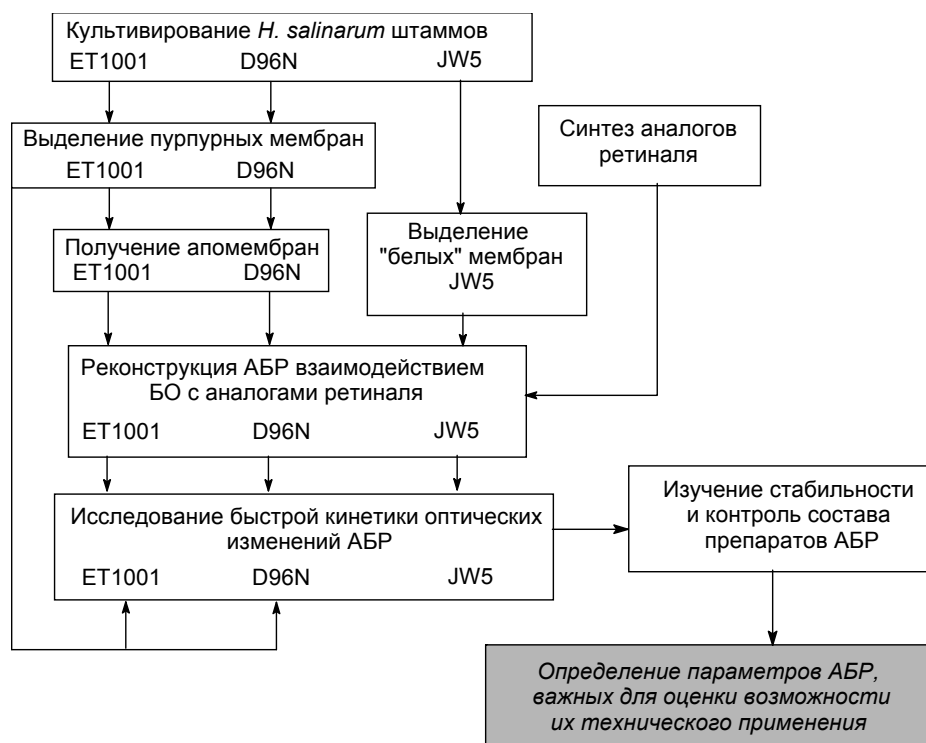


Схема 1. Технологическая платформа создания новых материалов (ГАБР) для нанобиофотоники.

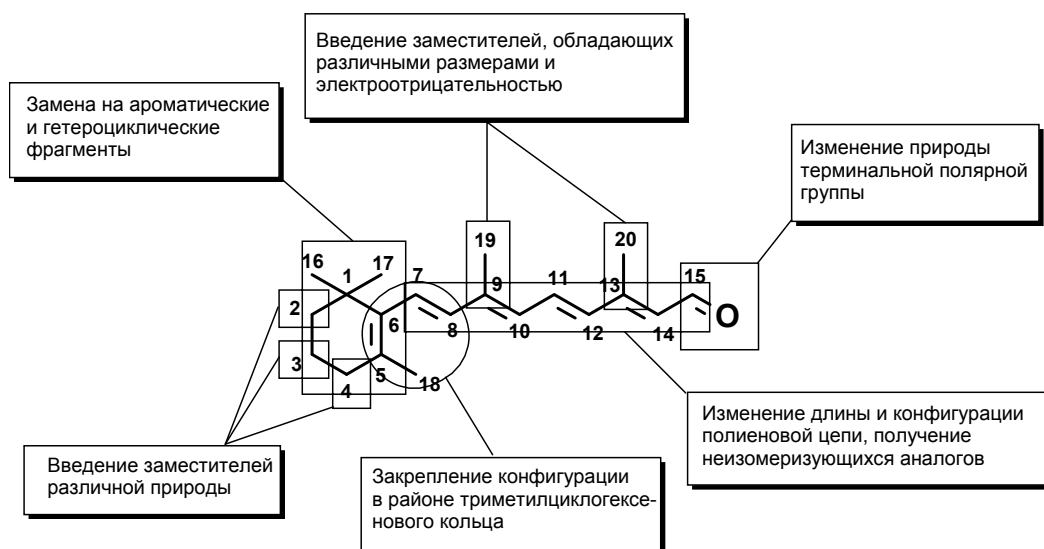


Рис. 5. Основные направления модификации структуры ретиналя.

В качестве соответствующих ионофорных фрагментов мы использовали 4 серии монобензопроизводных краун-эфиров и их дитиа-аналогов, различающихся размерами макрогетероцикла – серии **CR I-Va-d** [17, 18, 24–37, 45, 48, 61]. Для определения влияния структуры макрогетероцикла на спектральные свойства полиеналей нами был также осуществлен синтез модельных репер-

ных соединений **CR I-Ve**, содержащих 3,4-диметоксифенильное кольцо вместо макрогетероцикла.

Были синтезированы две серии фотохромных соединений в ряду спиропиранов **SPR I-V** и **SPRN I-V**, различающихся местом введения полиенового фрагмента в фотохромное звено. Нами был разработан и осуществлен синтез соответствующих производных, име-

ющих полиеновую цепь различной длины либо в 6'-положении пиранового кольца (**SPR I-V**) [30, 39, 40, 43, 47, 49, 51–54, 57, 58, 62, 68, 71], либо по C₅-атому индолинового фрагмента молекулы (**SPRN I-V**) [49, 51–53, 55, 57, 58, 61,

62, 68, 71]. Также нами был разработан метод получения еще одной серии фотохромных ретиноидов на основе производных дитиенил-этинов (**DTE I-V**) [38–40, 50–53, 56–58, 61, 62, 68, 71]. (Схема 2).

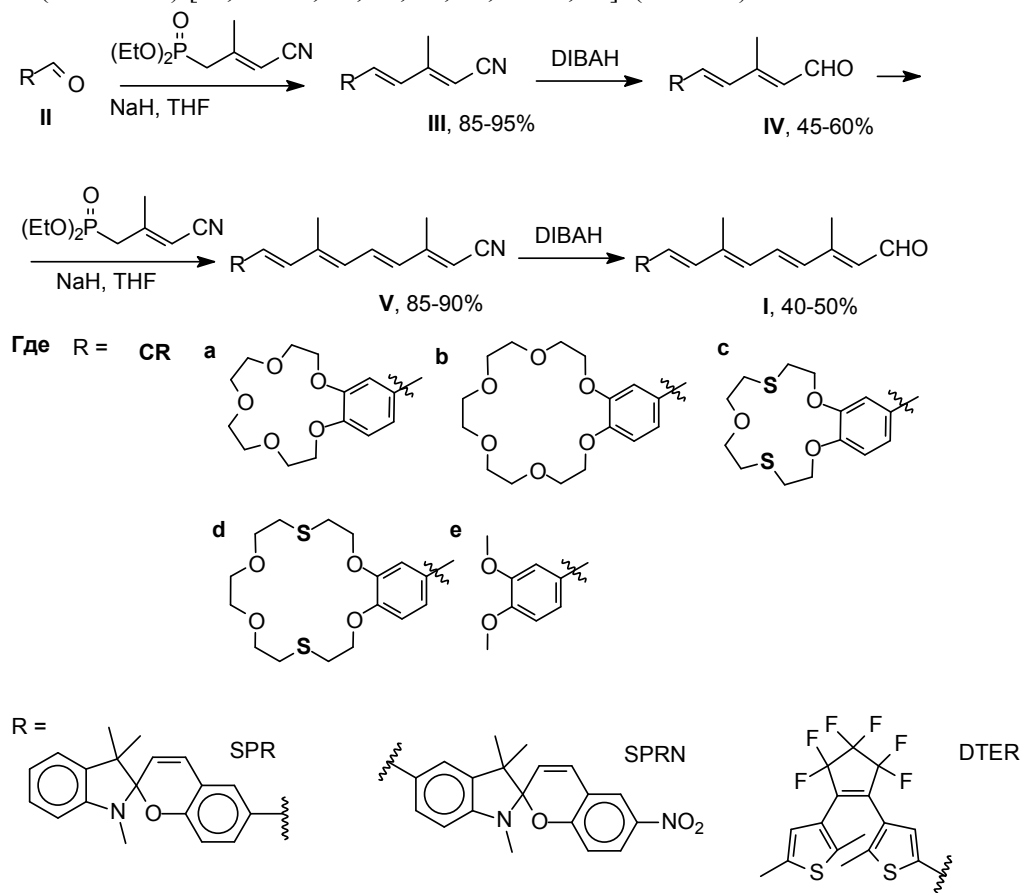


Схема 2.

Для получения вышеупомянутых серий ионофорных и фотохромных производных ретиноидов нами было с успехом использована универсальная синтетическая последовательность, изображенная на схеме 2, ключевой стадией которой является реакция олефинирования по Хорнеру–Эммонсу соответствующих карбонильных предшественников анионом C₅-фосфонатного реагента, содержащего терминальную нитрильную группу. Последующая стадия восстановления полиеновых нитрилов при помощи диизобутилалюмогидрида при –100°C давала нам промежуточные или целевые гибридные полиенали, содержащие разное количество кратных связей в цепи сопряжения.

Основным направлением последующих исследований было изучение спектральных свойств и комплексообразования ионофоров, а также фотохромного поведения и спектрально-кинетических характеристик фотохромных гибридов ретиноидов.

Спектральные свойства аналогов ретинала Комплексообразование краун-содержащих гибридов ретиноидов CR I-Va-d с катионами металлов

Процесс комплексообразования соединений **CR I-Va-d** в растворе ацетонитрила с катионами различных металлов (схема 3) изучался спектрофотометрическим методом.

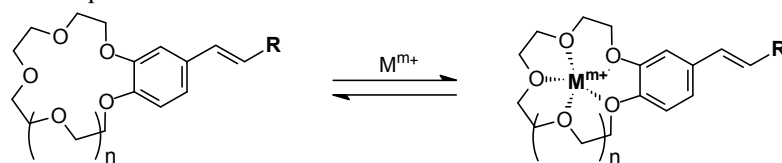


Схема 3.

В электронных спектрах всех исследуемых соединений присутствуют две группы полос поглощения – одна в области 290-450 нм

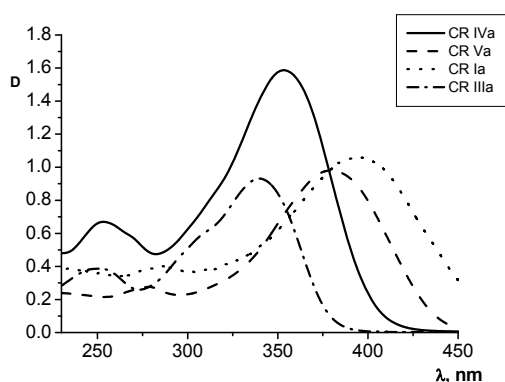
(длинноволновая полоса поглощения), обусловленная поглощением всего хромофора, вторая в коротковолновой области спектра (<240 нм), за

которую ответственны изолированные бензо-краун-эфирный или 3,4-диметоксифенильный фрагменты. Спектры поглощения исследуемых краун-соединений с одинаковыми типами терминальных групп, но с различным размером краун-цикла практически совпадают со спектрами соединений сравнения с диметоксифенильным фрагментом.

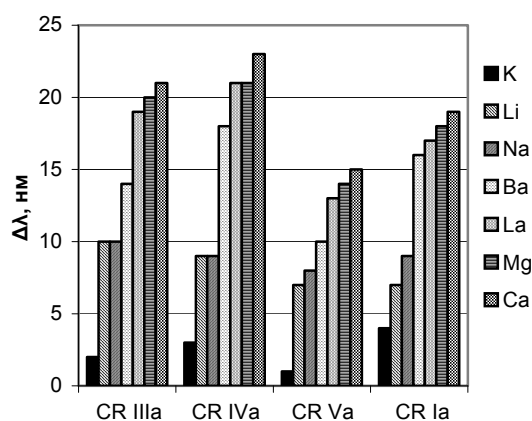
Природа терминальной группы оказывает влияние на положение $\lambda_{\text{макс}}$ длинноволновой полосы поглощения винилогов краун-эфиров в соответствии с ее акцепторными свойствами. Так, положение $\lambda_{\text{макс}}$ в спектрах поглощения альдегидов оказываются сдвинутыми bathochromно, примерно на 9 и 17 нм по мере увеличения цепи, по сравнению со спектрами поглощения соединений с CN- и COOEt-концевыми группами с одинаковой длиной цепи сопряжения (рис. 6, 7). По мере удлинения цепи сопряжения в ряду соединений с CN- и COOEt-

группами в среднем наблюдается увеличение $\lambda_{\text{макс}}$ на 19 и 40 нм соответственно.

Добавление к растворам краун-эфиров **CR I,III-Va,b** перхлоратов различных металлов приводит, в отличие от модельных соединений **CR I,III-Ve**, к изменениям электронных спектров поглощения. Например, на рис. 6, 7, 8А и в табл. 4 представлены параметры спектров поглощения соединений в присутствии различных катионов металлов. Видно, что при взаимодействии краун-эфира с ионами металлов перераспределяются интенсивности и сдвигаются максимумы длинноволновых полос поглощения. Очевидно, что наблюдаемые изменения обусловлены взаимодействием между краун-эфирным фрагментом молекулы и ионом металла (см. схему 3). Ионы металлов оказывают качественно одинаковое влияние на исследуемые краун-соединения, приводя к гипсохромному сдвигу длинноволновых полос поглощения.

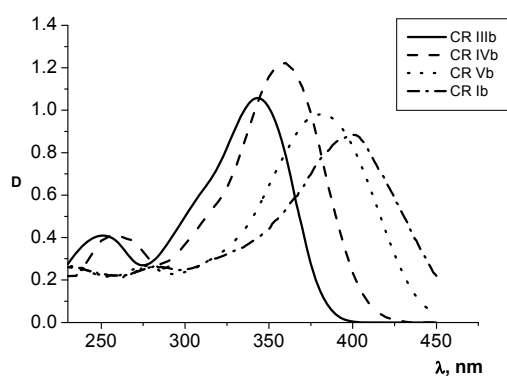


А

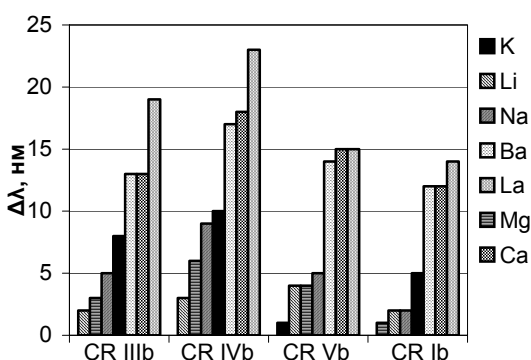


Б

Рис. 6. Спектры поглощения соединений **CR I,III-Va** в MeCN (А) и относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос $\Delta\lambda_{\text{макс}}$ ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$) (Б) при введении в растворы солей металлов ($c_{\text{M}}/c_{\text{L}} = 1000$).



А



Б

Рис. 7. Спектры поглощения соединений **CR I,III-Vb** в MeCN (А) и относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос $\Delta\lambda_{\text{макс}}$ ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$) (Б) при введении в растворы солей металлов ($c_{\text{M}}/c_{\text{L}} = 1000$).

Величина сдвига максимумов полос поглощения соединений **CR I,III-Va,b** при комплексообразовании зависит как от размера макроцикла, так и от размера и заряда катиона

металла. Значение $\Delta\lambda_{\text{макс}}$ для производных 15-краун-5-эфиров **CR I,III-Va** уменьшалось в ряду $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{La}^{3+} > \text{Na}^{+} > \text{Li}^{+} > \text{K}^{+}$, а для аналогов 18-краун-6 **CR I,III-Vb** – в ряду

$\text{La}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^{+}$ (рис. 6, 7, 8А и табл. 4). Наблюдаемый при комплексообразовании гипсохромный сдвиг полос поглощения обусловлен влиянием катиона металла на распределение π -электронной плотности в цепи сопряжения молекул ионофоров **CR I,III-Va,b**. В отличие от кислородсодержащих краун-соединений, лиганды **CR I,III-Vc,d**, содержащие в составе макроцикла атомы серы, не свя-

зывали катионы щелочных и щелочноземельных металлов, поскольку дитиакраун-эфирные фрагменты практически не способны связывать ионы, обладающие низким сродством к серусодержащим лигандам. В то же время, при добавлении нитратов или перхлоратов серебра(I), ртути и свинца(II) наблюдаются гипсохромные сдвиги длинноволновых полос поглощения, обусловленные образованием комплексов (рис. 8, табл. 5).

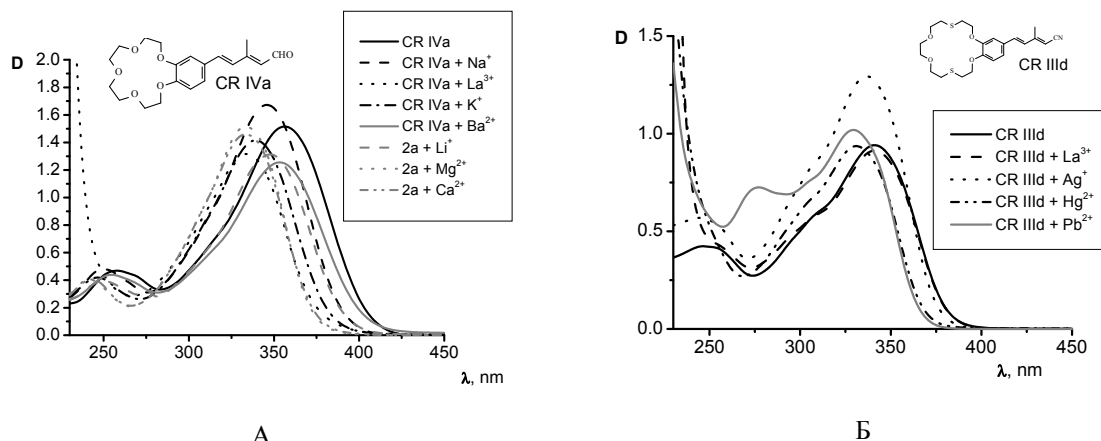


Рис. 8. Спектры поглощения соединений **CR IVa** (А) и **CR IIIId** (Б) в MeCN без и в присутствии в растворах перхлоратов металлов ($c_M/c_L = 1000$).

Таблица 4. Относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос поглощения соединений **CR I,III-Va,b** $\Delta\lambda_{\text{макс}}$ ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_L$) в MeCN при введении в растворы солей металлов ($c_M/c_L = 1000$).

Соединение	$\lambda_{\text{макс, нм}} (\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_L)$							
	Без металла	Li^{+}	K^{+}	Na^{+}	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Ca^{2+}	La^{3+}
CR IIIa	340	330 (-10)	338 (-2)	330 (-10)	320 (-20)	326 (-14)	319 (-21)	321 (-19)
CR IVa	356	347 (-9)	353 (-3)	346 (-9)	335 (-21)	338 (-18)	333 (-23)	335 (-21)
CR Va	383	376 (-7)	382 (-1)	375 (-8)	369 (-14)	370 (-13)	368 (-15)	373 (-10)
CR Ia	400	393 (-7)	396 (-4)	391 (-9)	381 (-19)	383 (-17)	382 (-18)	384 (-16)
CR IIIb	342	340 (-2)	335 (-8)	337 (-5)	339 (-3)	329 (-13)	329 (-13)	323 (-19)
CR IVb	359	356 (-3)	349 (-10)	350 (-9)	353 (-6)	342 (-17)	341 (-18)	336 (-23)
CR Vb	387	383 (-4)	386 (-1)	382 (-5)	383 (-4)	373 (-14)	372 (-15)	372 (-15)
CR Ib	400	398 (-2)	395 (-5)	398 (-2)	399 (-1)	388 (-12)	388 (-12)	386 (-14)

Таким образом, было установлено, что образование комплексов с катионами металлов наблюдается только для краунсодержащих соединений и сопровождается изменениями в электронных спектрах поглощения. Это открывает

хорошую перспективу для применения синтезированного набора краун-соединений в качестве аналитических компонентов оптических сенсоров, ион-селективных электродов и фотоуправляемых супрамолекулярных ансамблей.

Таблица 5. Относительное изменение положения максимумов длинноволновых полос поглощения соединений **CR I,III-Vc,d** $\Delta\lambda_{\text{макс}}$ ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$) в MeCN при введении в растворы солей металлов ($c_{\text{M}}/c_{\text{L}} = 1000$).

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$ ($\Delta\lambda_{\text{макс}} = \lambda_{\text{ML}} - \lambda_{\text{L}}$)				
	Без металла	Ag^+	Hg^{2+}	Pb^{2+}	La^{3+}
CR IIIc	339	336 (-3)	329 (-10)	325 (-14)	340 (-1)
CR IVc	354	349 (-5)	341 (-13)	338 (-16)	353 (-1)
CR Vc	379	375 (-4)	372 (-7)	370 (-9)	379 (0)
CR Ic	396	389 (-7)	388 (-8)	384 (-12)	396 (0)
CR III d	341	336 (-5)	331 (-10)	330 (-11)	341 (0)
CR IV d	359	352 (-7)	346 (-13)	342 (-17)	357 (-2)
CR V d	379	375 (-4)	373 (-6)	371 (-8)	379 (-1)
CR Id	396	393 (-3)	388 (-8)	386 (-10)	396 (0)

Спектральные свойства и кинетические характеристики фотохромных аналогов ретиналя

Одним из актуальных направлений исследований в современной нанобиофотонике является изучение механизмов зрительной рецепции и структурно-функциональных взаимоотношений в молекулах ретиналь-содержащих белков путем создания модельных систем, имитирующих одну из особенностей строения центра связывания хромофора, и детальное комплексное изучение и анализ их свойств [2, 12, 61, 71]. Нами впервые были получены новые модельные фоточувствительные системы – 3 серии соединений на основе гибридов молекул ретиноидов и фотохромов из классов спиропиранов и дитиенилэтенон. Окончательный дизайн молекул целевых аналогов ретиналя был сделан на основе анализа результатов компьютерного моделирования топографии хро-

морной полости БР (файл PDB – 1C3W) в программах HyperChem 8.03 и Ligand-Protein Contacts (LPC) [75] и сопоставления с ними размеров выбранных структур полиеналя (**SPR I-V**, **SPRN I-V**, **DTE I-V**). В связи с чем нами были отработаны методы получения (см. схему 2) и проведено изучение спектрального поведения новых моделей фоточувствительных систем, различающихся местом введения полиенового фрагмента в фотохромное звено.

Фотохромные реакции в ряду спиропиранов и диарилэтенон представлены на схемах 4, 5. Надо отметить, что у последних отсутствует самопроизвольная термохимическая реакция обесцвечивания фотоиндуцированной формы, что делает фотохромы этого класса наиболее перспективными кандидатами для создания на их основе прототипов различных технических устройств, в частности, оптической памяти большой емкости.

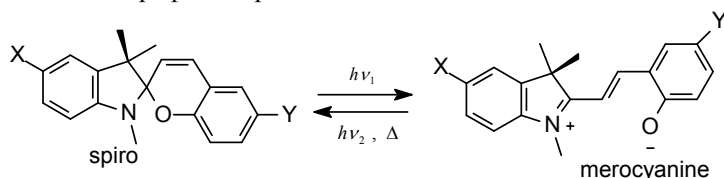


Схема 4.

Проведенные эксперименты показали, что у серии соединений **SPR I-V**, содержащих полиеновую цепь в 6'-положении пиранового кольца, с увеличением длины полиеновой цепи наблюдается процесс очень быстрой темновой терморелаксации, и времена жизни мероцианиновых фотоиндуцированных форм очень малы и могут быть зафиксированы только с помощью импульсной спектроскопии в микро-

секундном диапазоне.

В то же время для соединений серии **SPRN I-V**, имеющих сильный акцепторный заместитель – нитрогруппу в 6'-положении пиранового кольца, наблюдается стабилизация времени жизни фотоиндуцированных форм, и поэтому регистрацию спектров поглощения и спектрально-кинетические исследования процессов фотоокрашивания и спонтанного обесцвечива-

ния проводили при помощи спектрофотометра Ocean Optics, модель HR-2000+, в кварцевых кюветах толщиной 10 мм, путем облучения растворов светом лампы LC4 (Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2 при перемешивании содержимого образца на магнитной мешалке. Результаты спектрально-кинетического исследования синтезированных моделей фоточувствительных систем на основе спиропиранов серий **SPR I-V** в метаноле и **SPRN I-V** в толуоле и в этаноле представлены на рис. 9–11 и в табл. 6.

В результате спектрально-кинетического исследования фотопревращений ряда новых полиеновых 6'-нитрозамещенных индолиновых спиропиранов **SPRN I,III-V** выявлен ряд особенностей их спектральных свойств и фотохромизма по сравнению с исходным формиль-

ным производным спиропирана **SPRN II**. Показана возможность регулирования спектральных характеристик спиропирановой формы путем изменения природы и длины полиеновых заместителей.

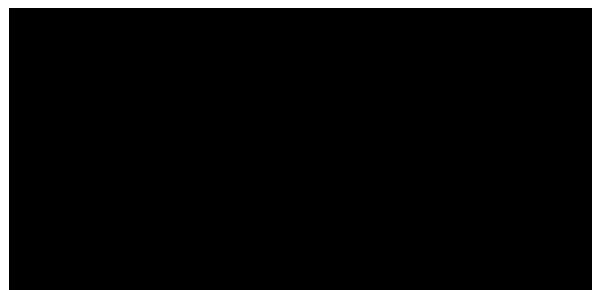


Рис. 9. Спектры поглощения спироформ соединений серии **SPR I-V** в MeOH, 25°C.

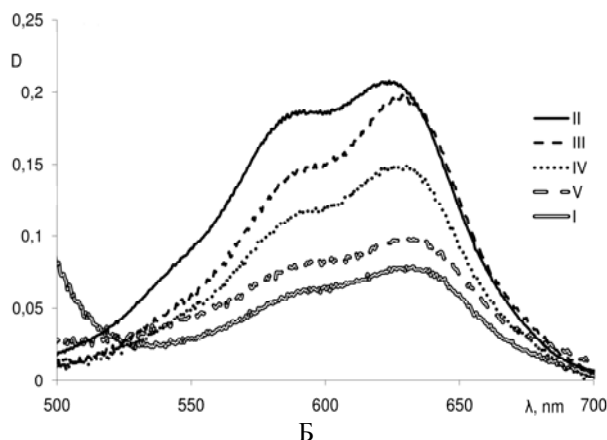
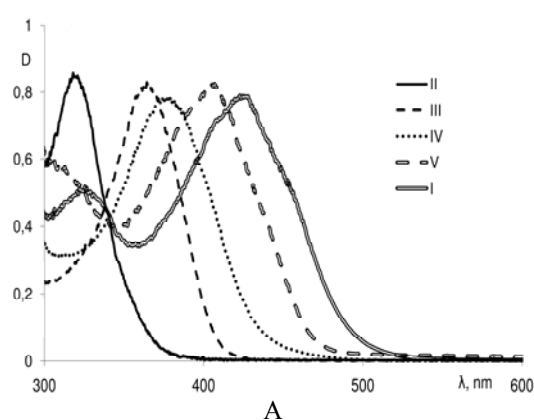


Рис. 10. Спектры поглощения спиропиранов серии **SPRN I-V** ($C 10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$ М) в толуоле до (А) и после освещения УФ-светом (Б).

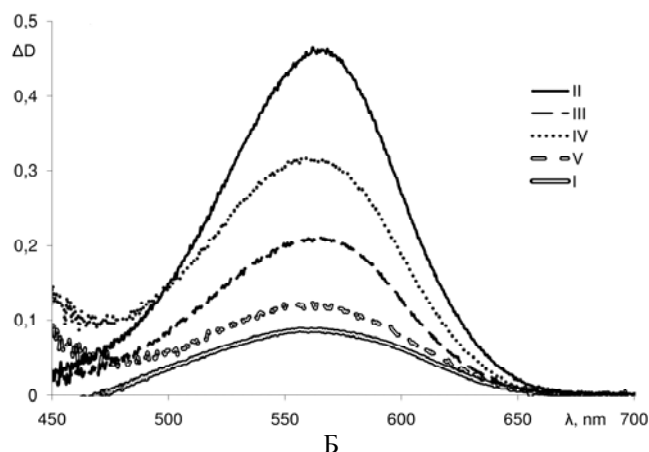
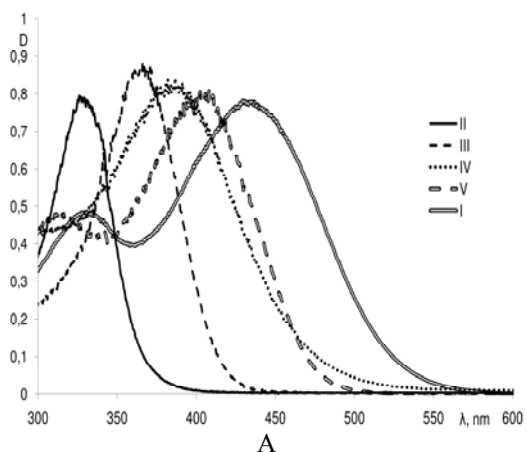


Рис. 11. Спектры поглощения спиропиранов серии **SPRN I-V** ($C 10^{-5} \div 5 \times 10^{-5}$ М) в этаноле до (А) и после освещения УФ-светом (Б).

Исходя из наблюдаемых спектральных различий предполагается, что в слабо полярном толуоле, в отличие от полярного этанола, возможно фотоиндуцированное образование агрегатов мероцианиновой формы. Обнаружено снижение эффективности фотохромных превращений и скорости темновой циклизации фото-

индуцированной мероцианиновой формы с увеличением длины полиенового заместителя при одновременном повышении устойчивости фотохромных спиропиранов к фотодеградации в полярном растворителе по сравнению с растворами в толуоле.

Таблица 6. Спектрально-кинетические характеристики производных спиропиранов **SPRN I-V** в растворах в толуоле (А) и в этаноле (Б).

Соединение	Растворитель	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{A}}$, нм	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{B}}$, нм	$\Delta D_{\text{B}}^{\text{фот}}$	$k_{\text{BA}}^{\text{то}}$, с ⁻¹	$t_{1/2}$, с
SPRN II	A	320	590 пл., 625	1.19	0.139	31
	B	328	567	0.77	0.069	44
SPRN III	A	365	590 пл., 630	0.55	0.035	38
	B	365	567	0.27	0.0065	**
SPRN IV	A	377	590 пл., 630	0.45	0.039	35
	B	385	563	0.30	0.0036	**
SPRN V	A	407	590 пл., 630	0.16	0.033	70
	B	405	567	0.099	0.0021	**
SPRN I	A	425	590 пл., 630	0.08	0.031	90
	B	330, 433	563	0.104	0.0016	**

Обозначения: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{A}}$ и $\lambda_{\text{макс}}^{\text{B}}$ – максимумы полос поглощения исходной и фотоиндуцированной форм, соответственно; $\Delta D_{\text{B}}^{\text{фот}}$ – максимальное фотоиндуцированное изменение оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы в состоянии фоторавновесия при одинаковой величине оптической плотности ($D = 0.8$) в максимуме полосы поглощения исходной формы; $k_{\text{BA}}^{\text{то}}$ – константа скорости реакции темнового обесцвечивания; $t_{1/2}$ – время, за которое максимальная величина фотоиндуцированной оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы снижается в 2 раза при непрерывном облучении нефилтрованным светом лампы Hamamatsu LC4. (**) – не наблюдалось за стандартное время опыта 10 мин.

Из литературных данных известно, что дитиенилэтены в отличие от спиропиранов являются термически необратимыми фотохромными соединениями, испытывающими только фотоиндуцированные взаимные превращения открытой (бесцветной) и циклизованной (окрашенной) форм (схема 5).

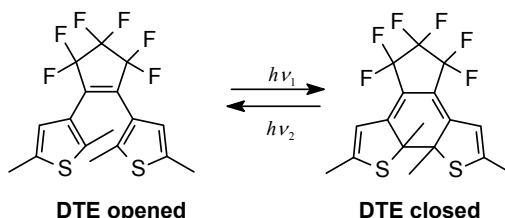


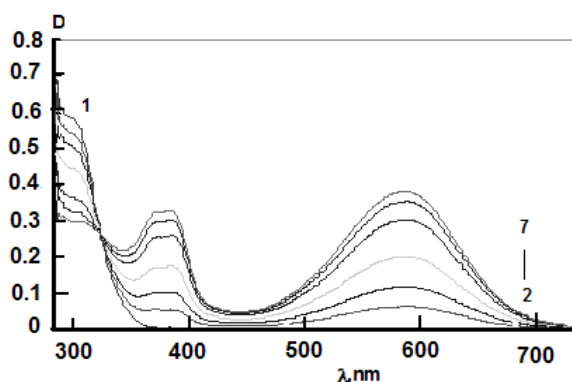
Схема 5.

Результаты спектрально-кинетического исследования синтезированных моделей хромофорных центров на основе дитиенилэтенов **DTE I-V** представлены на рис. 12–14 и в табл. 7. Для сравнения использовались спектрально-кинетические данные, полученные для соединения моноформильного производного **DTE II**, использованного в качестве исходного реагента в синтезе. На рис. 12 представлены спектры поглощения открытой (рис. 12, *кр. 1*) и циклической (*кр. 2–7*) форм этого соединения в процессе непрерывного облучения УФ-светом

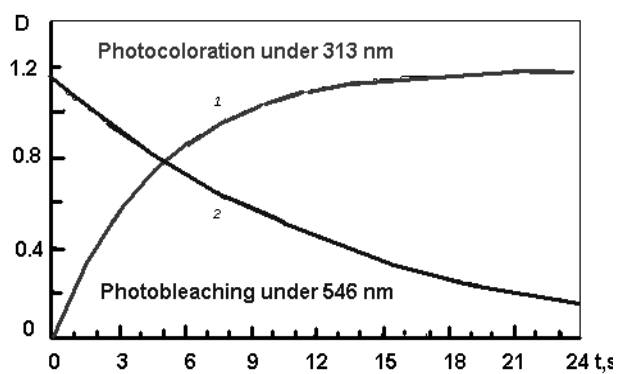
Процесс фотоокрашивания этих соединений осуществляется под действием УФ-излучения, поглощаемого открытой формой. Для фотообесцвечивания используется видимое излучение, спектральный состав которого определяется полосой поглощения циклической формы.

(313 нм). Видно, что в процессе УФ-облучения коротковолновая полоса исчезает. Одновременно появляется две новые полосы поглощения при 380 и 580 нм, обусловленные образованием циклизованной формы.

Анализ соотношения констант фотоокрашивания и фотообесцвечивания показывает, что, в отличие от **DTE II**, соединения, содержащие полиеновый фрагмент, характеризуются более эффективной скоростью фотоокрашивания. Однако она снижается с увеличением длины полиеновой цепочки. Из сравнения данных о

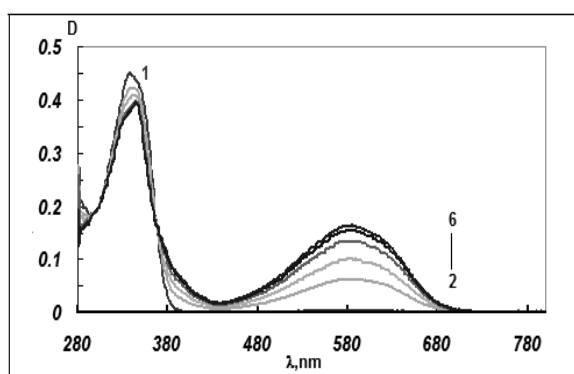


А

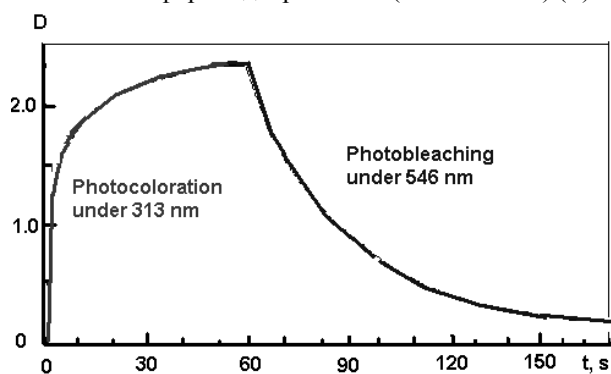


Б

Рис. 12. Спектры поглощения соединения **DTER II** в толуоле до (1) и в процессе (2–7) облучения УФ-светом (313 нм) (А) и кинетика процессов фотоокрашивания и фотообесцвечивания, измеренные на длине волны максимума полосы поглощения фотоиндуцированной циклизированной формы диарилэтена ($C\ 1.5 \times 10^{-5}$ М) (Б).

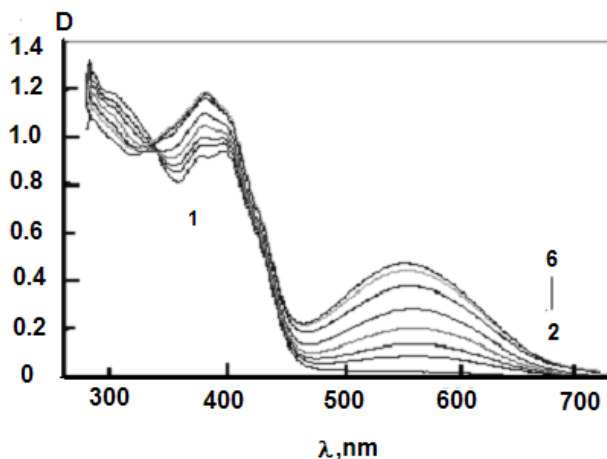


А

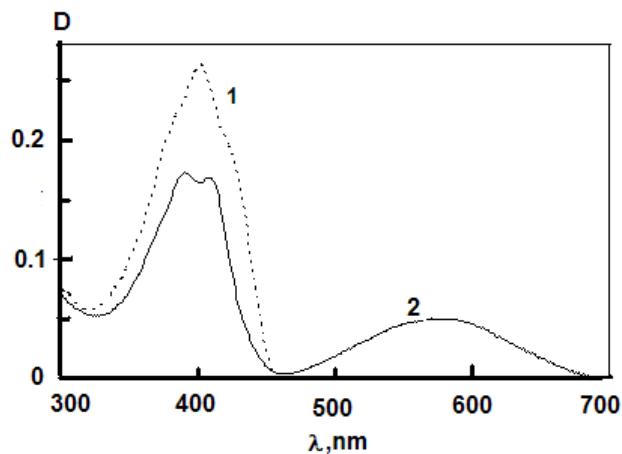


Б

Рис. 13. Спектры поглощения соединения **DTER III** в толуоле до (1) и в процессе (2–6) облучения УФ-светом (313 нм) (А) и кинетика процессов фотоокрашивания и фотообесцвечивания, измеренные на длине волны максимума полосы поглощения фотоиндуцированной циклизированной формы диарилэтена ($C\ 1.5 \times 10^{-5}$ М) (Б).



А



Б

Рис. 14. Спектры поглощения соединения **DTE I** в толуоле (А) до (1) и в процессе (2-6) облучения УФ-светом (313 нм) и в этаноле (Б) до (1) и после (2) облучения УФ-светом (313 нм).

фотодеградации (табл. 7) видно, что соединение с электронно-акцепторной CN-группой (**DTE III**) обладает наибольшей устойчивостью к необратимым фотопревращениям. Увеличение длины полиеновой цепочки приводит к повышению эффективности фотодеградации.

Таким образом, в результате сравнительного спектрально-кинетического исследования

синтезированных моделей хромофорных центров на основе гибридов молекул ретиноида и фотохромов из класса дитиенилэтенов установлена взаимосвязь между структурой соединений и их спектральными и кинетическими параметрами. Показано, что все соединения класса дитиенилэтенов проявляют выраженные фотохромные свойства и являются термически

необратимыми. Было установлено, что введение в молекулу полиеновой цепи, сопряженной с диарилэтиновым фрагментом, приводит к bathochromному сдвигу спектра поглощения открытой формы по сравнению с исходным альдегидом **DTE II**. Для циклических изомеров положение

максимума поглощения незначительно зависит от длины цепи сопряжения. Наилучшие кинетические характеристики процесса фотоциклизации, а также низкая степень фотодеградации характерны для нитрила **DTE III**.

Таблица 7. Спектрально-кинетические характеристики синтезированных дигетарилэтинов **DTE I-IV**.

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}^A$, нм		$\lambda_{\text{макс}}^B$, нм		ΔD_B^a	k_{AB}/k_{BA}^a	$t_{1/2}, c^a$
	толуол	этанол	толуол	этанол			
DTE II	295	-	380, 580	-	0.4 ^b	1.4	340
DTE III	340	276, 338	585	576	0.2	7.8	660
DTE IV	353	355	585	580	0.2	5.9	275
DTE I	390, 400	390, 402	380, 553	392, 409, 579	0.5	2.6	240

^a в толуоле; ^b при 580 нм.

Обозначения: $\lambda_{\text{макс}}^A$ и $\lambda_{\text{макс}}^B$ – максимумы полос поглощения открытой и циклической форм, соответственно; ΔD_B – фотоиндуцированное изменение оптической плотности в максимуме полос поглощения циклической формы в видимой области спектра; k_{AB} и k_{BA} – константы скоростей фотоокрашивания и фотообесцвечивания; $t_{1/2}$ – время необратимого снижения оптической плотности фотоиндуцированного поглощения в максимуме полосы поглощения циклической формы в 2 раза при непрерывном облучении нефильтрованным светом лампы ДРШ-250.

Исследование взаимодействия аналогов ретиналя с апобелком в составе апомембран

Было показано, что использованная процедура обесцвечивания–реконструкции слабо влияет на кинетику образования и распада М-интермедиата. При хранении образцов препаратов БР в виде концентрированной водной суспензии в течение 1 года практически не изменяются и кинетические параметры его фотоцикла, что было исследовано на примере штаммов ET1001 и D96N (рис. 15). Контрольные измерения исходных препаратов БР (до обесцвечивания) штаммов ET1001, JW5 и D96N выявили присущую им разницу кинетик М-подобного интермедиата (рис. 16). По своим кинетическим параметрам препараты БР_{ET1001} и

БР_{JW5} достаточно близки. У БР_{JW5} отмечено несколько более быстрое образование и немного замедленный распад М-интермедиата по сравнению с БР_{ET1001}. У БР_{D96N} значительно замедлены кинетики как образования, так и распада М-подобного интермедиата [18, 23, 64].

АБР и контрольные образцы БР получали добавлением к суспензии апомембран в стандартном буфере (100 мМ NaCl, 5 мМ MES, pH 6.0) стехиометрических количеств *all-E*-ретиналя (3) и его аналогов. Скорости встраивания ретиналя в БО с природной последовательностью и мутантный D96N очень близки, как и максимумы поглощения полученных пигментов. Спектральные свойства препаратов АБР приведены в табл. 8.

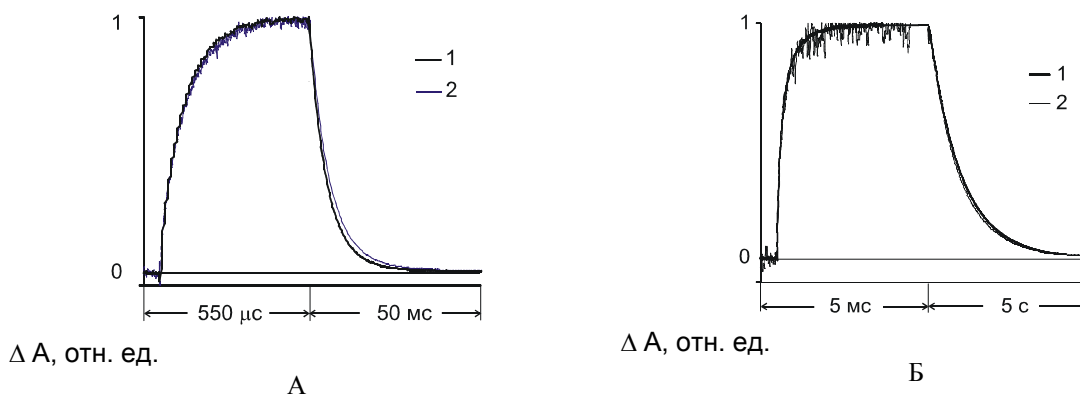


Рис. 15. Воспроизводимость кинетики М-интермедиата при хранении пурпурных мембран. А – штамм ET1001; Б – штамм D96N. Хранение: 1 – 1 мес.; 2 – 10 мес.

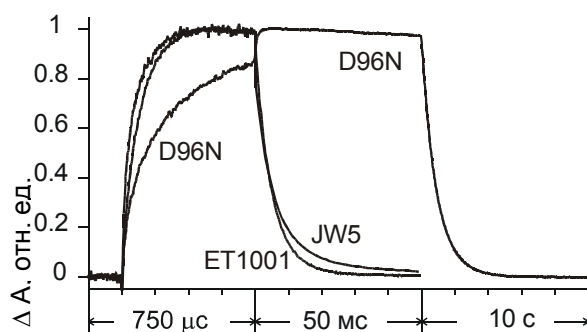


Рис. 16. Сравнение кинетики М-интермедиата БР штаммов ET1001, JW5 и D96N.

Встраивание всех групп исследованных аналогов ретиналя в БО происходит по-разному. При взаимодействии аналогов **CR Ia-e**, содержащих краун-эфирный фрагмент, с апомембранами появлялся пигмент с максимумом поглощения в районе 495-500 нм, характерным для серии аналогов бактериородопсина, у которых триметилциклогексеновое кольцо в природном хромофоре заменено ароматическими циклами различной природы [1–5, 12]. Скорость образования пигмента АБР оказалась на порядок ниже скорости формирования пурпурного комплекса БР из *all-E*-ретиналя и БО. В течение 1 дня образование пигмента заканчивалось. В каче-

стве примера на рис. 17 показан процесс образования ГАБР из полиеналяей **CR Id** (А) и **CR IVb** (Б) и БО. По спектральным параметрам пигменты, реконструированные из полиеналяей с различной природой краун-эфирного цикла, практически идентичны. Исследование фотохимических свойств краунированных АБР с помощью флэш-фотолиза показало наличие у них выраженного фотоцикла, сравнимого по эффективности с ароматическими АБР [17, 18, 24–37, 45, 48]. Также было показано, что для полиеналяей с укороченной полиеновой цепью, например **CR IVb**, возможно образование ковалентного комплекса с максимумом поглощения в районе 440-460 нм (рис. 17Б), в отличие от аналогов со сложноэфирной и нитрильными терминальными группами, не способных к образованию альдиминной связи. Подобное явление ранее наблюдалось также и для других ароматических аналогов ретиналя с укороченной полиеновой цепью. Для серий фотохромных аналогов ретиналя **SPR I,IV**, **SPRN I,IV**, **DTE I,IV** процесс образования пигментов ГАБР протекал еще более замедленно: для производных спиропиранов **SPR I,IV**, **SPRN I,IV** время завершения образования ГАБР занимало от 3 до 7 дней и около 10 дней для дитиенилэтенов **DTE I,IV**.

Таблица 8. Спектральные характеристики целевых полиеналяей и АБР на их основе.

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$ альдегида, нм	$\lambda_{\text{макс}}$ АБР, нм	Эффективность фотоцикла, %
(3)	381	558	100
CR Ia	400	495	23
CR Ib	400	495	23
CR Ic	396	497	н.и.
CR Id	396	497	н.и.
CR Ie	402	500	32
SPR IV	365	440	-
SPR I	411	495	+
SPRN IV	385	605	н.и.
SPRN I	400	500	+
DTE IV	355	430	-
DTE-I open	402	510	н.и.
DTE-I closed	392, 409, 579	после 2 мес. инкубации пигмент не образуется	-

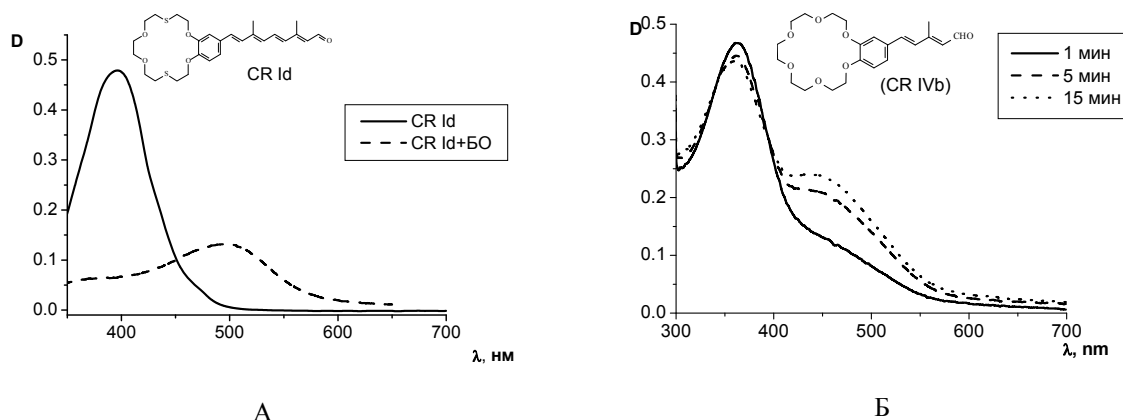


Рис. 17. Спектрофотометрический контроль образования АБР из полиеналяей **CR Id** (А) и **CR IVb** (Б) и апомембран из *H. salinarum*. Концентрация белка 2.03 мг/мл, 5 мМ MES, pH 6.0, 25°C.

При анализе полученных результатов необходимо отметить два особо интересных факта: 1) впервые за более чем 25-летнее время изучения факторов и условий, накладываемых белковой матрицей на структуру аналогов ретиналя (для всего массива из более 350 соединений), обнаружен и доказан факт реализации возможности светуправляемого распознавания белковой матрицей пространственных ограничений для одной и той же структуры аналога хромофорной группы (ср. данные табл. 8 для открытой и циклизованной форм полиеналя **DTE I**); 2) наблюдается аномальный батохромный сдвиг (более 150 нм) в спектре поглощения пигмента из спиропирана с укороченной полиеновой цепью **SPRN IV**.

Были получены первые предварительные данные фотоответов новых пигментов АБР на вспышку лазерного импульса (λ 530 нм) на установке флеш-фотолиза, позволяющей осуществлять исследования в микросекундном диапазоне времени. Было отмечено, что АБР, приготовленные из аналогов ретиналя серии **SPRN I**, способны в ответ на лазерный импульс в видимой области спектра обратимо генерировать новые интермедиаты, отличные по своим спектральным и кинетическим параметрам от интермедиатов фотореакций природного БР.

Таким образом, была показана принципиальная возможность получения ГАБР, содержащих ионофорный или фотохромные фрагменты в составе хромофорной группы и сохраняющих способность к циклическим фотохимическим превращениям.

Заключение

В результате сравнительного спектрально-кинетического исследования синтезированных моделей фоточувствительных систем – четырех серий соединений на основе гибридов молекул ретиноидов с ионофорными или фотохромными фрагментами – установлена взаимосвязь между структурой соединений и их спектральными и кинетическими параметрами, а также комплексно изучены процесс их взаимодействия с апобелком бактериоопсином и свойства образующихся продуктов реакции.

Данный цикл работ был выполнен при частичной поддержке грантов РФФИ 01-03-32078, 04-03-32746-а, 09-03-00565а, гранта ИНТАС-2001-0267 и госконтрактов №№ 02.512.11.2250 и 16.740.11.0177, грантов Президента РФ по поддержке исследований молодых кандидатов наук №№ МК-2516.2005.4, МК-5333.2007.4 и МК-2598.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Мицнер Б.И., Ходонов А.А. Хромофорные группы ретинилиденпротеидов // В сб.: Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации / Под ред. Г.Р. Иваницкого. – Пущино, 1985. С. 38–49.
2. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. Аналоги ретиналя: синтез и взаимодействие с бактериоопсином // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 5–53.
3. Mitsner B.I., Khodonov A.A., Karnauchova E.N. Retinal analogs and N-retinylidenepeptides as tools for investigation of bacteriorhodopsin and rhodopsin chromophoric sites // In: Retinal Proteins / Ed. Yu.A. Ovchinnikov. – Utrecht, Netherlands: VNU Science Press, 1987. P. 561–569.
4. Драчев Л.А., Зорина В.В., Мицнер Б.И., Хитрина Л.В., Ходонов А.А., Чекулаева Л.Н. Фотоцикл и электрогенезис *all-E*- и *13Z*-ароматических аналогов ретиналя // Биохимия. 1987. Т. 52. № 9. С. 1559–1569.

5. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. *all-E-* и *13Z*-ароматические аналоги ретиналя // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 238–251.
6. Drachev L.A., Drachev A.L., Chekulaeva L.N., Evstigneeva R.P., Kaulen A.D., Khitrina L.V., Khodonov A.A., Lazarova Z.R., Mitsner B.I. An investigation of the electrochemical cycle of bacteriorhodopsin analogs with modified ring // Arch. Biochem. Biophys. 1989. V. 270. № 1. P. 184–197.
7. Khitrina L.V., Drachev L.A., Eremin S.V., Kaulen A.D., Khodonov A.A. M-Intermediates in the 13-*cis*-cycle of bacteriorhodopsin // In: Structure and Functions of Retinal Proteins / Ed. J.L. Rigaud. – Colloque INSERM–John Libbey Eurotex Ltd., 1992. V. 221. P. 167–170.
8. Драчев Л.А., Каулен А.Д., Еремин С.В., Ходонов А.А., Хитрина Л.В., Швеи В.И., Чекулаева Л.Н. Образование интермедиатов М-типа в фотоцикле 13-*цис*-аналогов бактериородопсина // Биохимия. 1993. Т. 58. № 6. С. 819–826.
9. Хитрина Л.В., Каулен А.Д., Еремин С.В., Ходонов А.А. Бактериородопсин. Белковые ограничения изомеризации хромофора // Молекулярн. биология. 1995. Т. 29. № 6. С. 1398–1407.
10. Khodonov A.A., Demina O.V., Eremin S.V., Khitrina L.V. Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices // Abstracts of the 3rd EUROPT(R)ODE Conf. on Optical Chemical Sensors and Biosensors. – Zurich, Switzerland, 1996. P. 113.
11. Silfsten P., Parkkinen S., Luostarinen J., Khodonov A., Jaaskelainen T., Parkkinen J. Color sensitive biosensors for imaging // Proceed. of the 13th Int. Conf. on Pattern Recognition, ICPR'96. – Vienna, Austria, 1996. V. 3. P. 331–335.
12. Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Швеи В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д. Аналоги ретиналя и их применение для исследования бактериородопсина // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 747–778.
13. Silfsten P., Parkkinen S., Luostarinen J., Khodonov A.A., Demina O.V., Jaaskelainen T., Parkkinen J. Opto-electrical properties of bacteriorhodopsin and its analogs in polyvinylalcohol films // Abstracts of the 7th Int. Conf. on Retinal Proteins. – Zichron-Yaacov, Israel, 1996. P. 61.
14. Jaaskelainen T., Leppanen V.P., Parkkinen S., Parkkinen J., Khodonov A. The photochromic properties of 4-keto bacteriorhodopsin // Optical Materials. 1996. V. 6. № 4. P. 339–345.
15. Khodonov A.A., Demina O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D., Silfsten P., Parkkinen S., Jaaskelainen T., Parkkinen J. Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices // Sensors & Actuators, part B. 1997. V. B39. № 1-3. P. 218–221.
16. Khodonov A.A., Shevyakov S.V., Mironova E.V., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D. Bacteriorhodopsin analogs, bearing modified chromophore as a basis for the photochromic materials // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2000. V. 345. P. 317–322.
17. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Mironova E.V., Shvets V.I., Alexeeva S.G., Demina O.V., Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D. Synthesis and properties of a new crown ether-containing dyes // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2000. V. 345. P. 15–20.
18. Миронова Е.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Алексеева С.Г., Швеи В.И., Демина О.В., Ходонов А.А., Хитрина Л.В. Синтез и свойства аналогов бактериородопсина, содержащих электроно-плотные метки в хромофоре // Биохимия. 2001. Т. 56. № 11. С. 1638–1648.
19. Khodonov A.A., Mironova E.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V. Relationship between chromophore structure and photochemical properties in bacteriorhodopsin analogs series // Abstracts of the XX Int. Conf. on Photochemistry. – Moscow, 2001. P. 199–200.
20. Lukin A.Yu., Khodonov A.A., Stepanenko V.N., Mironova E.V., Shevyakov S.V., Alexeeva S.G., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V. Synthesis and photochemical properties of the heavy-atom labeled bacteriorhodopsin analogs // Abstracts of the XX Int. Conf. on Photochemistry. – Moscow, 2001. P. 356–357.
21. Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Khodonov A.A., Savransky V.V. Vibrational excited-state structure of the chromophore in pigment studied by FTIR emission spectroscopy // Abstracts of the XX Int. Conf. on Photochemistry. – Moscow, 2001. P. 541.
22. Миронова Е.В., Леонтьева С.В., Шевяков С.В., Алексеева С.Г., Швеи В.И., Демина О.В., Краснокутская И.С., Финкельштейн Е.И., Ходонов А.А. Удобный способ получения производных ретиналя, модифицированных по триметилциклоксеновому кольцу // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. № 6. С. 535–542.
23. Миронова Е.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Швеи В.И., Демина О.В., Складнев Д.А., Хитрина Л.В., Гребенников Е.П., Адамов Г.Е., Ходонов А.А. Биосинтетическое получение аналогов бактериородопсина // Материалы I Московского междунар. конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития». – М., 2002. С. 422–423.
24. Shevyakov S.V., Lukin A.Yu., Mironova E.V., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alifimov M.V., Khodonov A.A. New crown ether-containing derivatives of vitamin A // Abstracts of the 13th Int. Carotenoid Symp. – Honolulu, USA, 2002. P. 185.

25. Lukin A.Yu., Mironova E.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V., Khodonov A.A. Study of spectral properties and cation-binding of a new crown ether receptors // Abstracts of the Int. Conf. «Biocatalysis-2002: Fundamentals & Applications». – Russia, 2002. P. 110.
26. Khodonov A.A., Shevyakov S.V., Lukin A.Yu., Mironova E.V., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Lugtenburg J. Investigation a spectral properties of the crown-ether containing retinal and bacteriorhodopsin analogs // Abstracts of the 10th Int. Conf. on Retinal Proteins. – Seattle, USA, 2002. P. 95.
27. Строкач Ю.П., Валова Т.М., Барачевский В.А., Алфимов М.В., Громов С.П., Ведерников А.И., Демина О.В., Лукин А.Ю., Шевяков С.В., Шве́ц В.И., Ходонов А.А., Люгтенбург Й. Влияние катионов металлов на спектральные свойства винилогов краун-эфиров с различной природой терминальной полярной группы // Известия АН. Сер. хим. 2003. № 12. С. 2514–2517.
28. Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V., Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Demina O.V., Lugtenburg J. Spectral, photochemical and ion-binding properties of the crown-ether vinyllogs // Abstracts of the XXI Int. Conf. on Photochemistry. – Nara, Japan, 2003. P107. P. 649.
29. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V., Demina O.V., Lugtenburg J. Spectral, photochemical and ion-binding properties of the crown-ether vinyllogs // Abstracts of the XXVIII Int. Symp. on Macrocyclic Chemistry. – Gdansk, Poland, 2003. P69. P. 159.
30. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Venidiktova O.V., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Demina O.V. Synthesis and study of a cation-binding of a new crowned spiropyran // Abstracts of the 4th Int. Symp. on Photochromism «Photoswitchable Molecular System and Devices». – Arcachon, France, 2004. P. 94.
31. Demina O.V., Shevyakov S.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Khitrina L.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Lugtenburg J., Khodonov A.A. Investigation of the spectral properties of the crowned retinals and bacteriorhodopsin analogs // Abstracts of the 4th Int. Symp. on Photochromism «Photoswitchable Molecular System and Devices». – Arcachon, France, 2004. P. 133.
32. Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Demina O.V., Khodonov A.A. Synthesis and study of a cation-binding of a new crowned retinoids // Abstracts of the Third Int. Symp. on Supramolecular Chemistry «Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures». – Kazan, Russia, 2004. P. 115.
33. Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shevyakov S.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Vedernikov A.I., Gromov S.P., Alfimov M.V., Demina O.V., Khodonov A.A. Synthesis and study of a cation-binding of a new crowned spiropyran // Abstracts of the Third Int. Symp. on Supramolecular Chemistry «Molecular Design and Synthesis of Supramolecular Architectures». – Kazan, Russia, 2004. P. 116.
34. Lukin A.Yu., Shevyakov S.V., Laptev A.V., Davydova O.I., Shvets V.I., Demina O.V., Strokach Yu.P., Barachevsky V.A., Alfimov M.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Lugtenburg J., Khodonov A.A. Application of Horner-Emmons olefination to the crown-ether derivatives // J. Inclus. Phenomena Macrocyclic Chem. 2004. V. 49. P.153–161.
35. Demina O.V., Varfolomeev S.D., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Khitrina L.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Alfimov M.V., Lugtenburg J., Khodonov A.A. Investigation of the spectral properties of the crowned retinals and bacteriorhodopsin analogs // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2005. V. 431. P. 209–214.
36. Khodonov A.A., Demina O.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Strokach Yu.P., Venidiktova O.V., Valova T.M., Alfimov M.V., Barachevsky V.A. Photochromic and cation-binding properties of new crowned spiropyran // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2005. V. 431. P. 215–222.
37. Demina O.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Khodonov A.A. Crowned retinals and bacteriorhodopsin analogs, synthesis and study of their spectral properties // Abstracts of the XXII Int. Conf. on Photochemistry. – Cairns, Australia, 2005. P. 91.
38. Khodonov A.A., Krayushkin M.M., Strokach Yu.P., Barachevsky V.A., Demina O.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V. Retinoid derivatives as thermal irreversible photochromes // Abstracts of the XXII Int. Conf. on Photochemistry. – Cairns, Australia, 2005. P. 91–92.
39. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Krayushkin M.M., Shorunov S.V., Demina O.V. Photochromic retinal analogs: Synthesis and study of their spectral properties // Abstracts of the XXI IUPAC Symp. on Photochemistry. – Kyoto, Japan, 2006. P. 230.
40. Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Krayushkin M.M., Demina O.V. Photochromic retinal analogs: Synthesis and study of

their spectral properties // Abstracts of the Int. Symp. on Molecular Photonics devoted to the memory of academician A.N. Terenin. – St.-Petersburg, 2006. P. 77.

41. Demina O.V., Khodonov A.A., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Strokach Yu.P. Design and synthesis of photochromic labels for covalent modification of different targets // Abstracts of the Int. Symp. on Molecular Photonics devoted to the memory of academician A.N. Terenin. – St.-Petersburg, 2006. P. 76–77.

42. Terpugov E.L., Degtyareva O.V., Demina O.V., Gagarinov A.G., Khodonov A.A. Nonlinear spectroscopic investigations of the retinylidene chromophore in a wild strain bacteriorhodopsin by FT-IR emission spectroscopy // Abstracts of the Int. Symp. on Molecular Photonics devoted to the memory of academician A.N. Terenin. – St.-Petersburg, 2006. P. 165–166.

43. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Ходонов А.А. Синтез аналогов ряда спиропиранов, изучение их взаимодействия с бактериоопсином из *H. salinarum* // Вестник МИТХТ. 2006. Т. 1. № 1. С. 27–32.

44. Terpugov E.L., Gagarinov A.G., Degtyareva O.V., Khodonov A.A. Vibrational motions in photoactive biomolecules such as *all-trans*-retinal and in a wild type bacteriorhodopsin: An infrared emission spectroscopic study // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2006. V. 1757. P. 239–240.

45. Khodonov A.A., Khitrina L.V., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Gromov S.P., Strokach Yu.P., Barachevsky V.A., Alfimov M.V., Demina O.V. Study of the spectral behavior of the crowned retinal and bacteriorhodopsin analogs // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2006. V. 1757. P. 278–279.

46. Gagarinov A.G., Degtyareva O.V., Khodonov A.A., Terpugov E.L. Stimulated infrared emission in *all-trans* retinal and wild type bacteriorhodopsin under CW optical pumping: Studies by FT-IR spectroscopy // Vibrational Spectroscopy. 2006. V. 42. № 2. P. 231–238.

47. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A. Synthesis of photochromic retinal analogs // Abstracts of the XVIII Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry. – Moscow, 2007. № 4. P. 546.

48. Lukin A.Yu., Laptev A.V., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A. Ionophoric retinal analogs: Synthesis and properties // Abstracts of the XVIII Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry. – Moscow, 2007. № 5. P. 99.

49. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevsky V.A., Demina O.V., Shvets V.I., Khodonov A.A. Investigation of spectral properties of photochromic retinoid analogs // Abstracts of the Int. Conf. «Molecular and nanoscale system for energy conversion». – Moscow, 2007. P. 85.

50. Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Barachevsky V.A., Demina O.V., Shvets V.I., Khodonov A.A., Krayushkin M.M. Vinylogs of the bis-dihetarylethenes as new thermoirreversible photochromic materials // Abstracts of the Int. Conf. «Molecular and nanoscale system for energy conversion». – Moscow, 2007. P. 89.

51. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Барачевский В.А., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Краюшкин М.М. Фотохромные аналоги ретиналя: синтез и свойства // Материалы междунар. конф. «Нанофотоника». – Черногловка, Россия, 2007. С. 164.

52. Belikov N., Lukin A., Laptev A., Shvets V., Barachevsky V., Strokach Yu., Valova T., Krayushkin M., Demina O., Varfolomeev S., Khodonov A. Photochromic behavior of retinal analogs // Abstracts of the Int. Symp. on Photochromism. – Vancouver, Canada, 2007. P. 28.

53. Barachevsky V.A., Strokach Yu.P., Kobeleva O.I., Valova T.M., Krayushkin M.M., Demina O.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Laptev A.V., Shvets V.I., Khodonov A.A. Photochromic retinal analogs: Synthesis and properties // Abstracts of the XXIII Int. Conf. on Photochemistry. – Cologne, Germany, 2007. P. 472.

54. Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Строкач Ю.П., Барачевский В.А., Алфимов М.В., Демина О.В., Шве́ц В.И., Складнев Д.А., Ходонов А.А. Синтез спиропирановых аналогов ретиналя и изучение их взаимодействия с бактериоопсином из *H. salinarum* // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. № 2. С. 276–284.

55. Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Барачевский В.А., Алфимов М.В., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Ходонов А.А. Спиропирановые аналоги ретиналя: синтез и изучение их фотохромных свойств // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. № 4 (прил.). С. 102–104.

56. Belikov N., Lukin A., Laptev A., Shvets V., Barachevsky V., Strokach Yu., Valova T., Krayushkin M., Demina O., Varfolomeev S., Khodonov A. Photochromic behavior of retinal analogs // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 2008. V. 196. № 2-3. P. 262–267.

57. Barachevsky V.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Shvets V.I., Valova T.M., Krayushkin M.M., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Photochromic behavior of retinal analogs // Abstracts of the XXII IUPAC Int. Symp. on Photochemistry. – Gothenburg, Sweden, 2008. P150. P. 278.

58. Ходонов А.А., Демина О.В., Беликов Н.Е., Звездин К.В., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Барачевский В.А. Синтез и спектральные свойства фотохромных производных витамина А // Материалы Междунар. симп. «Нанопотоника». – Ужгород, Украина, 2008. С. 2.
59. Демина О.В., Беликов Н.Е., Звездин К.В., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Шве́ц В.И., Ходонов А.А. Исследование процесса фотоизомеризации производных витамина А // Материалы Междунар. симп. «Нанопотоника». – Ужгород, Украина, 2008. С. 13.
60. Demina O.V., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Investigation of synthetic routes for the 11Z-retinal preparation // Abstracts of the Int. Symp. «Defense Mechanisms of the Retina: New Perspectives». – Erevan, Armenia, 2008. P. 24.
61. Khodonov A.A., Demina O.V., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Varfolomeev S.D. Retinoids and retinal proteins – structure and function // Abstracts of the Int. Symp. «Defense Mechanisms of the Retina: New Perspectives». – Erevan, Armenia, 2008. P. 22.
62. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Звездин К.В., Шве́ц В.И., Барачевский В.А., Варфоломеев С.Д., Демина О.В. Исследование фотохромного поведения модельных хромофоров ретиналь-содержащих белков // Материалы Междунар. конф. «Органическая нанопотоника 2009». – С.-Пб., 2009. С. 136.
63. Демина О.В., Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Земцов Р.В., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Исследование спектральных свойств производных изоксазолов, содержащих фотохромную метку // Материалы Междунар. конф. «Органическая нанопотоника 2009». – С.-Пб., 2009. С. 131.
64. Тюрин С.А., Грицевич Ю.Г., Складнев Д.А., Ходонов А.А. Бактериородопсин как стимулятор роста и развития растений // Агрохимия. 2009. № 6. С. 32–39.
65. Хитрина Л.В., Миронова Е.В., Ходонов А.А. Исследование бактериородопсинов *Halobacterium salinarum* дикого типа и мутанта D96N с модифицированными хромофорами // Биол. мембраны. 2009. Т. 26. № 3. С. 194–200.
66. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Шве́ц В.И., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Барачевский В.А., Ходонов А.А. Синтез и изучение фотохромного поведения 3-[6'-нитро-1,3,3-триметилспиро(индолино-2,2'-[2Н]-хромен-5-ил)]пропеновой кислоты и ее этилового эфира // Химия высоких энергий. 2010. Т. 44. № 3. С. 239–243.
67. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Шве́ц В.И., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Барачевский В.А., Ходонов А.А. Синтез и изучение фотохромного поведения 3-[6'-нитро-1,3,3-триметилспиро(индолино-2,2'-[2Н]-хромен-5-ил)]пропеновой кислоты и ее этилового эфира // Материалы Междунар. конф. «Органическая нанопотоника 2009». – С.-Пб., 2009. С. 228–237.
68. Khodonov A.A., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zemtsov R.V., Zvezdin K.V., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Demina O.V. Synthesis and properties of photochromic retinal analogs // Abstracts of the 16th Europ. Symp. on Organic Chemistry. – Prague, Czech Republic, 2009. P. 1.244. P. 311.
69. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лаптев А.В., Шве́ц В.И. Создание водорастворимых композиций препаратов ретиноидов для лечения заболеваний зрительной системы человека // Материалы итоговой конф. по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». – М., 2009. С. 59–60.
70. Khodonov A.A., Laptev A.V., Zvezdin K.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Fomin M.A., Shvets V.I., Brichkin S.B., Nikolenko D.Yu., Razumov V.F., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Demina O.V. New hybrid photochromic materials for optical switching // Abstracts of the 4th Int. Conf. on Optical Optoelectronic and Photonic Materials and Application. – Hungary, Budapest, 2010. A-0098. P. 110–111.
71. Barachevsky V.A., Khodonov A.A., Krayushkin M.M. Properties of photochromic retinals // Abstracts of the 3rd Japanese–French Seminar on Organic Photochromism «Innovations in Photochromism». – Japan, Yokohama, 2010. IL-02. P. 13.
72. Oesterhelt D., Stoerkenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // Nature. 1971. V. 233. P. 149–152.
73. Luecke H., Schobert B., Richter H.T., Cartailler J.P., Lanyi J.K. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution // J. Mol. Biol. 1999. V. 291. P. 899–911.
74. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Шве́ц В.И., Демина О.В., Барачевский В.А., Ходонов А.А. 5-Формил-замещенные индолиновые спиробензопираны и способ их получения: пат. 2358977 Рос. Федерация. № 2008112485; заявл. 02.04.2008; опубл. 20.06.2009, Бюл. № 17.
75. Ligand-Protein Contacts (LPC). URL: <http://bip.weizmann.ac.il/oca-bin/lpcsu>.

ЛИПОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДЕКСАМЕТАЗОН: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

*Н.Л. Лепарская, научный сотрудник, Г.М. Сорокоумова, доцент,
Ю.В. Сычева, студент, *И.П. Хорошилова-Маслова, профессор,
А.П. Каплун, профессор, **И.И. Кереев, старший научный сотрудник,
*Р.А. Гундорова, профессор, *В.В. Нероев, профессор,
В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Московский научно-исследовательский институт глазных болезней
им. Гельмгольца Росмедтехнологий

** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова
e-mail: galinams@yandex.ru

Получены липосомы различного липидного состава, содержащие глюкокортикоид дексаметазон (ДМ) и динатриевую соль дексаметазона фосфата (ДМФ). Изучена зависимость эффективности включения препарата от его растворимости в воде и от состава липосом. Показано, что липиды позволяют солюбилизовать ДМ в концентрации, в 9.3 раза превышающей его растворимость в воде. Для всех образцов липосом, содержащих как ДМФ, так и ДМ, определена степень высвобождения лекарственных субстанций из липосом путем проведения повторной гель-хроматографии. При этом показано, что в липосомах сохраняется до 87% включенной субстанции. Изучена биосовместимость «пустых» липосом и липосом, содержащих глюкокортикоид, с тканями глазного яблока кролика при их эндовитреальном введении. Установлено, что липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина не вызывают воспалительной реакции при таком способе введения. Изучено распределение липосом в тканях заднего отдела глаза кролика. При этом показано, что липосомы при эндовитреальном введении распределяются в различные слои сетчатки.

Glucocorticoid dexamethasone (DM) liposomes of various lipid compositions were obtained. DM was used in insoluble form and in water-soluble form as disodium salt of dexamethasone phosphate (DMP). Correspondence between the drug inclusion percent and the structure of liposomes, and its solubility in water was studied. Lipids were shown to allow DM solubilization at concentration exceeding its solubility in water 9.3 times. Using repeated gel-chromatography, release of medicinal substances from liposomes was determined for all the samples of liposomes containing both DMP and DM. It was thus shown that up to 87% of the included substance remained in the liposomes. Biocompatibility of «empty» liposomes and liposomes containing a glucocorticoid with rabbit eyeball tissues was studied after their endovitreous incorporation. Dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes were demonstrated not to cause inflammatory reaction after introduction in this way. Distribution of the liposomes in tissues of the rabbit eye posterior chamber was determined. It was shown that the liposomes after endovitreous introduction were distributed in various layers of retina.

Ключевые слова: липосомы, офтальмология, фосфолипиды, глюкокортикостероиды, дексаметазон, эндовитреальное введение, биосовместимость, конфокальная микроскопия

Key words: liposomes, ophthalmology, phospholipids, glucocorticoids, dexamethasone, endovitreous introduction, biocompatibility, confocal microscopy

Введение

Большинство глазных лекарств применяется в форме глазных капель, которыми в клинической практике лечат заболевания переднего отрезка глаза (роговица, конъюнктив и склера). К сожалению, глазные капли быстро удаляются из глаза, поэтому время поглощения лекарства составляет только несколько минут, при этом биодоступность лекарства очень низка, обычно менее 5% [1].

Воспаление, локализованное в области глаза, особенно в его заднем отрезке, требует точечной (местной) доставки лекарственного препарата. Известно, что лекарства могут быть доставлены к заднему отрезку глаза через системную циркуляцию крови [1]. Однако глаз изолирован от общей системы кровообращения гематоофтальмическим и гематоретинальными барьерами, которые ограничивают системное распространение внутриглазного препарата. Таким образом, необходима разработка специ-

фических систем доставки лекарственного препарата и адаптация ее к целевому типу ткани или клеток глаза [2]. Кроме того, должны быть учтены физико-химические свойства используемого активного вещества и определена кинетика его внутриглазного высвобождения.

В настоящее время широко обсуждается использование липосом как средств доставки лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний, в том числе и заболеваний глаз [2]. Известны такие липосомальные препараты как липосомальный Баларпан [3] и липосомальная форма циклоспорина – Циклолип [4]. Данные препараты разрабатывали и исследовали в офтальмологии для лечения заболеваний переднего отрезка глазного яблока. Вместе с этим для фотодинамической терапии в офтальмологии применяют липосомальную лекарственную форму вертепорфина – Визудин [5]. Использование этого средства позволяет достичь селективной локализации препарата в рай-

оне неоваскулярного поражения глаза и, кроме того, способно значительно улучшить его эффективность за счет уменьшения агрегации фотосенсибилизатора путем удаления его молекул друг от друга при включении в липосомы.

Известные преимущества липосомальной формы (низкая токсичность, защита лекарственной субстанции от деградации, пролонгированность действия, возможность направленной доставки) позволяют использовать меньшие терапевтические дозы лекарств, что очень важно при применении препаратов, обладающих токсичностью. Простота изготовления и универсальность физических характеристик делает липосомы уникальными для использования в качестве системы доставки глазных препаратов.

В офтальмологии при лечении воспалительных процессов, аллергических поражений глаза, реакциях отторжения роговичного транс-

плантата, аутоиммунных заболеваний широко применяются глюкокортикостероиды (дексаметазон, бетаметазон и т.п.). Однако их использование может привести к таким серьезным осложнениям, как повышение внутриглазного давления, катаракта, тяжелым кератитам [6].

Целью данной работы является получение липосом, содержащих дексаметазон, и определение их биосовместимости с клетками сетчатки глаза кролика при эндовитреальном введении.

Известно, что в офтальмологии используют различные лекарственные формы субстанции дексаметазона: глазные капли, где действующим веществом является динатриевая соль дексаметазона фосфата (ДМФ) – водорастворимая субстанция, и глазная мазь, в которой используется жирорастворимая субстанция дексаметазона (ДМ) (рис. 1) [7].

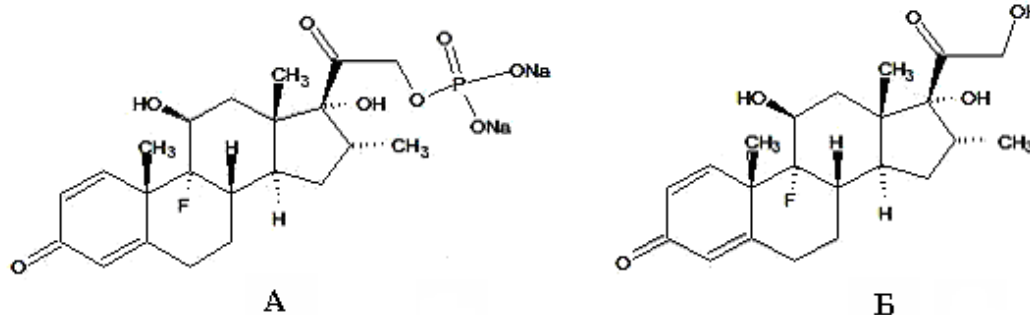


Рис. 1. Структурные формулы глюкокортикостероидов: А – динатриевая соль дексаметазона фосфата; Б – дексаметазон.

Липосомы, состоящие из фосфолипидов – веществ амфифильной природы – позволяют получить липосомальную лекарственную форму как гидрофильного (ДМФ), так и гидрофобного (ДМ) вещества, а также препарат, содержащий обе субстанции одновременно. Важно, чтобы липосомальная форма дексаметазона содержала максимально возможное количество действующего вещества и высвобождение его было бы постепенным. Для решения этих задач необходимо определить оптимальный липидный состав липосом, подобрать подходящую концентрацию липидов и субстанций.

Результаты и их обсуждение

Определение эффективности включения водорастворимой субстанции ДМФ в липосомы различного липидного состава

При получении липосом, содержащих водорастворимую субстанцию ДМФ, мы использовали различные липиды: фосфатидилхолин, выделенный из сои (с-ФХ), холестерин (Хол) (в смеси с с-ФХ), выделенный из яичного желтка, полусинтетический дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ).

Липосомы – одноламеллярные везикулы (ОЛВ) различного липидного состава получали методом экструзии мультиламеллярных везикул (МЛВ) через поликарбонатный ядерный фильтр

диаметром пор 200 и 100 нм. В данных экспериментах при получении липосом использовали одинаковые концентрации липидов (20 мг/мл) и различные (от 1 до 10 мг/мл) концентрации ДМФ. Размер липосом определяли методом турбидиметрии [8] и с помощью лазерного анализатора субмикронных частиц. Отделение липосом с включенным в них ДМФ от свободного ДМФ проводили гель-хроматографией с использованием микроколонки с сорбентом Sephadex G-25. Количество ДМФ, включенного в липосомы, определяли спектрофотометрически. Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Проведенные исследования показали, что эффективность включения ДМФ в липосомы не зависит от липидного состава липосом, исследованного нами. При этом содержание ДМФ в липосомах увеличивается при использовании для получения липосом более концентрированного исходного водного раствора ДМФ. Так, весовое соотношение ДМФ/липид в липосомах возрастает практически в 3 раза (от 1.25 до 3.62%), если его исходная концентрация в водном растворе увеличивается в 10 раз (от 1 до 10 мг/мл). Эффективность включения ДМФ в липосомы мала и не превышает 25% (при его исходной концентрации 1 мг/мл).

Однако важным достоинством данного препарата является то, что липосомы с ДМФ харак-

теризуются значительной степенью удерживания субстанции в них. После повторной геле-

хроматографии липосомной фракции содержание ДМФ уменьшается всего на 13%.

Таблица 1. Эффективность включения ДМФ в липосомы различного липидного состава (концентрация липидов 20 мг/мл) в зависимости от исходной концентрации ДМФ.

Липиды	Исходная концентрация ДМФ, мг/мл	Эффективность включения ДМФ, %	Весовое соотношение ДМФ/липиды, %	Размер частиц, нм
с-ФХ	4	8.0±0.2	1.60±0.2	202±3
с-ФХ:Хол (7:3 моль/моль)	1	25±0.5	1.25±0.2	269±2
	4	8.6±0.2	1.71±0.2	185±4
	10	7.3±0.2	3.62±0.2	235±1
ДПФХ	4	8.1±0.2	1.63±0.2	168±3

Очевидно, что включение субстанции в липосомы зависит от свойств вещества, в основном от его гидрофобности. Поэтому на следующем этапе работы мы исследовали включение в липосомы гидрофобной субстанции дексаметазона (ДМ).

Определение эффективности включения гидрофобной субстанции дексаметазона в липосомы из фосфатидилхолина

При получении липосом использовали с-ФХ в концентрациях 20 или 40 мг/мл и ДМ в концентрациях 1, 2, 3 мг/мл. Так как ДМ плохо растворяется в воде, то МЛВ получали следующим образом: растворяли навески с-ФХ и ДМ в хлороформе, упаривали до получения липидной пленки, диспергировали встряхиванием в 0.9% растворе NaCl с 5-ти-кратным

замораживанием–оттаиванием. ОЛВ из МЛВ получали методом экструзии, определение включенного в липосомы ДМ проводили так же, как описано выше для липосом с ДМФ. Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Проведенные исследования показали, что в данном случае увеличение исходной концентрации ДМ приводит к сильному укрупнению агрегатов и образованию микрочастиц. Так, попытка получить липосомы из с-ФХ (20 мг/мл) с ДМ в концентрации 4 мг/мл не удалась, потому что образовались микрочастицы размером 2317±45 нм, которые задерживались на поликарбонатных фильтрах с размером пор 200–400 нм. Эти частицы обладают, по-видимому, жестким ядром и представляют собой смешанные мицеллы.

Таблица 2. Эффективность включения ДМ в липосомы из с-ФХ в зависимости от исходной концентрации ДМ.

Концентрация с-ФХ, мг/мл	Исходная концентрация ДМ, мг/мл	Эффективность включения ДМ, %	Весовое соотношение ДМ/липиды, %	Размер частиц, нм
20	1	50.0±2	2.5±0.2	202±5
	2	33.8±1	2.75±0.1	168±4
	3	30.8±1	2.5±0.2	202±5
40	1	80.0±3	2.0±0.2	168±4

Наибольшая эффективность включения ДМ (80%) в липосомы была достигнута при весовом соотношении с-ФХ/ДМ 40:1.

Важно отметить, что растворимость ДМ в воде и коэффициент распределения его в системе липосомы/вода, определенные нами, составляют, соответственно, 0.086 мг/мл и 1.6. Эти значения показывают, что ДМ распределяется между липидным бислоем и водной фазой, имея большее сродство к липидам. В случае использования соотношения с-ФХ/ДМ 40:1 (по весу) происходит увеличение солюбилизации ДМ в 9.3 раза.

Таким образом, очевидно, что при формировании липосом в присутствии одновременно гидрофильного ДМФ и гидрофобного ДМ возможно получение препарата с большей эффек-

тивностью включения лекарственных субстанций, т.к. они распределяются по разным областям липосомы.

Определение эффективности совместного включения в липосомы из с-ФХ гидрофобной и водорастворимой субстанций – ДМ и ДМФ

Для создания липосом из с-ФХ, содержащих одновременно гидрофобный ДМ и водорастворимый ДМФ, поступали следующим образом: упаривали с-ФХ и ДМ до получения пленки, пленку диспергировали в растворе ДМФ. Далее ОЛВ получали методом экструзии подобно описанному выше, удаляли не связанный и не включенный дексаметазон геле-хроматографией. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.

Таблица 3. Эффективность совместного включения ДМ (1.5 мг/мл) и ДМФ (4 мг/мл) в липосомы из с-ФХ.

Концентрация с-ФХ, мг/мл	Эффективность включения субстанций, %	Весовое соотношение субстанция/липиды, %	Концентрация субстанций в липосомах, мг/мл
20	15.9±2	4.38±0.3	0.88±0.2
40	25.0±3	6.88±0.2	1.37±0.1

Результаты экспериментов показывают, что при совместном введении субстанций дексаметазона, обладающих различной гидрофобностью, в липосомы при концентрации липидов 20 мг/мл включилось около 16% субстанций. Это значение в 2 раза больше, чем при введении в липосомы одного ДМФ. Кроме того, применение более концентрированного раствора липидов (40 мг/мл) позволяет включить в липосомы еще большее количество лекарственных препаратов. Как и ожидалось, образуется большее количество липосом, и дексаметазон, как водорастворимый, так и гидрофобный, распределяются во внутреннем водном объеме и липидном бислое, включаясь в липосомы в большем количестве (25%), чем при использовании липидов в концентрации 20 мг/мл.

Таким образом, использование липосом, содержащих одновременно ДМФ и ДМ, позволит ввести в область воспаления лекарственное вещество в количестве, превышающем действующую концентрацию препарата, которая составляет по данным авторов [9] 0.67 мг/мл, и поддерживать ее определенное время.

Ответ на вопросы об эффективности липосомальной формы исследуемых препаратов можно дать только после проведения биологических испытаний. В настоящее время нами была определена биосовместимость «пустых» липосом с фоторецепторными клетками глаза кролика, исследованы распределение флуоресцентно меченых липосом в тканях заднего отдела глаза кролика и биосовместимость липосом из ДПФХ, загруженных глюкокортикоидами: ДМФ и ДМ.

Биологические исследования липосом

На первом этапе проводили клинкоморфологические исследования и исследования биосовместимости «пустых» липосом разного липидного состава при их эндовитреальном введении. Кроликам породы Шиншилла в переднюю камеру глаза и в полость стекловидного тела (эндовитреально) вводили: «пустые» липосомы, состоящие из смеси с-ФХ:Хол (7:3), в изотоническом растворе и «пустые» липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ); контролем было введение в переднюю камеру и эндовитреально физиологического раствора. Длительность экспериментов составляла 30-45 сут.

Проведенные клинкоморфологические исследования показали, что воспалительная реакция при эндовитреальном введении была менее

выражена при введении липосом, полученных из ДПФХ, поэтому в дальнейших направлениях экспериментальной работы мы использовали липосомы такого состава.

Офтальмоскопические исследования не выявили ни воспалительных явлений, ни патологических изменений в оптических средах и оболочках глазного яблока подопытных животных.

Морфологическое исследование показало, что состояние тканевых структур – сетчатки, сосудистой оболочки глазного яблока – оставалось без изменений. В полости стекловидного тела в зоне воронки зрительного нерва было выявлено скопление крупных клеток макрофагального типа, заполненных липидами. Ядро в данных клетках, липофагоцитах, было смещено к периферии. Липофагоциты оседали на коллагеновых фибриллах стекловидного тела. Полученные данные свидетельствуют о том, что в липофагоцитах содержались фагоцитированные липосомы (рис. 2). В контроле изменений в тканях глаза выявлено не было.

Таким образом, результаты морфологических исследований свидетельствуют о малой токсичности изучаемых липосом. Введение липосом в витреальную полость приводит к активному фагоцитозу липосом с накоплением липофагоцитов в воронке зрительного нерва, что является закономерной тканевой реакцией на введение липосомальной дисперсии.

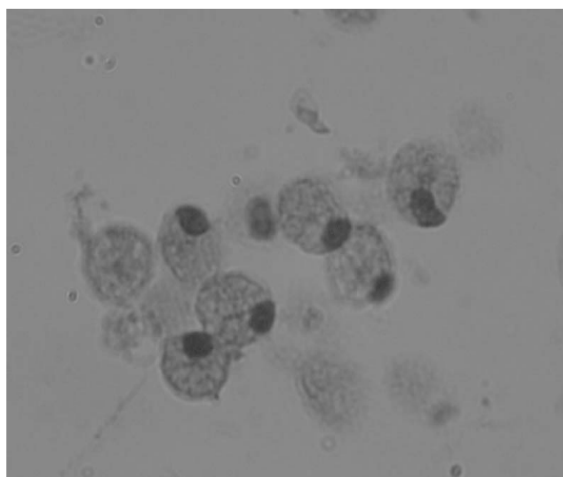


Рис. 2. Срез стекловидного тела: осевшие на фибриллах стекловидного тела липофагоциты содержат липосомы (ядро в клетках смещено к периферии) (х 400).

На втором этапе экспериментального исследования изучали распределение липосом при их эндовитреальном введении в ткани

глазного яблока с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа. Животным вводили в витреальную полость липосомы из ДПФХ, содержащих флуоресцентную метку 0.1% нитробензодиазол-фосфатидилэтаноламин (НБД-ФЭ), через 4 дня их выводили из эксперимента. Исследовали замороженные срезы сетчатки глаз кролика. При флуоресцентно-микроскопическом исследовании обнаружили, что липосомы визуализируются не только на внутренней поверхности сетчатки, но и во внутренних ее слоях, что говорит о том, что они проникают во внутренний ядерный слой. Кроме того, липосомы скапливаются в межклеточных щелях и присутствуют в цитоплазме клеток сетчатки (данные не приводятся).

На третьем этапе изучали биосовместимость липосом из ДПФХ, содержащих различные субстанции дексаметазона: ДМФ и ДМ. Экспери-

мент проводили на 12 кроликах: в один глаз вводили липосомы, нагруженные ДМФ или ДМ, в парный глаз вводили «пустые» липосомы. Длительность эксперимента составляла 40 сут. При офтальмоскопическом исследовании в глазах с введенным липосомальным ДМФ была выявлена выраженная воспалительная реакция стекловидного тела и преретинальный флер в кортикальных отделах стекловидного тела. Морфологические исследования глаз с введенными липосомами, нагруженными ДМФ, выявили деструкцию–денатурацию белковых структур – коллагена стекловидного тела (рис. 3), повреждение фоторецепторов (рис. 4). В глазах с введенным липосомальным ДМ патология не была выявлена. Стекловидное тело имело сохранную структуру, не было отмечено повреждений в фоторецепторном слое, отсутствовала воспалительная реакция (рис. 5).

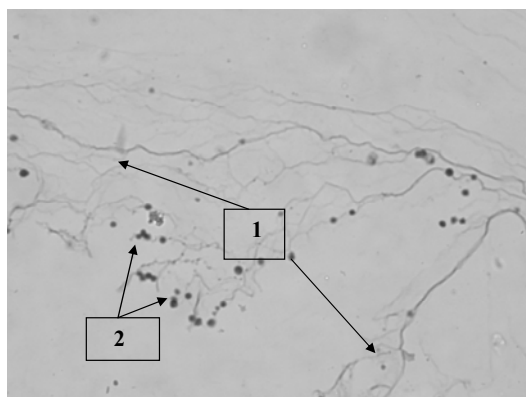


Рис. 3. Срез стекловидного тела после эндовитреального введения липосом, полученных из ДПФХ, нагруженных ДМФ: видны деструкция фибрилл стекловидного тела (1) и осевшие на фибриллах липофагоциты (2) (x100).

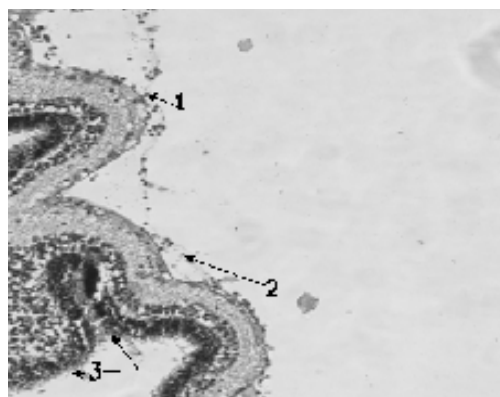


Рис. 4. Срез сетчатки и стекловидного тела после эндовитреального введения липосом, полученных из ДПФХ, нагруженных ДМФ: видны осевшие на внутренней поверхности сетчатки липофагоциты (1), деструкция кортикальных отделов стекловидного тела (2), повреждение фоторецепторного слоя (3) (x100).

Мы предположили, что, возможно, такая воспалительная реакция в стекловидном теле и в сетчатке связана с тем, что липосомы, содержащие ДМФ, имеют отрицательный заряд. Измерение и сравнение электрофоретического светорассеяния для определения дзета-потенциала липосом ДПФХ/ДМФ и ДПФХ/ДМ с использованием прибора DelsaNano показало, что величина дзета-потенциала препарата ДПФХ/ДМФ составляет -4.0 мВ, а для препарата ДПФХ/ДМ она равна -0.38 мВ. Таким образом, на основании биологического эксперимента с последующим подтверждением отрицательного заряда липосом ДПФХ, нагруженных ДМФ, была установлена причина токсического, повреждающего эффекта на стекловидное тело и сетчатку липосом ДПФХ с включенным ДМФ. Препарат ДПФХ/ДМ был практически нейтрален и не вызывал воспалительной реакции ни в сетчатке, ни в стекловидном теле глаза.

Таким образом, наиболее приемлемым для дальнейших экспериментов является липосомальный препарат, содержащий ДМ.

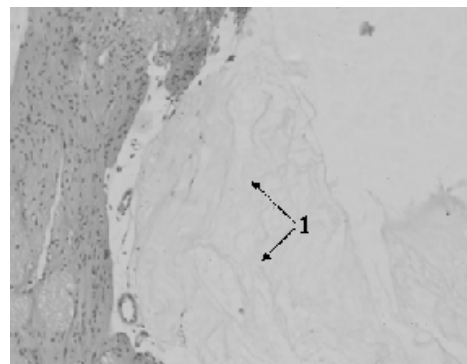


Рис. 5. Срез сетчатки в области воронки зрительного нерва и стекловидного тела после эндовитреального введения липосом, полученных из ДПФХ, нагруженных ДМ: фибриллы стекловидного тела сохранены (1), воспалительной реакции в сетчатке и в стекловидном теле нет (x100).

Дальнейшее исследование липосом в качестве носителей для лекарственных препаратов при эндовитреальном введении, а также во время и после витреоретинальной хирургии для профилактики и лечения воспалительных, проли-

феративных и дегенеративных процессов представляется нам актуальным и перспективным направлением научно-исследовательской работы.

Экспериментальная часть

В работе использовали липиды: фосфатидилхолин Lipoid S-100 фирмы «Lipoid GmbH» (Германия), дипальмитоилфосфатидилхолин (Sigma-Aldrich), нитробензодиазол-фосфатидилэтанолламин (НБД-ФЭ) (Avanti Polar Lipids, США), холестерин (Sigma-Aldrich), глюкокортикоиды: динатриевую соль дексаметазона фосфата (Aventis Pharma), дексаметазон (Sigma-Aldrich). Растворители: хлороформ, изопропанол, этанол «х. ч.» фирмы «Химмед» (Россия).

МЛВ получали с использованием роторного испарителя «Heidolph» (Германия), экструдера LiposoFast Basic «Avestin» (США), микрошприцев «Hamilton» (Швейцария) и поликарбонатных ядерных фильтров 200 и 100 нм «Тензор» (Россия). Спектры мутности частиц липосом получали на спектрофотометре DU-7 «Beckman Instruments» (США). Размер частиц и величину поверхностного заряда измеряли на приборе DelsaNano (Beckman Coulter, Германия). Микроскопические исследования проводили с использованием микроскопа LEICA (Япония). Сканирующую флуоресцентную микроскопию проводили на моторизованном инвертированном флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), с объективами x10/NA 0.25 и x63/NA 1.3 и камерой Orca ERG (Hamamatsu, Япония).

МЛВ из фосфолипидов получали диспергированием липидной пленки в водном растворе 0.9% хлорида натрия, содержащем лекарственную субстанцию в заданной концентрации. Дисперсию подвергали пятикратному замораживанию в жидком азоте с последующим оттаиванием и встряхиванием. Липосомы (ОЛВ) из МЛВ получали экструзией через поликарбонатный ядерный фильтр с диаметром пор 100, 200 или 400 нм. Для ДПФХ экструзию через ядерный фильтр проводили при 50°C. Размер частиц

определяли методом турбидиметрии и методом лазерного корреляционного светорассеивания. Все липосомы, используемые в работе, имели размер 175-235 нм.

Отделение ОЛВ с включенным в липосомы препаратом от свободного препарата проводили методом гель-фильтрации на сорбенте Sephadex G-25 Fine. Содержание препарата в липосомах определяли по поглощению ДМФ или ДМ на длине волны 242 нм.

Экспериментальные биологические исследования проводили в виварии ФГУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Росмедтехнологий на кроликах породы Шиншилла под местной анестезией инстилляцией препарата Алкаин 0.1% (ALCON). Все эндовитреальные введения препаратов в объеме 0.1 мл выполняли инсулиновой иглой 30 G через плоскую часть цилиарного тела. Клинические исследования глазного дна проводили методом прямой монокулярной офтальмоскопии. После завершения эксперимента животных выводили из него путем воздушной эмболии. Энуклеированные глаза фиксировали в 10% растворе формалина. Гистоморфологические исследования глазных яблок проводились в отделе морфологии и патогистологии ФГУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Росмедтехнологий.

Для проведения флуоресцентно-микроскопического исследования сетчатки глаз кроликов после введения в витреальную полость липосом, меченных флуоресцентной меткой модифицированного липида НБД-ФЭ, исследовали замороженные срезы энуклеированных глаз без фиксации с выделением сетчатки. На криокате (Leica) получали замороженные срезы 100 мкм, окрашивали срезы красителем Movial, а затем изучали препараты на сканирующем флуоресцентном микроскопе на базе НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

Работа проведена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Министерства образования и науки (госконтракт № 14.740.11.0120).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Maurice D.M., Mishima S. Ocular pharmacokinetics // In: Handbook of Experimental Pharmacology / Ed. M.L. Sears. – Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 1984. V. 69. P. 16–119.
2. Meisner D., Mezei M. Liposome ocular delivery systems // Adv. Drug Deliv. Rev. 1995. V. 16. P. 75–93.
3. Швеи В.И., Каплун А.П., Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Чехонин В.П. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века // Рос. нанотехнологии. 2008. Т. 3. Вып. 11-12. С. 52–66.
4. Майчук Ю.Ф. Иммунокорригирующая терапия при воспалительных заболеваниях глаз // Офтальмолог. 2008. № 1 (июль–август). С. 20.
5. Christie J.G., Kompella U.B. Ophthalmic light sensitive nanocarrier systems // Drug Discov. Today. 2008. V. 13. P. 124–134.
6. McGhee C.N.J., Dean S., Danesh-Meyer H. Locally administered ocular corticosteroids // Drug Safety. 2002. V. 25. № 1. P. 33–55.
7. Справочник ВИДАЛЬ. – М.: АстраФармСервис, 1999. 1520 с.
8. Кленин В.И., Щеголев С.Ю., Лаврушин В.И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1977. 176 с.
9. Ghee C.N., Watson D.G., Midgley J.M. Penetration of synthetic corticosteroids into human aqueous humor // Eye. 1990. V. 4. № 3. P. 526–530.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К СТРЕПТОМИЦИНУ

А.Б. Пшеничникова, доцент, Е.С. Гаврилова, студент,

В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Изучены электрокинетические и кислотнo-основные свойства поверхности интактных клеток грамотрицательных бактерий – природного чувствительного и мутантного устойчивого к стрептомицину штаммов облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* (*M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+) и гетеротрофной бактерии *Stenotrophomonas maltophilia* – в стандартных условиях и в присутствии олеиновой кислоты. Обнаружена способность олеиновой кислоты ускорять рост и адаптацию к антибиотическому стрессу метилотрофных бактерий. Обсуждается механизм резистентности к стрептомицину.

The surface electrokinetic and potentiometric acid-base properties of whole cells of the gram-negative bacteria – natural sensitive strain and mutant streptomycin-resistant strain of the obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei* (*M. quaylei* MT and *M. quaylei* SM+) and of heterotrophic bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* – in standard growth conditions and in the presence of oleic acid were studied. An ability of oleic acid to accelerate bacterial growth and adaptation of methylotrophic bacteria to the antibiotic stress was discovered. A mechanism of resistance to streptomycin is discussed.

Ключевые слова: метилотрофные бактерии, *Stenotrophomonas maltophilia*, дзета-потенциал бактерий, потенциометрическое титрование бактерий, резистентность к стрептомицину.

Key words: methylotrophic bacteria, *Stenotrophomonas maltophilia*, zeta-potential bacteria, potentiometric acid-base titration of bacteria, streptomycin resistance.

Формирование лекарственной устойчивости у патогенных микроорганизмов является основной причиной распространения инфекционных заболеваний и необходимости разработки все новых и новых поколений антибиотиков, один из первых представителей которых – стрептомицин – использовали как противотуберкулезный препарат, а аминогликозиды II и III поколений и сегодня применяют для лечения нозокомиальных инфекций. Резистентность бактерий к аминогликозидным антибиотикам имеет сложный механизм. В зависимости от вида бактерии возможно ингибирование транспорта антибиотика, изменение его взаимодействия с мишенью – рибосомами, ферментативная модификация молекулы антибиотика [1, 2].

Устойчивость бактерий к антибиотикам повышается в ассоциатах бактерий, например, в биопленках. Такая стратегия выживания предполагает взаимодействие клеточной поверхности бактерий с поверхностью материалов или бактерий между собой. Успешная колонизация большинства тканей невозможна без адгезии патогенных бактерий [3, 4]. На адгезию бактерий к субстратам, в свою очередь, влияют физико-химические свойства поверхности бактерий, к которым относятся, прежде всего, заряд и природа функциональных групп [5, 6].

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование резистентности к стрептомицину и физико-химических свойств клеточной поверхности грамотрицательных аэробных бактерий: природного чувствительного и мутантного устойчивого к стрептомицину

штаммов облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* (*M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+) и гетеротрофной бактерии *Stenotrophomonas maltophilia*. Электрокинетические свойства поверхности бактериальных клеток характеризовали величиной дзета-потенциала, определяющей заряд и способность частиц к агрегации. Определение природы заряженных групп на поверхности клеток проводили методом быстрого потенциометрического титрования суспензии клеток. Выбор бактерий обусловлен, прежде всего, их различной устойчивостью к стрептомицину. Кроме этого, облигатная метилотрофная бактерия *M. quaylei* является удобной моделью для изучения влияния экзогенных добавок, модифицирующих клеточную поверхность, так как не способна утилизировать в качестве источника углерода органические соединения за исключением метанола. Бактерия *S. maltophilia* является распространенным возбудителем нозокомиальных инфекций [7], что обусловлено, возможно, необычным положительным зарядом поверхности этих бактерий, способствующим адгезии [8].

Результаты и их обсуждение

Бактерии культивировали в присутствии стрептомицина. За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности культуральной жидкости D при длине волны 600 нм от времени («D₆₀₀ – время»). Удельную скорость роста рассчитывали, как тангенс угла наклона прямой в полулогарифмических координатах «ln D₆₀₀ – время». Резистентность бактерий к

стрептомицину определяли по величине полулетальной концентрации стрептомицина, соответствующей удельной скорости роста, равной половине максимальной (рис. 1). Полулетальная концентрация стрептомицина для *M. quaylei* SM+ оказалась самой высокой (4.40 мг/мл), для *M. quaylei* MT – самой низкой ($5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). *S. maltophilia* занимает промежуточное положение по устойчивости к антибиотику между чувствительным и устойчивым штаммами (1.30 мг/мл).

Достаточно высокая устойчивость к аминогликозидам у *S. maltophilia* может быть обусловлена несколькими механизмами. Некоторые штаммы *S. maltophilia*, по данным [9], обладают дегуанидазой – ферментом, который способен отщеплять гуанидиновые группы в молекуле стрептомицина с образованием метил-амин, и могут использовать стрептомицин в качестве субстрата. Большое значение в формировании устойчивости к аминогликозидам у *S. maltophilia* имеет ограничение транспорта антибиотиков этого класса в клетку [7] и система активного эффлюкса [10, 11].

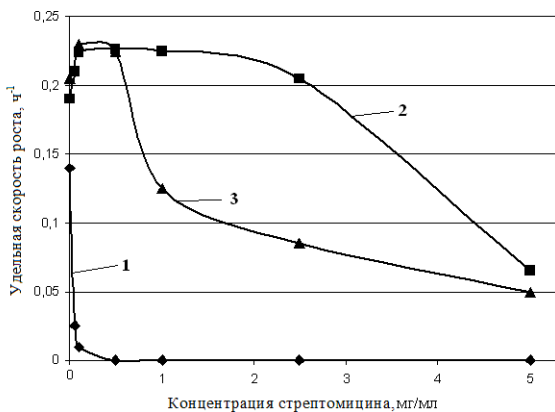


Рис. 1. Влияние стрептомицина на рост бактерий: 1 – *M. quaylei* MT; 2 – *M. quaylei* SM+; 3 – *S. maltophilia*.

Ранее нами было обнаружено, что экзогенные жирные кислоты и их метиловые эфиры являются ростовыми факторами и адаптогенами метилотрофной бактерии *M. quaylei* MT, т.е. ускоряют рост и повышают ее выживаемость в условиях осмотического стресса [12]. Наибольший эффект проявила олеиновая кислота (ОК). Добавление в питательную среду олеиновой кислоты в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М существенно увеличивало выход биомассы и удельную скорость роста метилотрофных бактерий. Влияние олеиновой кислоты на ростовые характеристики *S. maltophilia* и *M. quaylei* SM+ изучено не было, поэтому мы исследовали сравнительную кинетику роста *M. quaylei*, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* в присутствии ОК (рис. 2). Интервал концентраций ОК выбирали, исходя из значений критической концентрации мицеллообразования (ККМ) для жирных кислот,

составляющую величину порядка $5 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ М [13]. Кроме этого, учитывали известный факт, что в культуральной жидкости бактерий присутствуют свободные жирные кислоты в концентрациях не более $2 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-4}$ М [12, 14], то есть в виде отдельных молекул.

В результате было установлено, что экзогенная олеиновая кислота ускоряет рост *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+, что согласуется с данными [12], и практически не влияет на рост *S. maltophilia* (см. рис. 2).

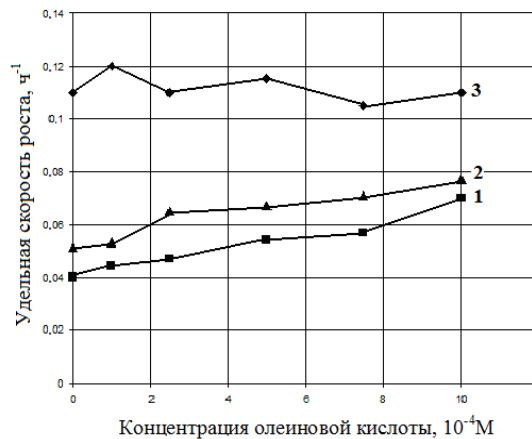


Рис. 2. Влияние экзогенной олеиновой кислоты на рост бактерий: 1 – *M. quaylei* MT; 2 – *M. quaylei* SM+; 3 – *S. maltophilia*.

Для изучения влияния олеиновой кислоты на адаптацию бактериальных клеток к антибиотическому (стрептомициновому) стрессу была определена выживаемость *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ на метанолсодержащих твердых питательных средах, содержащих стрептомицин (табл. 1). Рост *S. maltophilia* практически не зависел от концентрации стрептомицина в питательной среде, поэтому этот штамм в эксперимент включен не был. На твердые среды высевали клетки, выращенные на жидкой питательной среде либо в стандартных условиях, либо в присутствии $5.0 \cdot 10^{-5}$ М олеиновой кислоты. Определение выживаемости *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ осуществляли методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), как описано в [12]. Концентрации стрептомицина выбирали близкие к полулетальным: для *M. quaylei* MT – 0.01 мг/мл; для *M. quaylei* SM+ – 2 и 4 мг/мл. Результаты эксперимента представлены в табл. 1. Бактерии, выращенные в присутствии ОК, обладали повышенной выживаемостью на твердой питательной среде, содержащей стрептомицин, что свидетельствует об ускоряющем и адаптогенном действии ОК на *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+.

Метод подсчета КОЕ на метанолсодержащей среде исключает возможный вклад гетеротрофных контаминантов, содержание которых могло увеличиваться в присутствии гидро-

фобных добавок, поэтому полученные результаты являются достоверными. Результаты, полученные по данным определения оптической плотности на жидких питательных средах (рис. 2), таким образом, получают дополнительное подтверждение.

Далее мы исследовали заряд клеточной поверхности штаммов *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia*. Его определяли по электрокинетическому потенциалу ζ – дзета-потенциалу, который, в свою очередь, может быть рассчитан по подвижности бактерий в

электрическом поле [3, 5]. При значениях pH ниже изоэлектрической точки (ИЭТ) целых клеток заряд бактериальной поверхности положителен. ИЭТ большинства бактерий находится в интервале 1.5–4.5 [15], поэтому при физиологических значениях pH поверхность большинства бактерий заряжена отрицательно. Интересно, что ИЭТ бактерии *S. maltophilia*, по данным [8], составляет величину 11 единиц, поэтому поверхность клеток *S. maltophilia* при pH < 11, т.е. в физиологических условиях, заряжена положительно.

Таблица 1. Влияние экзогенной олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) в составе жидкой среды культивирования на выживаемость *M. quaylei* и *M. quaylei* SM+ на твердых средах в присутствии стрептомицина.

Штамм	Выживаемость, %					
	Концентрация стрептомицина, мг/мл					
	0.01		2.0		4.0	
	без ОК	в прис. ОК	без ОК	в прис. ОК	без ОК	в прис. ОК
<i>M. quaylei</i> MT	46.9±2.28	66.5±1.15	0	0	0	0
<i>M. quaylei</i> SM+	82.6±1.66	100.2±1.81	61.4±1.86	105.6±2.02	39.1±0.78	52.3±2.63

Величину ζ -потенциала бактерий, выращенных в стандартных условиях и в присутствии экзогенной олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М), определяли в 0.1 М растворе KCl при различных значениях pH (табл. 2). В отсутствие ОК значения ИЭТ для *S. maltophilia* – 9.5, а для метилотрофов – около 2, поэтому поверхность клеток *S. maltophilia* заряжена положительно при pH < 9.5, а у метилотрофных бактерий – отрицательно при pH > 2.0. Эти результаты согласуются с данными [8, 15]. Наличие положительного заряда на поверхности *S. maltophilia* электростатически затрудняет адсорбцию стрептомицина, представленного при pH 7.0 в основном протонированными молекулярными формами (pK_a стрептомицина 8.7 [16]). Это, очевидно, является дополнительной причиной высокой резистентности данных бактерий к стрептомицину.

Величина ζ -потенциала клеток *M. quaylei* SM+ во всем диапазоне pH несколько выше, чем у *M. quaylei* MT (табл.2), т.е. отрицательный заряд меньше. Добавление ОК в среду культивирования приводит к увеличению отрицательного заряда клеток, наиболее существенно – для *M. quaylei* SM+, для *S. maltophilia* – менее чем на 1 мВ. Поскольку последняя бактерия является гетеротрофной, ОК может ею утилизироваться. Тогда как метилотрофные бактерии, возможно, включают ОК в наружную мембрану, как это наблюдается при взаимодействии ОК с липосомами [17].

Для проверки этого предположения нами были определены значения ζ -потенциала клеток исследуемых штаммов, обработанных буферным раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Таблица 2. Значения ζ -потенциала бактерий *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* при различных pH в 0.1 М KCl.

Штамм	Содержание ОК в среде культивирования, М	ζ -потенциал, мВ				
		Значение pH				
		1.9	3.4	7.0	9.6	11.0
<i>M. quaylei</i> MT	-	7.25	-33.80	-40.97	-49.38	-52.16
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	-*	-37.40	-44.48	-54.31	-
<i>M. quaylei</i> SM+	-	15.85	-32.17	-39.03	-40.81	-42.18
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	-	-45.39	-54.56	-56.62	-
<i>S. maltophilia</i>	-	6.09	0.14	0.71	-0.85	-26.58
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	-	-1.82	-0.42	-1.19	-

* При pH 1.9 и 11.0 измерения для клеток, выращенных в присутствии ОК, не проводили.

Как известно, БСА связывает жирные кислоты [18], однако ζ -потенциал клеток, обработанных БСА и выращенных в стандартных условиях и в присутствии ОК, увеличивался незначительно (менее чем на 2%). Это свидетельствует о более прочном, по сравнению с электростатическим, связывании ОК с поверхностью и подтверждает предположение о включении ОК в наружную мембрану, которая приобретает дополнительные СОО-группы на своей поверхности. Более положительные значения ζ -потенциала бактерий *M. quaylei* SM+, чем у *M. quaylei* MT, могут отражать изменившееся в сторону увеличения соотношение N/P

(белок/липополисахарид) у мутантного штамма [19].

Включение олеиновой кислоты в мембрану может оказывать влияние на размер частиц. Мы определили размеры бактериальных агрегатов методом динамического рассеяния света с использованием фотон-корреляционной спектроскопии (табл. 3). Для *M. quaylei* обнаружено образование многоклеточных кластеров, которые формируются, возможно, за счет взаимной адгезии. Экзогенная ОК уменьшает размер бактериальных конгломератов, т.е. является антиадгезином. Этот эффект может быть основной причиной ускорения роста бактерий в присутствии ОК.

Таблица 3. Размер агрегатов бактерий *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* при различных значениях pH и ионной силе 0.1 М.

Штамм	Содержание ОК в среде культивирования, М	Размер агрегатов, мкм		
		pH 3.4	pH 7	pH 9.6
<i>M. quaylei</i> MT	-	4.837	7.318	3.696
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	1.567	4.411	1.379
<i>S. maltophilia</i>	-	1.121	1.144	1.173
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	1.228	1.004	1.347
<i>M. quaylei</i> SM+	-	3.360	1.191	5.298
	$5.0 \cdot 10^{-5}$	3.161	1.037	4.187

Изучение кислотно-основных свойств функциональных групп клеточной поверхности штаммов *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* осуществляли методом быстрого потенциометрического титрования суспензии клеток в среде 0.001 М KCl и 0.1 М HCl раствором 1 М КОН. Концентрация титранта была выбрана таким образом, чтобы конечное изменение объема титруемого раствора не превышало 10-11%. Быстрое титрование обеспечивало взаимодействие с титрантом только функциональных групп, находящихся на поверхности клеток [15]. В качестве контроля использовали титрование в отсутствие клеток.

Значения рКа заряженных групп на поверхности бактериальной клетки определяются по величинам pH, при которых титруют поверхностные функциональные группы [6, 20, 21]. Для этого проводили анализ кривых титрования бактериальных суспензий (рис. 3а). Точки эквивалентности на кривых титрования проявляются в виде скачков pH, однако корректно определить значения pH, соответствующих значениям рКа заряженных групп, по кривым титрования невозможно. Для этого обычно кривую титрования дифференцируют. Положение точек перегиба на кривой титрования соответствует максимумам на дифференциальных кривых титрования в координатах « $\delta\text{pH}/\delta\text{meqH}^+ - \text{pH}$ », где δpH – разница значений pH между исследуемым и

контрольным образцами при заданном объеме титранта; δmeqH^+ – разница объемов титранта, затраченного на титрование бактериальной суспензии и контрольного раствора при заданном значении pH. Дифференциальные кривые титрования дисперсий *M. quaylei* MT, *M. quaylei* SM+ и *S. maltophilia* представлены на рис. 3б.

Авторами работы [6] по данным потенциометрического титрования поверхности грам-отрицательных бактерий были рассчитаны значения рКа, составившие 3.72 (карбоксил/фосфодиэфир), 4.85 (карбоксил), 6.56 (фосфорил), 8.79 (амин). На поверхности *S. maltophilia* были обнаружены группы с рКа 7.0 и 9.0, которые могут принадлежать белкам наружной мембраны (боковые аминокислоты лизина и аргинина и терминальные аминокислоты белка). По-видимому, именно белки ответственны за положительный заряд *S. maltophilia* [8].

У *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ обнаружены группы с рКа 3.5-4, что характерно для карбоксильных и фосфатных групп липополисахарида клеточной стенки грамотрицательных бактерий (рис. 3б) [6], и положительно заряженные при нейтральных значениях pH группы с рКа 8.0-9.0. Клетки устойчивого к стрептомицину штамма *M. quaylei* SM+ имеют на поверхности группы с рКа 9.0, возможно, принадлежащие мембранным белкам, участвующим в формировании резистентности к стрептомицину.

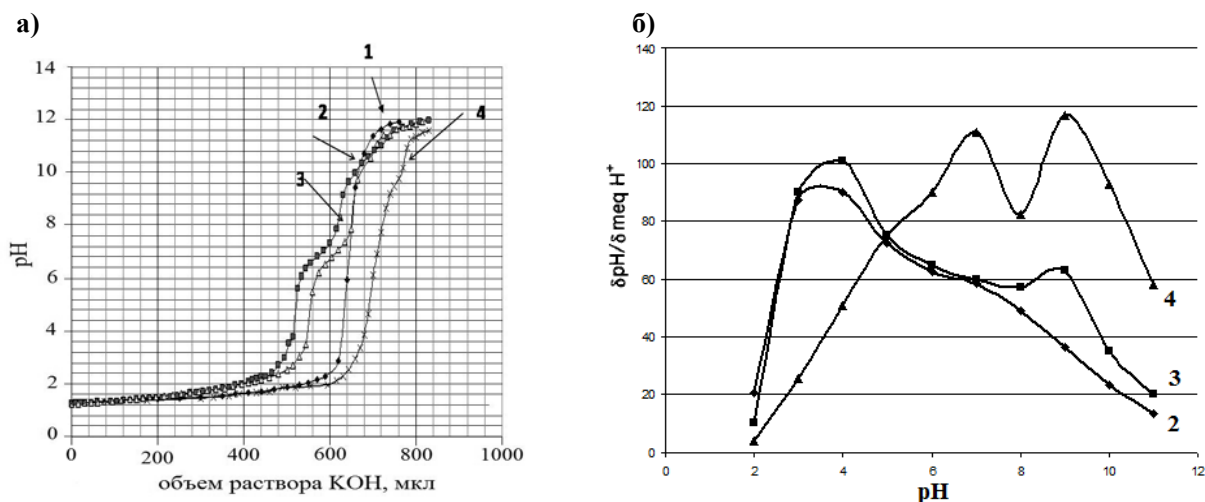


Рис. 3. Быстрое потенциметрическое титрование целых клеток в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 1 М КОН: 1 – без клеток (контроль); 2 – *M. quaylei* MT; 3 – *M. quaylei* SM+; 4 – *S. maltophilia*. а) Кривые титрования; б) дифференциальные кривые титрования.

Добавление к клеткам в процессе роста олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) изменяет ход кривых титрования метилотрофных бактерий (рис. 4), на которых обнаруживаются максимумы при pH 5 (*M. quaylei* SM+) и 6 (*M. quaylei* MT). Можно предположить, что они могут быть отнесены к карбоксильным группам включившейся в наружную мембрану олеиновой кислоты, pK_a которой в зависимости от окружения изменяется от 4 до 7 [23]. В комплексе ОК с БСА ее карбоксильная группа имеет pK_a

4.2, в фосфолипидном бислое – 7.5, в липидной микроэмульсии – 7.3 [22].

Для отнесения максимумов при pH 5 и pH 6 на дифференциальных кривых титрования (рис. 4б) нами было проведено титрование липосом из фосфатидилхолина (ФХ) и олеиновой кислоты в соотношении ФХ:ОК 1000:1 (рис. 5), результаты которого подтвердили предположение об их принадлежности к карбоксильным группам ОК в составе биологической мембраны.

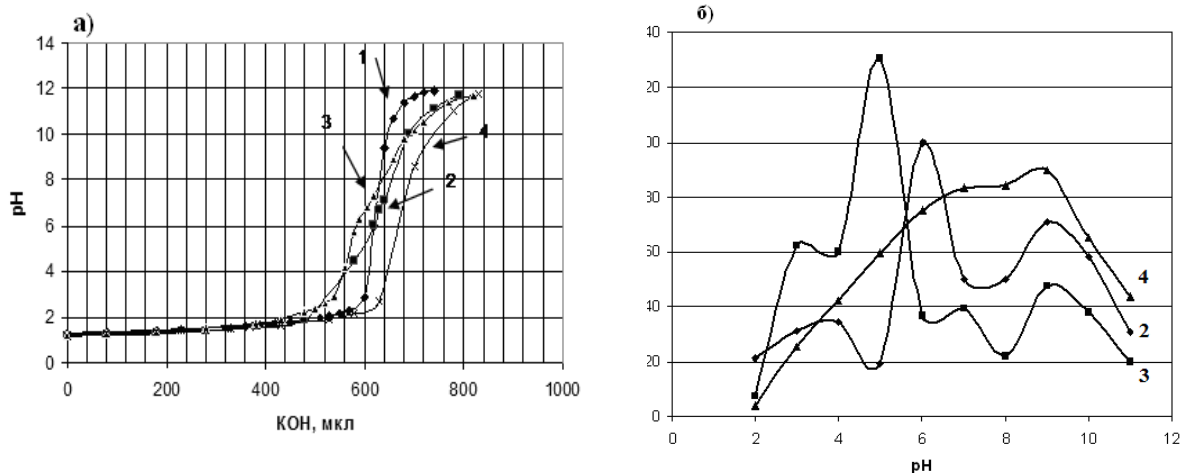


Рис. 4. Быстрое потенциметрическое титрование целых клеток, выращенных в присутствии ОК ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М), в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 1 М КОН: 1 – без клеток (контроль); 2 – *M. quaylei* MT; 3 – *M. quaylei* SM+; 4 – *S. maltophilia*.

а) Кривые титрования; б) дифференциальные кривые титрования.

Значение pK_a олеиновой кислоты, локализованной в фосфолипидном бислое, зависит от функционального окружения карбоксильной группы, т.е. от состава фосфолипидов и присутствия белков. Например, значения pK_a карбоксильных групп трансмембранного белка *Lactococcus lactis* LmrP – антипортера широкого ряда антибиотиков – определяются присутствием фосфатидилэтаноламина (ФЭ), главного компонента мембраны этих бактерий [23]. Так, pK_a в

отсутствии ФЭ составляет величину 4.6, в присутствии ФЭ – 6.5. ФЭ способствует взаимодействию карбоксильных групп с мембраной и конформационным изменениям белка, определяющим его антипортерную функцию. Таким образом, полученное нами более низкое значение величины pK_a (5.0) для мутантного штамма, возможно, свидетельствует о более слабом взаимодействии ОК с мембраной, что подтверждается опытом с БСА.

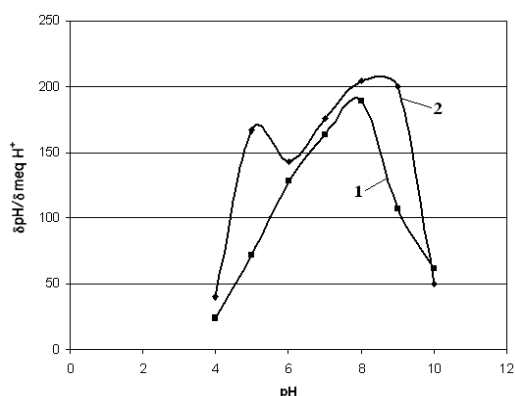


Рис. 5. Дифференциальные кривые титрования дисперсий липосом в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 1 М КОН. Состав липосом: 1 – ФХ; 2 – ФХ:ОК 1000:1 (г/г).

Степень влияния свойств клеточной поверхности на резистентность к стрептомицину необходимо оценивать в присутствии антибиотика, поскольку молекула стрептомицина содержит ионогенные группы и может взаимодействовать с заряженными группами на поверхности (рис. 6). Тем более, что клетки *M. quaylei* SM+, обладающие наибольшей резистентностью к стрептомицину, всегда выращивали в присутствии стрептомицина (обязательный компонент питательной среды).

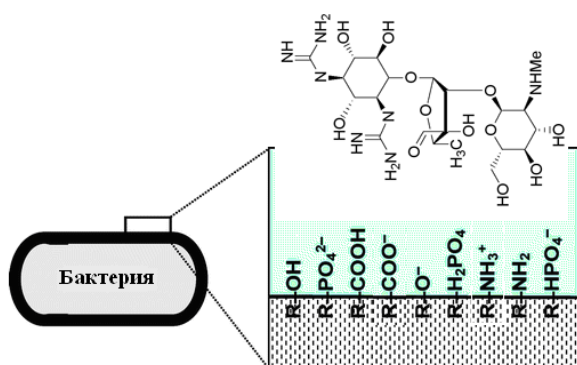


Рис. 6. Схема взаимодействия молекулы стрептомицина с функциональными группами на поверхности бактериальной клетки.

Для проведения сравнительного исследования *M. quaylei* MT и *S. maltophilia* культивировали в присутствии стрептомицина в высоких концентрациях ($8.5 \cdot 10^{-5}$ М). Дифференциальные кривые титрования представлены на рис. 7. Дифференциальные кривые титрования *M. quaylei* MT и *S. maltophilia*, выживших в присутствии стрептомицина, свидетельствуют об увеличении содержания функциональных групп с pK_a 8.0 у *M. quaylei* MT и снижении содержания групп с pK_a 9.0 у *S. maltophilia* в процессе адаптации к стрептомицину. Возможно, в присутствии стрептомицина изменяется структура поринов – интегральных белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий, ответственных за

транспорт стрептомицина в клетку, и проницаемость для стрептомицина уменьшается. Интересно, что аналогичные процессы протекают в присутствии ОК (см. рис. 4б).

Таким образом, появление на клеточной поверхности всех исследованных штаммов грамотрицательных бактерий – и в присутствии стрептомицина, и в присутствии олеиновой кислоты – функциональных групп с pK_a 8.0-9.0, характерными для аминокислотных групп белковых молекул, возможно, обуславливает повышение устойчивости этих бактерий к стрептомицину.

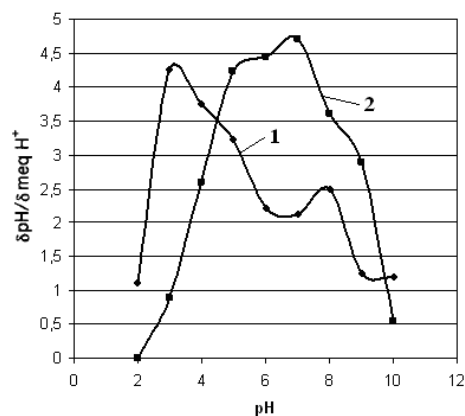


Рис. 7. Дифференциальные кривые титрования бактерий, выращенных в присутствии $8.5 \cdot 10^{-5}$ М стрептомицина, в среде 0.001 М КСl и 0.1 М НСl раствором 0.1 М КОН: 1 – *M. quaylei* MT; 2 – *S. maltophilia*.

Экспериментальная часть

В работе использовали облигатную метилотрофную бактерию *Methylophilus quaylei*, (штамм MT B-2338^T (ВКМ) и полученный ранее штамм SM+, устойчивый к стрептомицину) и бактерию *Stenotrophomonas maltophilia*, выделенные нами из утилизирующей метанол смешанной культуры [24]. Для культивирования метилотрофных бактерий использовали минеральную среду, содержащую 1 об.% метанола [12], для культивирования *S. maltophilia* метанол заменяли триптоном-бакто, 1 мас.% (Becton Dickinson, США). Для получения плотных питательных сред добавляли 1.5% агара (Becton Dickinson, США) Введение олеиновой кислоты в стерильную питательную среду осуществляли в виде метанольных растворов асептически после пропускания через мембранные фильтры 0.22 мкм Millex[®] GS, (Millipore, Ирландия).

Для приготовления питательных сред использовали реактивы отечественного производства («х. ч.»). Примеси насыщенных жирных кислот в коммерческой олеиновой кислоте («ч.», Химмед, Россия) удаляли при температуре -18°C осаждением из ацетона, олеиновую кислоту выделяли в виде комплекса с мочевиной как описано [25].

Бактерии выращивали в колбах объемом 250 мл (100 мл среды) на шейкере (Labline, США) при 100 об/мин и 28°C. В качестве инокулята использовали 28-часовую культуру в экспоненциальной фазе роста в количестве 2.5 об.%. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (Beckman DU-7, США) при λ 600 нм в кювете ($l = 10$ мм). Для определения кинетических параметров анализировали кривые роста бактерий « $D_{600} - \tau$ », где D_{600} – оптическая плотность культуральной жидкости при 600 нм, τ – время культивирования. Удельную скорость роста находили как тангенс угла наклона прямой в координатах « $\ln D_{600} - \tau$ » в интервале времени от 3 до 9 ч. Достоверность полученных данных оценивали по t-критерию Стьюдента. Диапазон экспериментальных ошибок определения величины удельной скорости роста не превышал 2%.

Для культивирования штамма *M. quaylei* SM+ в стандартную среду до внесения инокулята добавляли также стерильный раствор сульфата стрептомицина (AppliChem, Германия), который растворяли в стерильной дистиллированной воде и добавляли в питательную среду через 2 ч после засева бактерий. Выделение биомассы из культуральной жидкости проводили центрифугированием (15 мин при 7000 об/мин).

Выживаемость *M. quaylei* определяли высевом клеточных суспензий в семикратном разведении на стандартную агаризованную среду в оптимальных для роста условиях, а также на агаризованную среду, содержащую стрептомицин в заданной концентрации. Оптимальные для роста условия: для штамма *M. quaylei* MT – стандартные, в отсутствие стрептомицина; для штамма *M. quaylei* SM+ – в присутствии стрептомицина (1 мг/мл). На агаризованные питательные среды (2 чашки Петри со стандартной средой и содержащей стрептомицин) высевали суточную культуру, выращенную в жидкой питательной среде в присутствии $5.0 \cdot 10^{-5}$ М олеиновой кислоты, а также без добавок (контроль). Выживаемость (В) *M. quaylei* рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{N_c}{N_o} \cdot 100\%,$$

где N_c – число колоний на агаризованной среде, содержащей стрептомицин; N_o – число колоний на агаризованной среде в оптимальных для роста условиях.

Все эксперименты повторяли не менее 5 раз, рассчитывая каждое экспериментальное значение из 2-3 одновременно поставленных повторностей. Достоверность полученных данных оценивали по t-критерию Стьюдента. Диапазон экспериментальных ошибок определения величины удельной скорости роста не превышал 5%.

Измерение ζ -потенциала, электрофоретической подвижности и размеров бактериальных агрегатов проводили на приборе Delsa™ Nano Series Zeta Potential and Submicron Particle Size Analyzers (Beckman Coulter Inc., США) методом электрофоретического рассеяния под углом 30° по изменению распределения частиц в электрическом поле. Бактерии культивировали 48 ч в стандартных условиях и в присутствии олеиновой кислоты ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М), центрифугировали (10 мин, 7000 об/мин) (0.6-0.9 г сухой биомассы) и четыре раза промывали 0.1 М KCl с добавлением KOH или HCl в зависимости от заданного значения pH.

Для потенциометрического титрования проводили культивирование бактерий в течение 48 ч до достижения D_{600} 1.0-1.2 (0.6-0.9 г сухой биомассы). Биомассу отделяли центрифугированием и дважды промывали 0.001 М KCl, после чего отбирали 20 мл раствора и добавляли 152 мкл конц. HCl для получения 0.1 М HCl. Отбирали 6 мл раствора и проводили титрование 1 М раствором KOH в течение 10-15 мин (таким образом, чтобы суммарный объем добавляемого титранта был не более 10% от общего объема). Те же операции (кроме центрифугирования) проводили с 0.001 М KCl в качестве контроля. Строили кривые титрования в координатах «pH – V_{KOH} ». Титрование липосом проводили, начиная с pH 3.5, т.к. в более кислой области липосомы не устойчивы. Для получения дифференциальных кривых титрования рассчитывали δV_{KOH} (разницу объемов раствора KOH, затраченных на титрование исследуемого и контрольного образцов) при заданных значениях pH – молярный эквивалент концентрации H^+ , $meqH^+$. Далее определяли δpH – разницу значений pH между исследуемым и контрольным образцами при заданном значении V_{KOH} . Для этого брали точку на контрольной кривой с заданным значением pH и находили разность значений pH между этой точкой и значением pH образца. Затем находили величину « $\delta pH / \delta meqH^+$ ».

Заключение

Поверхность клеток метилотрофных бактерий *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM+ в физиологических условиях заряжена отрицательно, тогда как клетки *S. maltophilia* имеют слабый положительный заряд, обусловленный, возможно, экспонированием аминокислотных мембранных белков. Адаптация к стрептомицину сопровождается уменьшением отрицательного заряда клеточной поверхности бактерий. Олеиновая кислота – ростовой фактор и адаптоген метилотрофной бактерии *M. quaylei* – связывается с поверхностью метилотрофных штаммов, экспонируя на нее карбоксильные группы, и не обнаруживается на поверхности гетеротрофной бактерии *S. maltophilia*. Экзогенная олеиновая кислота уменьшает размер

бактериальных конгломератов, что может быть основной причиной ускорения роста бактерий в ее присутствии.

Таким образом, настоящая работа открывает возможности поиска биологически активных нетоксичных соединений, способных влиять на

свойства поверхности, патогенность и резистентность бактерий к антибиотикам.

Работа выполнена в рамках АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (госконтракт № 3.1.1/9247).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kruger A. Biologisch-naturheilkundliche Behandlung von Infektionskrankheiten // Veröffentlicht in Heilpraktiker und Volksheilkunde. 2000. № 7-8. P. 1–13.
2. Martin R.G., Rosner J.L. Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2002. V. 44. P. 1611–1624.
3. Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A.J.B. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. P. 1898–1901.
4. de Kerchove A.J., Elimelech M. Relevance of electrokinetic theory for «soft» particles to bacterial cells: Implications for bacterial adhesion // Langmuir. 2005. V. 21. P. 6462–6472.
5. Hong Y., Brown D.G. Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface // Langmuir. 2008. V. 24. № 9. P. 5003–5009.
6. Leone L., Ferri D., Manfredi C., Persson P., Shchukarev A., Sjöberg S., Loring J. Modeling the acid-base properties of bacterial surfaces: A combined spectroscopic and potentiometric study of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // Environ. Sci. Technol. 2007. V. 41. № 18. P. 6465–6471.
7. Denton M., Kerr K.G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia* // Clin. Microbiol. Rev. 1998. V. 11. P. 57–80.
8. Jucker B.A., Harms H., Zehnder A.J.B. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and teflon // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 18. P. 5472–5479.
9. Fenton J.J., Harosch H.H., Klein D. Production of volatile nitrogenous compound from the degradation of streptomycin by *Pseudomonas maltophilia* // J. Bacteriol. 1973. V. 116. P. 1267–1272.
10. Zhang L., Xian-Zhi L., Poole K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a multidrug efflux system // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 287–293.
11. Alonso A., Martinez J.L. Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. V. 45. P. 1879–1881.
12. Терехова Е.А., Степичева Н.А., Пшеничникова А.Б., Швецов В.И. Метилловый эфир стеариновой кислоты – новый внеклеточный метаболит облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* // Прикл. биохимия и микробиол. 2010. Т. 46. № 2. С. 180–186.
13. Mukerjee P., Mysels K.J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems // Nat. Stand. Ref. Data Ser., Nat. Bur. Stand. (U.S.). – Washington, 1971. № 36. 227 p.
14. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживаемости бактерий. – М.: Медицина, 2005. С. 56–57.
15. Van der Wal A., Norde W., Zehnder A.J.B., Lyklema J. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria // Colloid & Surface B. 1997. V. 9. P. 81–100.
16. Talbot P.A. Potentiation of aminoglycoside-induced neuromuscular blockade by protons *in vitro* and *in vivo* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1987. V. 241. P. 686–694.
17. Yamaguchi T., Nishizaki K., Itai S., Hayashi H., Oshima H. Physicochemical characterization of parental lipid emulsion: Influence of cosurfactants on flocculation and coalescence // Pharm. Res. 1995. V. 12. P. 1273–1279.
18. Bojesen I.N., Bojesen E. Binding of arachidonate and oleate to bovine serum albumin // J. Lipid Res. 1994. V. 35. P. 770–778.
19. Boonaert C.J.P., Rouxhet P.G. Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2548–2554.
20. Martinez R.E., Smith D.S., Kulczycki E., Ferris F.G. Determination of intrinsic bacterial surface acidity constants using a donnan shell model and a continuous pKa distribution method // J. Colloid & Interface Sci. 2002. V. 253. P. 130–139.
21. Salton M.R.J. The Bacterial Cell Wall. – Amsterdam: Elsevier, 1964. 114 p.
22. Small D., Cabral D.J., Cistola D., Parks J., Hamilton J. The ionization behavior of fatty acids and bile acids in micelles and membranes // Hepatology. 1984. V. 4. № 5. P. 77S–79S.
23. Gbaguidi B., Hakizimana P., Vandenbussche G., Ruysschaert J.-M. Conformational changes in a bacterial multidrug transporter are phosphatidylethanolamine-dependent // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 1571–1582.
24. Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V. *Methylophilus quaylei* sp. nov., a new aerobic obligatory methylotrophic bacterium // System. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 303–309.
25. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. – М.: Мир, 1970. Т. 2. С. 320.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОТРОФИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Л.М. Рафиева, младший научный сотрудник, **Д.Р. Сафина, ассистент,
научный сотрудник, **И.В. Демидюк, доцент, старший научный сотрудник,
**С.В. Костров, профессор, директор института

* лаборатория Белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН

** кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: duk@img.ras.ru

Клонированы гены фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и нейротрофического фактора 3 (NT-3) человека и осуществлена их экспрессия в клетках *Escherichia coli*. Разработаны схемы очистки и ренатурации соответствующих пробелков. Продемонстрировано, что рекомбинантные про-NGF, про-BDNF, про-NT-3 оказывают дифференцирующее действие на культуру спинномозговых ганглиев эмбрионов кур.

The genes of nerve growth factor (NGF), brain neurotrophic factor (BDNF) and human neurotrophic factor 3 (NT-3) were cloned and expressed in Escherichia coli. Methods of purification and renaturation of the proneurotrophins were developed. It was shown that the recombinant pro-NGF, pro-BDNF and pro-NT-3 induce a differentiation of chicken dorsal root ganglia cell culture.

Ключевые слова: экспрессия, ренатурация, рекомбинантные proneйротрофины человека, последовательность, органотипичная культура спинномозговых ганглиев эмбрионов кур.

Key words: expression, renaturation, recombinant human proneurotrophins, prosequence, chicken dorsal root ganglia.

Введение

Нейротрофины – это семейство высококонсервативных димерных полипептидных факторов роста, которые регулируют развитие и функционирование разнообразных популяций нейронов. Обнаружено влияние этих белков на выживание, миграцию и пролиферацию нейронов, рост и ветвление дендритов и аксонов, пластичность синапсов, а также на активность ионных каналов и рецепторов нейромедиаторов [1]. Концентрации нейротрофинов в тканях изменяются при различных нейродегенеративных заболеваниях и повреждениях нервной системы [2, 3].

В настоящее время описан ряд нейротрофинов различного происхождения. У человека известно четыре представителя этого семейства белков: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофические факторы 3 (NT-3) и 4/5 (NT-4/5) [4–6], из них наиболее изучены NGF, BDNF и NT-3.

Нейротрофины синтезируются в клетке в форме препробелков, которые, кроме участка, соответствующего зрелому фактору, содержат сигнальный пептид и пропептид размером 105–120 аминокислотных остатков (а.к.о.). Последовательности зрелых нейротрофинов человека, состоящие из 119–121 а.к.о., высокомолекулярны и имеют около 55% идентичных а.к.о. [7]. Все зрелые белки выделены из природных источников в виде негликозилированных гомодимеров. По своей пространственной структуре нейротрофины относятся к семейству белков, пространственная укладка которых известна как «цистиновый узел». Основу этой укладки сос-

тавляет образованный двумя дисульфидными связями мегацикл, пронизанный еще одной дисульфидной связью [8].

Процессинг молекулы предшественника происходит в консервативном для всех членов семейства нейротрофинов сайте после последовательности Arg-Xaa-Arg/Lys-Arg. Этот процесс осуществляют субтилизин/кексин-подобные пробелок-конвертазы: фурин, PACE4 и PC5/6-B [9]. Функциональная роль пропептидов нейротрофинов до настоящего времени не установлена. Высказано предположение, что они могут выполнять функции фолдинг-ассистентов, определяя формирование пространственной структуры нейротрофических факторов [10, 11].

Эффекты нейротрофинов реализуются через связывание с тремя типами рецепторов. К первому типу относится семейство тирозинкиназных рецепторов (Trk-рецепторы), ко второму – белок p75 из семейства рецепторов фактора некроза опухоли и к третьему – сортилин. Trk-рецепторы специфично взаимодействуют только со зрелыми, процессированными нейротрофинами. В настоящее время описано три основных типа Trk-рецепторов нейротрофинов: TrkA, TrkB и TrkC. При этом NGF является предпочтительным лигандом для TrkA, BDNF и NT-4/5 – для TrkB, а NT-3 – для TrkC. При определенных условиях NT-3 способен взаимодействовать с TrkA и TrkB, но с более низкой аффинностью, чем с TrkC. Рецептор p75 связывает как зрелые, так и проформы нейротрофинов. При этом он способен связывать все типы нейротрофинов (NGF, BDNF, NT-3 и NT-4/5) с примерно равной

аффинностью. Биологические эффекты в зависимости от того или иного лиганд-рецепторного взаимодействия могут быть прямо противоположными – от повышения жизнеспособности до индуцирования клеточной смерти [12].

Процессинг нейротрофинов *in vivo*, по-видимому, является неполным, и существенные количества предшественников обнаружены в образцах различных тканей [2, 13–18]. Исследование биологической активности предшественников нейротрофинов показало, что для них более предпочтительным является активация рецептора р75, чем Trk-рецепторов, а их действие во многих случаях альтернативно действию зрелого белка. Таким образом, удаление пропептида является не только завершающим актом в формировании зрелого лиганда, но может оказаться механизмом, регулирующим функционирование системы нейротрофинов в целом. Понимание этого явления может внести существенный вклад в изучение причин развития целого ряда тяжелых нейродегенеративных заболеваний.

Существенным препятствием на пути исследования функций предшественников нейротрофинов является их труднодоступность. С одной стороны, эти белки практически невозможно выделить из природных источников. С другой стороны, биологически активные про-нейротрофины сложно получить в гетерологичных экспрессионных системах. Поэтому в настоящее время для продукции пронейротрофинов, как правило, используются эукариотические экспрессионные системы, которые характеризуются низким выходом целевых белков [19–22].

Целью данной работы является получение функционально активных форм предшественников нейротрофинов человека NGF, BDNF, NT-3 с использованием высокоэффективной прокариотической экспрессионной системы.

Результаты и их обсуждение

Для создания рекомбинантных продуцентов участки ДНК, кодирующие препро-нейротрофины NGF, BDNF, NT-3, были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя библиотеку кДНК мозжечка человека в качестве матрицы и праймеры к фланкирующим некодирующим последовательностям. Полученные амплификаты были клонированы в составе плазмидного вектора pUC19.

Экспрессионные векторы для генов про-нейротрофинов были сконструированы на основе плазмиды pET-23с. Во всех случаях на 3'-конец гена были введены дополнительные участки, кодирующие «якорные» последовательности из шести остатков гистидина (His).

Для осуществления высокоэффективной продукции пронейротрофинов полученные экспрессионные векторы были введены в клетки штамма *Escherichia coli* BL-21 (DE3).

Уровень накопления продукта каждого из пронейротрофинов в клетках, оцененный с помощью сочетания электрофоретического анализа и денситометрии, составлял 20–30% от общего содержания внутриклеточных белков. При этом было установлено, что целевые белки локализованы в нерастворимых фракциях, по-видимому, образуя тела включения. На рис. 1 представлены результаты анализа накопления целевого белка на примере про-NT-3.

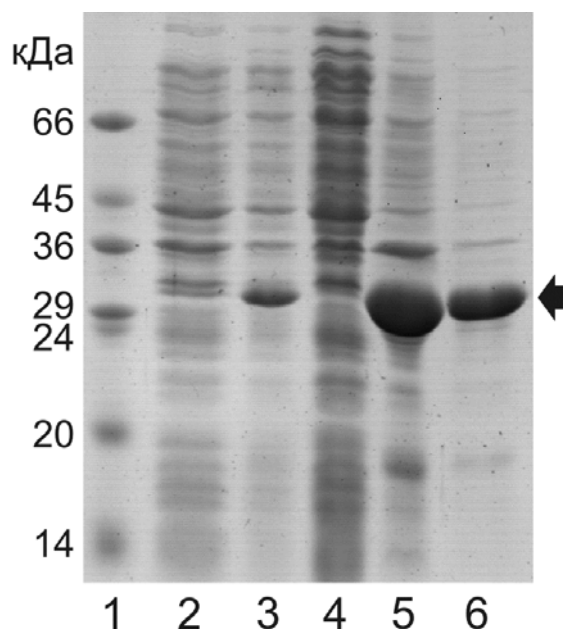


Рис. 1. Электрофоретический анализ накопления нейротрофина про-NT-3. Дорожка 1 – маркеры молекулярных весов. Дорожка 2 – лизат клеток *E. coli* BL-21 (DE3) [pET-23с]. Дорожка 3 – лизат клеток штамма *E. coli* BL-21 (DE3), несущих плазмиду с геном про-NT-3. Дорожка 4 – растворимая фракция после обработки ультразвуком культуры клеток, продуцирующих про-NT-3. Дорожка 5 – нерастворимая фракция после обработки ультразвуком культуры клеток, продуцирующих про-NT-3. Дорожка 6 – экстракт нерастворимой фракции. Стрелкой указано положение целевого белка.

Пронейротрофины, содержащиеся в полученной нерастворимой фракции, были переведены в раствор с использованием 8 М мочевины и очищены при помощи металлохелат-аффинной хроматографии на Ni-содержащем сорбенте. Введенная нами С-концевая шестигистидиновая последовательность позволила получить высокоочищенные препараты про-NGF, про-BDNF и про-NT-3 в одну стадию, при этом выход каждого из белков составлял около 25% (на рис. 2 представлены данные на примере про-NT-3).

Ренатурация предшественников нейротрофинов была осуществлена путем стократного

понижения концентрации денатурирующего агента – мочевины, однократным разведением, после чего до 80% целевого белка оставалось в растворе.

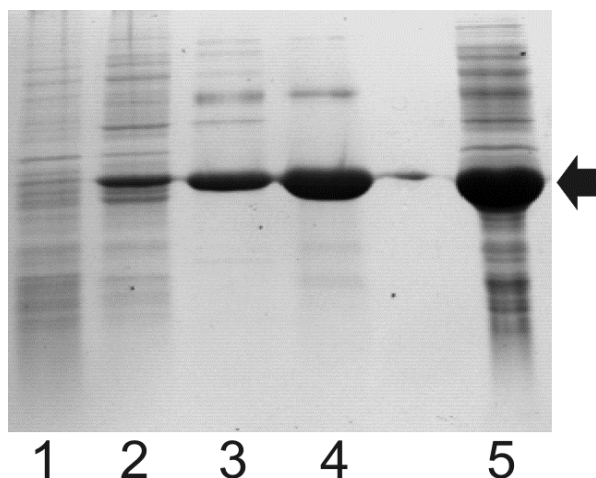
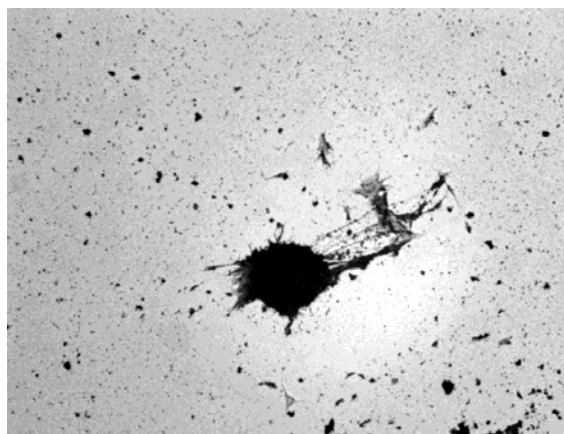
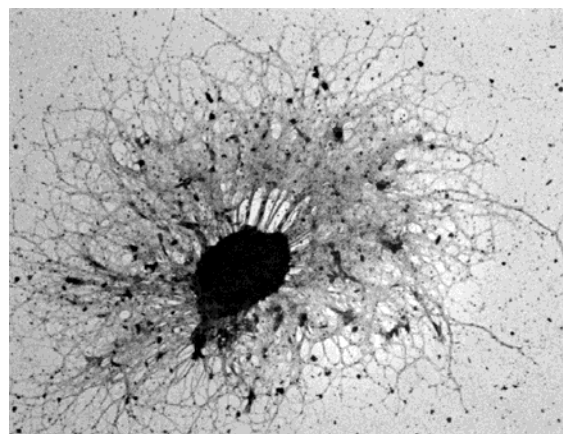


Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций, полученных в ходе очистки про-NT-3 с использованием металлохелат-аффинной хроматографии. Дорожка 1 – белки, не связавшиеся с сорбентом. Дорожка 2 – промывка сорбента буфером, pH 8.0. Дорожка 3 – элюция буфером, pH 6.3. Дорожка 4 – элюция буфером, pH 4.5. Дорожка 5 – образец белка до очистки.

Для тестирования биологической активности пронеуротрофинов были использованы органотипичные культуры эмбриональных куриных спинномозговых ганглиев (СМГ), которые являются классическими объектами для исследования нейрональной дифференцировки.



А



Б

Рис. 3. Дифференцирующее действие про-NT-3 на органотипичную культуру спинномозговых ганглиев эмбрионов кур (возраст эмбрионов – 10 сут). А – спинномозговой ганглий, контроль; Б – спинномозговой ганглий при инкубации с про-NT-3 (100 нг/мл культуральной среды). Культура в обоих вариантах зафиксирована параформом и окрашена метиленовым синим.

Таким образом, нами сконструированы рекомбинантные продуценты предшественников фактора роста нервов, нейротрофического фактора головного мозга и нейротрофического фактора 3 человека на основе клеток *E. coli*. Продемонстрировано, что полученные с использованием созданных продуцентов пронеуротро-

СМГ содержат субпопуляцию относительно небольшого количества нейронов с характерными функциональными, биохимическими и морфологическими признаками. Известно, что NGF, BDNF и NT-3, а также их предшественники способны вызывать рост нейритов в органотипичной культуре СМГ, что обусловлено наличием рецепторов TrkA, TrkB, TrkC [23]. Действие каждого из нейротрофинов на развитие чувствительных нейронов СМГ ограничено определенным периодом эмбриогенеза. Например, выживаемость и дифференцировка клеток как органотипичной, так и диссоциированной культур СМГ зависит от NGF в период с 8-го по 12-ый день развития эмбриона, от BDNF – в период с 3-го по 14-ый день, от NT-3 – на 10-ый день. Таким образом, культура клеток СМГ может быть использована для тестирования биологической активности всех нейротрофических факторов и их предшественников [24–26].

С использованием органотипичной культуры клеток спинномозговых ганглиев куриных эмбрионов (10-ый день развития эмбриона) нами проведена оценка способности про-NGF, про-BDNF и про-NT-3 оказывать дифференцирующее действие. Показано, что все полученные предшественники обладают биологической активностью и способны вызывать дифференцировку нейронов ганглиев. Рис. 3 иллюстрирует дифференцирующее действие рекомбинантных пронеуротрофинов на примере про-NT-3.

фины обладают биологической активностью.

Экспериментальная часть

Штаммы микроорганизмов и векторы. В работе использовали штаммы *E. coli* XL-1 (Blue), *E. coli* BL-21 (DE3), вектор pUC19 и экспрессионный вектор pET-23c (Invitrogen, США).

Ферменты и реактивы. В работе исполь-

зованы *Taq*-ДНК-полимераза (НПФ «Литех», Россия), *Pfu*-ДНК-полимераза, эндонуклеазы рестрикции, Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа и дезоксинуклеозидтрифосфаты (Promega, США). Маркеры молекулярных масс белков для электрофореза (*M*, кДа): бычий сывороточный альбумин (66), яичный альбумин (45), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (36), карбоксиангидраза (29), трипсиноген (24), соевый ингибитор трипсина (20.1), молочный α -альбумин (14.2) (Sigma, США); олигонуклеотиды (Синтол, Россия), трис(гидроксиметил)аминометан, трисгидрохлорид, хлорид магния, минеральное масло, краситель бромистый этидий (Sigma, США), агароза-LE (USB, США), бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия), Кумасси бриллиантовый синий G-250 (Loba, Австрия), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (Helicon, Россия), 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (Fluka, США), культу-

ральная среда F-14, сыворотка лошади, гентамицин, фосфатно-солевой буфер (Биолот, Россия), а также антибиотики отечественного производства. Остальные реагенты категории «х. ч.» отечественного производства.

Клонирование генов нейротрофинов. В работе использовали кДНК, полученную с помощью обратной транскрипции с тотальной РНК мозжечка человека. Препарат кДНК был любезно предоставлен И.П. Владыченской и Н.М. Раевской (Институт молекулярной генетики РАН). Методом ПЦР были получены три амплификата, последовательность которых включает полную открытую рамку считывания генов *NGF*, *BDNF* и *NTF3* человека. Для получения амплификата, кодирующего полно-размерный нейротрофин человека *NGF*, использовали пары праймеров *NGF*-99 и *NGF*-920; в случае *BDNF* – *BDNF*-51 и *BDNF*-1067; а в случае *NT*-3 – *NT*-3-33 и *NT*-3-1097 (табл. 1).

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Обозначение	Последовательность*
NGF-99	CGTCCGGACCCAATAACAGT
NGF-920	GCCCAGGAGAGTGTAGAAGG
BDNF-51	TTTCGGGGAGTGGTTGGG
BDNF-1067	ACTGTTTCCCTTCTGGTCAT
NT-3-33	TGCCAGAATAACACAGACTCAGC
NT-3-1097	GAGGGGAAGGCAAGCACACTGA
NGF-f3	GGCATA CATATG GAACCACACTCAGAGAG
NGF-r2	TTTT AGATCT <i>TTA</i> (GTGATG) ₃ GGCTCTTCTCACAGC
BDNF-f3	AAAAAA CATATG GGCCCCATGAAAGAAGCAAACATC
BDNF-r2	ATATA AGAATTC <i>TTA</i> (ATGGTG) ₃ TCTTCCCCTTTTAATGGTCAATG
NT-3-f3	GGCATC CATATG AACAACATGGATCAAAGG
NT-3-r2	AATAAT GAATTC <i>TTA</i> (ATGGTG) ₃ TGTTCTTCCGATTTTCTCG

* Сайты рестрикции *Nde* I (CATATG), *Eco* R I (AGATCT) и *Bgl* II (GAATTC) подчеркнуты, последовательности, соответствующие стоп-кодонам, выделены курсивом, участки, соответствующие полигистидиновым последовательностям – жирным шрифтом.

После обработки ПЦР-продуктов полинуклеотидкиназой (фосфорилирование осуществляли по стандартной методике) их клонировали в плазмидный вектор pUC19, линеаризованный по сайту расщепления эндонуклеазой рестрикции *Hind* III. Клоны, полученные после трансформации штамма *E. coli* XL-1 лигазными смесями, высевали на твердую селективную питательную среду (L-агар), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (200 мкг/мл) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (20 мкг/мл). Первичный отбор клонов, несущих целевые гены, осуществляли по их неспо-

собности расщеплять хромогенный субстрат. Далее наличие вставок в составе рекомбинантных плазмид подтверждали с помощью ПЦР, применяя те пары праймеров, которые использовали при получении амплификатов. Нуклеотидные последовательности генов были подтверждены секвенированием. Полученные плазмиды, несущие целевые гены *NGF*, *BDNF*, *NTF3* были обозначены как pUC_NGF, pUC_BDNF, pUC_NT-3, соответственно.

В последовательности гена *NTF3* было выявлено наличие единственной точечной замены в кодоне Pro-84 (нумерация по последовательности препробелка), не приводящей к замене

аминокислотного остатка.

Конструирование рекомбинантных продуцентов нейротрофинов на основе экспрессионного вектора pET-23c. Векторы pUC_NGF, pUC_BDNF, pUC_NT-3 были использованы в качестве матрицы для получения участков ДНК, кодирующих пронеуротрофины с дополнительной шестигистидиновой последовательностью на С-конце. Для получения амплификатов использовали пары праймеров: NGF_f3 и NGF_r2 для про-NGF, BDNF_f3 и BDNF_r2 для про-BDNF, NT-3_f3 и NT-3_r2 для про-NT-3. Праймеры содержали необходимые дополнительные последовательности, соответствующие терминирующим кодоном, шестигистидиновым последовательностям и сайтам рестрикции (см. табл. 1).

Продукт расщепления после обработки амплификатов соответствующими рестриктазами клонировали в состав экспрессионного вектора pET-23c, предварительно обработанного теми же ферментами. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL-1. Клоны растили на среде L-агар, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Наличие целевых генов в составе рекомбинантных плазмид определяли ПЦР-анализом. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов генов нейротрофинов подтверждали секвенированием.

Сконструированные плазмиды, несущие гены пронеуротрофинов NGF, BDNF, NT-3, были введены в клетки штамма *E. coli* BL-21 (DE3).

Для анализа динамики роста полученных штаммов-продуцентов и анализа накопления соответствующих чужеродных белков клетки растили при 37°C в жидкой питательной среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при постоянном перемешивании (220 об/мин) до оптического поглощения 0.4–0.6 ОЕ₆₀₀. После чего индуцировали синтез чужеродных белков в клетках, добавляя в среду изопропил-β-D-тио-галактопиранозид до конечной концентрации 0.5 mM. Далее продолжали растить культуры клеток в течение 4–5 ч, отбирая каждый час аликвоты для анализа оптического поглощения клеток (при 600 нм) и уровня накопления целевых белков. Для определения уровня накопления нейротрофических факторов клетки отделяли центрифугированием и анализ белкового состава проводили с помощью электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS).

Подготовку образцов и электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [27]. К 50 мкл клеточной суспензии добавляли равный объем буфера для приготовления образцов, содержащего SDS и β-меркаптоэтанол. Смесью прогревали при 95°C в течение 5 мин. Аликвоты

(10 мкл) наносили на 12.5% ПААГ.

Выделение и очистка пронеуротрофинов. Определение локализации целевых белков для всех сконструированных вариантов нейротрофинов осуществляли, обрабатывая клеточную биомассу ультразвуком во льду в течение 20 мин по 5 с с интервалом 2 с (Ultrasonic Homogenizer 4710 «Cole Parmer», США). Клетки предварительно ресуспендировали в буфере, pH 7.4, содержащем 20 mM трис-гидрохлорид, 5 mM EDTA, 1 mM фенилметансульфонил-фторид. После обработки клеток ультразвуком супернатант отделяли центрифугированием при 10000 g. Результат разделения клеточных фракций после ультразвуковой дезинтеграции анализировали электрофоретически в 12.5% ПААГ.

Нейротрофины из мембранной фракции клеток *E. coli* BL-21 (DE3) экстрагировали раствором, содержащим 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM трисгидрохлорид, 8 M мочевины и 30 mM β-меркаптоэтанол, pH 8.0. Отделение пронеуротрофинов от примесных белков осуществляли с использованием в качестве основной стадии очистки металлохелат-аффинную хроматографию на Ni-НТК (никель-нитрилотриуксусная кислота) агарозе (Qiagen, США). Хроматографию проводили в денатурирующих условиях. Образец, содержащий белки, инкубировали с сорбентом 1 ч при комнатной температуре (10 мг тотального белка на 1 мл сорбента). Смесью переносили в колонку и промывали сорбент буфером (10 объемов по отношению к объему сорбента), содержащим 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM трис-HCl, 8 M мочевины и 30 mM β-меркаптоэтанол, 1% глицерин, 0.1% тритон X-100, pH 8.0. Элюцию целевых белков осуществляли последовательно рабочими буферами, содержащими 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM трисгидрохлорид, 8 M мочевины и 30 mM β-меркаптоэтанол, pH 6.3 и pH 4.5. Результат хроматографии анализировали с помощью электрофореза.

Ренатурация очищенных пронеуротрофинов. Ренатурацию всех пронеуротрофинов проводили по единой схеме, разбавляя в 100 раз раствор денатурированного белка буфером, pH 8.7-9.0, содержащим 100 mM трисгидрохлорид, 750 mM L-аргинин, 5 mM EDTA, 5 mM восстановленный и 0.5 mM окисленный глутатион. Конечная концентрация целевого белка в случае про-NGF и про-BDNF составляла 35-45 мкг/мл, а в случае про-NT-3 – 100-120 мкг/мл.

Получение органотипичной культуры спинномозговых ганглиев куриных эмбрионов. Для выделения СМГ из эмбрионов использовали инструменты для микрохирургии глаза («Компания Киль», Россия). Выделение проводили в соответствии с методикой [28, 29].

Спинномозговые ганглии 8-13-ти-дневных

куриных эмбрионов, выделенных из инкубационных яиц, — эксплантаты — помещали в чашку Петри, покрытую раствором фосфатно-солевого буфера, pH 7.4, содержащим 0.5% желатина. СМГ культивировали в 3 мл питательной среды F14, содержащей гентамицин (80 мкг/мл) и 10% сыворотки крови лошади. В опытной группе в чашки Петри дополнительно добавляли 15 мкл раствора тестируемых веществ с различной концентрацией в буфере, содержащем 100 мМ трисгидрохлорид, 750 мМ L-аргинин, 5 мМ EDTA, 5 мМ восстановленный и 0.5 мМ окисленный глутатион, pH 8.7–9.0. В контрольной группе в чашки добавляли 15 мкл того же буфера. Эксплантаты культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в среде с 5% содержанием CO₂ в течение 3 сут.

Окрашивание клеток метиленовым

синим. Спинномозговые ганглии эмбрионов кур промывали раствором фосфатно-солевого буфера, pH 7.4, прогретым до 37°C, фиксировали 2% раствором параформа в течение 10 мин, затем промывали водой и высушивали. Далее вносили 1% раствор метиленового синего и инкубировали 10 мин. По окончании окрашивания удаляли раствор красителя, промывали водой и высушивали. Препараты изучали при помощи световой микроскопии.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 09-04-00734 и 09-04-00870, Программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки — медицине», федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, госконтракт № 14.740.11.0120.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Segal R.A. Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations // *Annu. Rev. Neurosci.* 2003. V. 26. P. 299–330.
2. Pedraza S.E., Podlesniy P., Vidal N., Arévalo J.C., Lee R., Hempstead B., Ferrer I., Iglesias M., Espinet C. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR // *Am. J. Pathol.* 2005. V. 166. № 2. P. 533–543.
3. Nordell V.L., Lewis D.K., Bake S., Sohrabji F. The neurotrophin receptor p75NTR mediates early anti-inflammatory effects of estrogen in the forebrain of young adult rats // *BMC Neurosci.* 2005. V. 6. P. 58. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/6/58>
4. McDonald N.Q., Chao M.V. Structural determinants of neurotrophin action // *J. Biol.Chem.* 1995. V. 270. P. 19669–19672.
5. Reichardt L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006. V. 361. № 1473. P. 1545–1564.
6. Arévalo J.C., Wu S.H. Neurotrophin signaling: Many exciting surprises! // *Cell Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. № 13. P. 1523–1537.
7. Jones K.R. Reichardt L.F. Molecular cloning of human gene that is member of nerve growth factor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 20. P. 8060–8064.
8. McDonald, N.Q., Hendrickson W.A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif // *Cell.* 1993. V. 73. № 3. P. 421–424.
9. Lessmann V., Gottmann K., Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects // *Prog. Neurobiol.* 2003. Vol. 69. № 5. P. 341–374.
10. Rattenholl A., Lilie H., Grossmann A., Stern A., Schwarz E., Rudolph R. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 11. P. 3296–3303.
11. Rattenholl A., Ruoppolo M., Flagiello A., Monti M., Vinci F., Marino G., Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. № 3. P. 523–533.
12. Schweigreiter R. The dual nature of neurotrophins // *Bioessays.* 2006. V. 28. № 6. P. 583–594.
13. Paoletti F., Konarev P.V., Covaceuszach S., Schwarz E., Cattaneo A., Lamba D., Svergun D.I. Structural and functional properties of mouse proNGF // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. № 4. P. 605–606.
14. Fahnstock M., Michalski B., Xu B., Coughlin M.D. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease // *Mol. Cell. Neurosci.* 2001. V. 18. № 2. P. 210–220.
15. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins // *Science.* 2001. V. 294. № 5548. P. 1945–1948.
16. Teng H.K., Teng K.K., Lee R. [et al.]. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. № 22. P. 5455–5463.
17. Pagadala P.C., Dvorak L.A., Neet K.E. Construction of a mutated pro-nerve growth factor, resistant to degradation and suitable for biophysical and cellular utilization // *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 2006. V. 103. № 47. P. 17939–17943.

18. Kliemannel M., Rattenholl A., Golbik R., Balbach J., Lilie H., Rudolph R., Schwarz E. The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide // *FEBS Lett.* 2004. V. 566. № 1-3. P. 207–212.

19. Volosin M., Trotter C., Cragolini A., Kenchappa R.S., Light M., Hempstead B.L., Carter B.D., Friedman W.J. Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via Neurotrophin Receptor Interacting Factor (NRIF) in hippocampal neurons after seizures / *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 39. P. 9870–9879.

20. Edwards R.H., Selby M.J., Garcia P.D., Rutter W.J. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 14. P. 6810–6815.

21. Yano H., Torkin R., Martin L.A., Chao M.V., Teng K.K. Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: Evidence for retrograde-directed cell killing // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 47. P. 14790–14802.

22. Koshimizu H., Kiyosue K., Hara T. [et al.]. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival // *Mol. Brain.* 2009. V. 2. P. 27. URL: <http://www.molecularbrain.com/content/2/1/27>

23. Zhang D., Bernd P. Bernd expression of TRK and neurotrophin mRNA in dorsal root and sympathetic of the quail during development // *J. Neurobiol.* 1994. V. 25. № 12. P. 1517–1532.

24. Young L., Bisland J., Harper S. A rapid method for determination of cell survival in primary neuronal DRG cultures // *J. Neurosci. Methods.* 1999. V. 93. № 1. P. 81–89.

25. Greene L.A. Quantitative *in vitro* studies on the nerve growth factor (NGF) requirement of neurons. II. Sensory neurons // *Dev. Biol.* 1977. V. 58. № 1. P. 106–113.

26. Rosenthal A., Goeddel D., Winslow W. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor // *Neuron.* 1990. V. 4. № 5. P. 767–773.

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

28. McCarthy K., Partlow L. Preparation of pure neuronal and non-neuronal cultures from embryonic chick sympathetic ganglia a new method based on both differential cell adhesiveness and the formation of homotypic neuronal aggregates // *Brain Res.* 1976. V. 114. № 3. P. 391–414.

29. Davies A. Neurotrophic factor bioassay using dissociated neurons // In: *Nerve growth factors* / Ed. R.A. Rush. – New York: John Wiley and Sons, 1989. Chapt. 5. P. 95–109.

ОПТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РАЦЕМИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ *мио*-ИНОЗИТА НА ЭНАНТИОМЕРЫ В СИНТЕЗЕ ИНОЗИТ-СОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ ПРИРОДНОГО СТРОЕНИЯ

А.Е. Степанов, ведущий научный сотрудник,

В.И. Швеца, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В.Ломоносова

e-mail: aestepanov@yandex.ru

Рассмотрены методы расщепления (разделения) рацемических производных *мио*-инозита на оптические антиподы через образование диастереомерных соединений с углеводами.
Methods for resolution (splitting) of racemic myo-inositol derivatives into optical antipodes via formation of diastereomeric compounds with carbohydrates are reviewed.

Ключевые слова: *мио*-инозит, моносахариды, диастереомеры, оптические антиподы.

Key words: myo-inositol, monosaccharides, diastereomers, optical antipodes.

Сложные фосфолипиды, фосфолипидные комплексы и конъюгаты, содержащие в своей структуре циклический шестиатомный полиол *мио*-инозит, широко распространены в животных и растительных организмах, входят в фосфолипидный пул многих микроорганизмов. Инозитсодержащие фосфолипиды, ввиду сложного строения и трудностей выделения из природного материала, были открыты значительно позднее классических фосфолипидов, после чего начались интенсивные исследования их биологических свойств, биосинтеза, участия в ключевых реакциях метаболических превращений, механизмов регуляции физиологического состояния клетки. Сложные проблемы в изучении структурно-функциональных взаимоотношений в ряду инозитсодержащих фосфолипидов потребовали разработки принципиально новых синтетических методов применительно к химии липидов и полиолов с целью получения индивидуальных образцов соединений заведомого строения и с природной стереохимической конфигурацией молекулы, необходимых для окончательного установления строения веществ, выделенных из различных источников.

При разработке путей синтеза инозитсодержащих фосфолипидов самая трудная проблема заключалась в практически полном отсутствии методов расщепления производных *мио*-инозита на оптические антиподы – в природных соединениях *мио*-инозита циклогексановый остов асимметрично замещен различными радикалами, вследствие чего такие структуры, образуемые биосинтетическим путем, обладают оптической активностью, а их химический синтез приведет к успеху только на основе соответствующих исходных хиральных соединений. Работы по созданию методов получения оптически активных производных *мио*-инозита, необходимых стартовых соединений в направленном синтезе фосфоинозитидов и их биологически активных фрагментов природного строения, были начаты на рубеже 60-70-х годов

прошлого века одновременно несколькими коллективами исследователей в разных странах, в том числе и в МИТХТ в небольшой группе к.х.н. В.И. Швеца – ныне д.х.н., профессора, академика РАН.

В реализации поставленной цели группе под руководством В.И. Швеца удалось получить приоритетные результаты и достичь признанного лидирующего положения в этом направлении исследований сложных инозитсодержащих фосфолипидов.

В данном кратком обзоре в историческом аспекте показано развитие этих работ в МИТХТ и их значение для современного уровня биорганической химии фосфоинозитидов.

При разработке методов получения оптически активных асимметрично замещенных производных *мио*-инозита исследованы три возможных подхода:

1. Полусинтетический метод, состоящий в использовании различных природных соединений *мио*-инозита, уже обладающих молекулярной асимметрией (например, галактин, квебрахит, борнезит и др.), для последующего превращения их в производные требуемого строения путем химической модификации. Природные соединения, используемые для этих целей, как правило, труднодоступные вещества, содержащиеся в небольших количествах в тропических растениях. Многостадийные синтезы на основе таких соединений приводят лишь к ограниченному набору оптически активных производных, которые часто не обладают искомой стереохимической конфигурацией и не дают возможности нарабатывать препаративные количества веществ [1, 2]. Метод не получил дальнейшего развития и в настоящее время не используется для синтеза оптически активных производных *мио*-инозита.

2. Второй возможный путь к получению оптически активных асимметрично замещенных производных *мио*-инозита – химический синтез из ациклических предшественников. Основа

этого подхода заключается в способности производных углеводов подвергаться циклизации с образованием соединений алициклического и ароматического ряда. Были предприняты попытки с помощью внутримолекулярной альдольной конденсации производных углеводов получить оптически активные бензиловые эфиры *мио*-инозита [3]. Здесь также были отмечены определенные трудности, обусловленные возможностью побочного образования других изомерных циклитов, сложностью разделения и выделения индивидуальных продуктов реакции циклизации, низким препаративным потенциалом и т.д. По этим причинам данный метод также не нашел практического использования в химии *мио*-инозита.

3. Третий подход оказался наиболее результативным и основан на расщеплении рацемических производных *мио*-инозита на оптические антиподы (энантиомеры, положения 1 и 3, 4 и 6 в рацематах *мио*-инозита являются энантиомерными). Расщепление – это разделение рацемата на два составляющих его энантиомера, максимальный выход каждого энантиомера – 50%. Расщепление можно провести с помощью физических процессов или химических реакций.

В химических методах расщепления используется промежуточное превращение рацемата в смесь диастереомеров. Процесс расщепления сводится к трем последовательным операциям:

1. Образование диастереомерных соединений (диастереомеров) при реакции рацемата с энантиомером хирального вещества (расщепляющим агентом).

2. Разделение полученной смеси диастереомеров на индивидуальные изомеры с использованием различий в их свойствах (растворимость, кристаллизация, хроматография).

3. Разрушение индивидуальных диастереомеров для выделения оптически чистых энантиомеров расщепленного рацемата.

Следует отметить, что хотя за период с первого расщепления рацемического соединения на энантиомеры, проведенного Л. Пастером 1853 году [4], и по настоящее время опубликовано большое количество работ, посвященных расщеплению рацемических спиртов и использованию для этого различных расщепляющих агентов, все же каждый новый пример удачного расщепления в значительной мере основан на эмпирическом подборе расщепляющего агента, подходящего для конкретного рацемата и способного легко образовывать с ним диастереомерные соединения.

Нами, в ходе реализации многолетней программы получения и изучения свойств инозитсодержащих фосфолипидов, предложен и разработан универсальный препаративный метод оптического расщепления рацемических

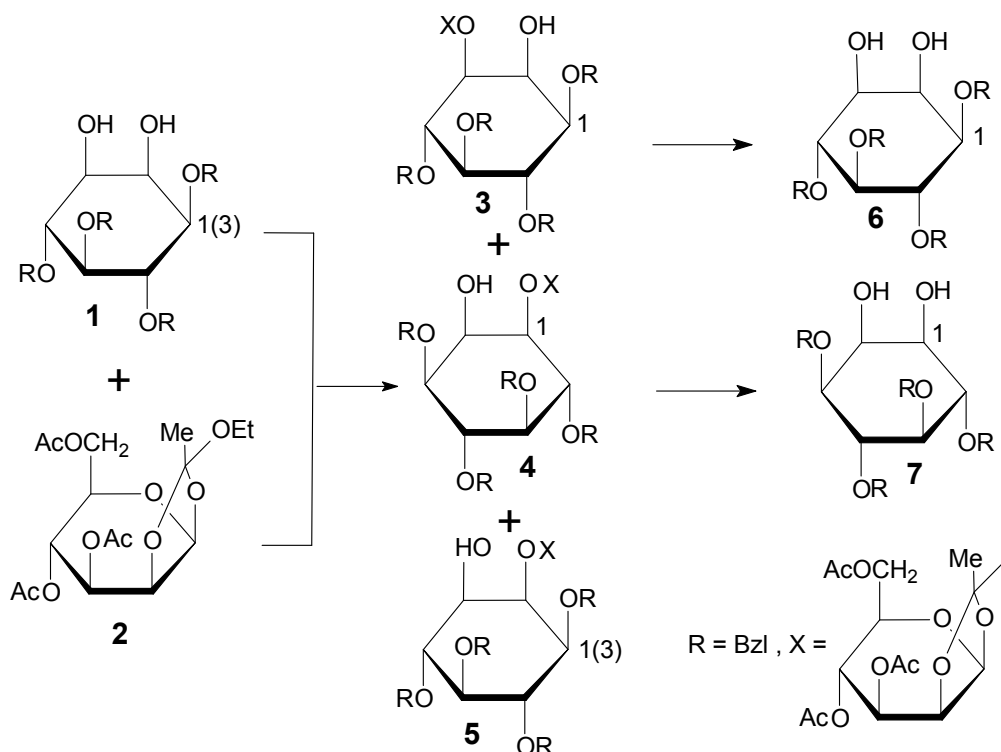
производных *мио*-инозита на энантиомеры, исходя из которых были осуществлены приоритетные синтезы хиральных моно-, ди-, трифосфатов *мио*-инозита; моно-, ди-, трифосфоинозитидов и маннофосфоинозитидов природного строения [5–12]. В качестве асимметрических агентов для образования диастереомеров были выбраны ортоэфиры моносахаридов. Метод имеет общее значение для биоорганической химии инозитсодержащих фосфолипидов и получил широкое международное признание специалистов в области синтеза и исследования биологических функций фосфолипидов.

В первых модификациях метода была исследована реакция перэтерификации алкилортоацетатов *D*-маннозы рацемическими асимметрично замещенными производными *мио*-инозита [5]. Образовавшиеся в результате реакции диастереомерные ортоэфирные соединения *D*-маннозы и производного *мио*-инозита разделяли на индивидуальные изомеры кристаллизацией или хроматографически. Выделение энантиомеров замещенного *мио*-инозита осуществлялось при мягком кислотном гидролизе каждого диастереомера, либо путем реакции «обратной» перэтерификации полученного диастереомера низшим спиртом (например, метиловым спиртом) в случаях, когда неприемлемы условия кислотного гидролиза. В качестве примера использования метода может служить процесс расщепления рацемического тетрабензилового эфира *мио*-инозита **1** на энантиомеры (схема).

При перэтерификации этилортоацетата *D*-маннозы **2** тетрабензиловым эфиром **1** образуются диастереомерные ортоэфирные соединения **3** и **4**, которые выделяли из реакционной массы с помощью селективной хроматографии и адсорбционной хроматографии. При мягком кислотном гидролизе ортоэфиров **3** и **4** получили энантиомерные 1,4,5,6- и 3,4,5,6-тетра-*O*-бензил-*sp*-*мио*-инозиты **6** и **7**. При аналогичной реакции перэтерификации *трет*-бутилортоацетата *D*-глюкозы тетрабензиловым эфиром **1** соответствующие диастереомерные ортоэфиры образуются с большими выходами, но малые различия в физико-химических свойствах делали их разделение малоэффективным.

Использование ортоэфирных диастереомерных производных *мио*-инозита имеет определенные недостатки: относительно низкий выход при образовании диастереомеров, лабильность ортоэфиров как в условиях реакции перэтерификации, так и при хроматографическом выделении.

Реакция спиртов с ортоэфирами моносахаридов в зависимости от условий процесса (количество катализатора) может приводить к новому ортоэфиру путем замены алкоксильного



остатка (перезэтерификация) либо к образованию соответствующего гликозида исходного производного *мио*-инозита (гликозилирование) в результате раскрытия ортоэфирного цикла. Проведенные исследования показали большую устойчивость гликозидов *мио*-инозита в сравнении со структурно изомерными ортоэфирными соединениями. На основании этих данных ортоэфирный метод расщепления получил дальнейшее развитие – была разработана его модификация, заключающаяся в использовании гликозидных производных в качестве устойчивых промежуточных диастереомеров, причем показана применимость как диастереомерных глюкозидов, так и маннозидов. Алкилортоацетаты *D*-глюкозы, отличаясь гораздо большей доступностью, чем соединения *D*-маннозы, были успешно использованы для расщепления серии асимметрично замещенных рацемических *мио*-инозитов. Метод расщепления с использованием производных моносахаридов характеризуется широкой применимостью в отличие от классических приемов образования и разделения диастереомерных пар в ряду производных *мио*-инозита, он применим для разделения любых рацематов *мио*-инозита, несущих одну или несколько незамещенных гидроксильных групп.

Таким образом, в результате применения различных модификаций ортоэфирного метода для расщепления рацемических асимметрично замещенных производных были получены энантиомеры тетрабензильного и пентабензильного эфиров *мио*-инозита, тетраацетата и пентаацетата *мио*-инозита, двух дициклогексильных кеталей и дибензилциклогексильного *мио*-инозита. Абсолютная конфигурация и оптическая чистота энантиомеров, полученных при расщеплении рацематов, установлена путем превращения их в соответствующие природные или синтетические соединения заведомого стереохимического строения.

Разработанный подход к препаративному получению энантиомеров асимметрично замещенных производных *мио*-инозита позволил осуществить синтезы ряда инозитсодержащих фосфолипидов природного строения, которые в настоящее время с успехом применяются для создания новых лекарственных форм и систем направленного транспорта активных фармацевтических субстанций [13, 14].

Работа выполнена в рамках реализации научного проекта, финансируемого Советом по грантам Президента Российской Федерации по поддержке молодых российских ученых и ведущих научных школ (грант НШ-3468.2010.4).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Желвакова Э.Г., Шве́ц В.И., Преображенский Н.А. Исследования в области асимметрично замещенных производных *мио*-инозита. III. Синтез 1,2,4,5,6-пента-О-тозил-*мио*-инозита // Журн. орган. химии. 1970. Т. 6. № 1. С. 62–65.
2. Желвакова Э.Г., Ульянова О.Г., Шве́ц В.И., Преображенский Н.А. Синтез 2,3,4,5,6-пента-О-тозил-*sn*-*мио*-инозита // Химия природных соединений. 1970. № 2. С. 163–167.
3. Каплун А.П., Башарули В.А., Шве́ц В.И., Евстигнеева Р.П. Исследование асимметрического синтеза производных *мио*-инозита из *D*-глюкозы // Труды МИТХТ. 1975. Т. 5. № 2. С. 82–89.
4. Pasteur L. // C.R. Acad. Sci. 1853. V. 37. P. 162.
5. Shvets V.I., Klyashchitskii B.A., Stepanov A.E., Evstigneeva R.P. Resolution of asymmetrically substituted *myo*-inositols into optical antipodes // Tetrahedron. 1973. V. 29. P. 331–340.
6. Stepanov A.E., Shvets V.I. Synthetic studies of phosphoinositides // Chem. & Phys. Lipids. 1979. V. 25. P. 247–264.
7. Stepanov A.E., Shvets V.I. Formation of phosphoester bonds in phosphoglyceride synthesis // Chem. & Phys. Lipids. 1986. V. 41. P. 1–51.
8. Шве́ц В.И., Степанов А.Е., Крылова В.Н., Гулак П.В. *мио*-Инозит и фосфоинозитиды. – М.: Наука, 1987. 248 с.
9. Stepanov A.E., Runova O.B., Schlewer G., Spiess B., Shvets V.I. Synthesis of chiral *sn*-*myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate and its enantiomer // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 38. P. 5125–5128.
10. Shvets V.I., Stepanov A.E., Schmitt L., Spiess B., Schlewer G. Inositol phosphates and derivatives: Synthesis, biochemistry and therapeutic potential. – Washington: Amer. Chem. Society Book, 1991. 235 p.
11. Stepanov A.E., Shvets V.I. Advances in phosphoinositides: Chemistry, biochemistry and biomedical applications. – Washington: Amer. Chem. Society Book, 1998. 298 p.
12. Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Биологически активные фосфаты *мио*-инозита // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 737–744.
13. Шве́ц В.И., Каплун А.П., Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Чехонин В.П. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века // Рос. нанотехнологии. 2008. Т. 3. № 11. С. 52–67.
14. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Технологические аспекты получения липосомных препаратов в условиях GMP // Биофарм. журн. 2009. Т. 1. № 3. С. 18–29.

ПРОИЗВОДНЫЕ *мио*-ИНОЗИТА НЕЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ – ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

А.Е. Степанов, ведущий научный сотрудник, А.И. Лютик, старший

научный сотрудник, В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В.Ломоносова

e-mail: aestepanov@yandex.ru

Рассмотрены строение, свойства и потенциал биомедицинского применения нелипидных производных *мио*-инозита.
The structures, properties and possibilities for biomedical applications of myo-inositol non-lipid derivatives are reviewed.

Ключевые слова: *мио*-инозит, природные и синтетические производные.

Key words: myo-Inositol, natural and synthetic derivatives.

Поисковые исследования, направленные на создание, отбор и изучение свойств новых высокоактивных субстанций, необходимых для конструирования эффективных лекарственных и диагностических препаратов, остаются одним из главных приоритетов в биомедицинском комплексе естественных наук. При разработке новых препаратов для медицины широко используются методы химической модификации и биохимической трансформации молекулярной структуры различных биорегуляторов, активных фармацевтических субстанций, биологически активных природных соединений и синтетических веществ с целью придания им комплекса улучшенных свойств, оптимизации фармакологических параметров, увеличения биодоступности, снижения токсического и побочного действия.

На кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова в течение ряда лет проводятся систематические работы по выделению из природных источников, разработке химических и биотехнологических методов синтеза, изучению биологических свойств сложных инозитсодержащих фосфолипидов и их функционально активных фрагментов, которые в равной степени необходимы как инструменты в фундаментальных медико-биологических исследованиях, так и для практического использования в качестве компонентов новых лекарственных форм и медицинских препаратов. В развитии этого научного направления на кафедре достигнуты существенные приоритетные результаты, позволившие разработать синтетическую стратегию и впервые осуществить полные химические и химико-ферментативные синтезы основных представителей природных биологически активных фосфоинозитидов, маннофосфоинозитидов, глюкозилфосфоинозитидов и аминокликозилфосфоинозитидов, инозитфосфоцерамидов и гликозилинозитфосфоцерамидов, фосфатов и полифосфатов *мио*-инозита [1–7].

Инозитсодержащие фосфо- и гликофосфолипиды, их конъюгаты и макромолекулярные комплексы с другими биологически активными соединениями, биорегуляторами и биополиме-

рами активно участвуют в важнейших проявлениях жизнедеятельности организмов на молекулярном уровне. Среди этих функций – возбуждение и проведение нервного импульса, фосфоинозитидный цикл, секреция метаболитов, рецепция и сопряжение возбуждения рецептора с активацией эффекторных механизмов в клетке, регуляция начальных стадий пролиферации, стимуляция тромбоцитов, регуляция структуры клеточных мембран, антигенные свойства, вовлеченность в гликогенолиз и во многие другие физиологические процессы клеток. Поэтому не ослабевает интерес многочисленных исследователей к детальному изучению строения, биологических свойств и особенностей метаболизма этих уникальных природных соединений [8–12].

Однако также имеется большой ряд нелипидных производных *мио*-инозита, среди которых выявлены биологически и фармакологически активные соединения, исключительно перспективные для создания новых медицинских препаратов. Проявления различных видов активности в таких случаях обусловлены уникальными свойствами молекулы *мио*-инозита, такими как способность быстро включаться в метаболические процессы, способность *in vivo* изменять гидрофильность или гидрофобность лекарственной субстанции, витаминная активность и др. Таким образом, возможности *мио*-инозита как матрицы для создания активных фармацевтических субстанций далеко не исчерпаны и могут привести к созданию новых высокоэффективных медицинских препаратов различных терапевтических групп. В настоящем кратком обзоре приведены основные сведения о нелипидных природных и синтетических биологически активных производных *мио*-инозита, показана их потенциальная ценность для биомедицинского применения.

В объектах живой природы *мио*-инозит находится как в свободном состоянии, так и в виде различных производных. Они найдены во многих животных и растительных организмах, хотя присутствуют в них обычно в небольших количествах.

1. Метилловые эфиры

Во многих природных источниках, в большинстве случаев в растениях, идентифицированы О-метилловые эфиры *мио*-инозита, например: (+)-борнезит (3-О-метил-*sp*-*мио*-инозит), (–)-борнезит (1-О-метил-*sp*-*мио*-инозит), секвоит (5-О-метил-*мио*-инозит), (+)-ононит (4-О-метил-*sp*-*мио*-инозит), дамбонит (1,3-ди-О-метил-*мио*-инозит), лириодендрит (1,4-ди-О-метил-*sp*-*мио*-инозит). Названия этих соединений обычно указывают на источники первоначального выделения (номенклатурные системы для обозначения конфигурации и положения заместителей в производных *мио*-инозита приведены в работах [13, 14]. Препаративные количества метилинозитов достижимы экстракцией из растений. Химический синтез метилловых эфиров *мио*-инозита не представляет особых трудностей и с целью структурной идентификации был реализован для большинства метилинозитов. Секвоит и борнезит синтезированы метилированием *мио*-инозита с помощью диметилсульфата в присутствии гидроксида бария; также для получения метилловых эфиров применялись йодистый метил в диоксане в присутствии оксида серебра, йодистый метил в диметилформамиде, метилирование по Хакомори (система йодистый метил-гидрид натрия-диметилсульфоксид). Оптически активные метилинозиты получены расщеплением соответствующих рацемических соединений путем образования и разделения диастереомерных производных с *D*-камфорной кислотой и *D*-винной кислотой [2].

Метилловые эфиры *мио*-инозита (как и свободный *мио*-инозит) обладают витаминными свойствами и поэтому используются как добавки в производстве пищевых продуктов. Однако, наиболее привлекательно применение метилинозитов при конструировании новых лекарственных препаратов. Для монометилловых эфиров *мио*-инозита установлена гипогликемическая (противодиабетическая) активность, и они нашли использование при создании соответствующих медицинских препаратов [15].

Из растительных источников (морские водоросли) были выделены и идентифицированы С-метильные производные *мио*-инозита – изомитилит, лиминит, митилит [16].

2. Соединения *мио*-инозита – сложные эфиры

Вторая группа нелипидных соединений *мио*-инозита, имеющая важное значение и широко используемая для конструирования и применения в качестве лекарственных средств – это сложные эфиры карбоновых и минеральных кислот, в которых в качестве спиртового остатка присутствует *мио*-инозит или его различные замещенные производные. Производные *мио*-инозита со структурой сложных эфиров выде-

лены и идентифицированы в ряде природных источников. Также методами химического синтеза получено большое количество биологически и фармакологически активных производных такого типа ввиду их очевидного потенциала для биомедицинского применения. Сложные эфиры β-индолилуксусной кислоты (ИУК) и *мио*-инозита впервые были выделены из кукурузных зерен экстракцией водным ацетоном. В экстракте были идентифицированы моно-, ди- и трииндолилацетаты *мио*-инозита, впоследствии показано, что остаток ИУК в монопроизводных может находиться в положениях 1 или 2 циклитного кольца; в дипроизводных – в положениях 1 и 2; в тризамещенных производных сложноэфирная связь локализована в положениях 1, 2, 3 или 2, 4, 6 [17]. Для этих производных *мио*-инозита отмечено проявление ацильной миграции, что является характерной особенностью ряда сложноэфирных соединений *мио*-инозита [2].

При экстракции метанолом хвои *Taxus baccata* выделен оптически активный 4-*p*-кумароил-*sp*-*мио*-инозит, обладающий флуоресцентными свойствами [18]; из растительного источника *Inula capra* – производные *мио*-инозита и ангеликовой кислоты [19, 20]. Некоторые природные производные *мио*-инозита из морских организмов проявляют сильные токсические свойства, например, из моллюска *Babylonia japonica* выделены и идентифицированы содержащие *мио*-инозит токсины – суругатоксин, просуругатоксин и неосуругатоксин [21]. В связи с обнаружением высокой биологической активности природных сложноэфирных производных *мио*-инозита было выполнено большое число работ по химическому синтезу соединений такого типа. Для получения противоишемического препарата, гекса-О-никотиноил-*мио*-инозита, использовали ацилирование ангидридным или хлорангидридным методом [22].

На кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ удалось существенно оптимизировать синтез гексаникотината *мио*-инозита и довести выход соединения до 96% [23]. Хлорангидридный метод был также применен для синтеза гекса-О-5-фтор- и гекса-О-5-хлорникотиноил-*мио*-инозитов [24]. С целью изучения противоишемических свойств нами синтезированы частично ацилированные остатками никотиновой кислоты производные *мио*-инозита с использованием для временной блокировки части гидроксильных *мио*-инозита монокетальных, дикетальных и ортоформатных защитных групп. Так были получены 1,4-ди-О-никотиноил-, 2,4,6-три-О-никотиноил- и 1,4,5,6-тетра-О-никотиноил-*мио*-инозиты [25]. С применением разработанной стратегии синтеза была получена серия ацильных производных *мио*-инозита для изуче-

ния фармакологической активности: 1,4-ди-О-(γ -аминобутирил)-, 1,4,5,6-тетра-О-(γ -аминобутирил)-, 1,4,5,6-тетра-О-хлорацетил- и 1,4,5,6-тетра-О-(γ -хлорбутирил)-*мио*-инозиты.

Разработанные нами различные методы синтетической химии *мио*-инозита, в том числе при реализации синтезов сложных инозитсодержащих фосфолипидов, позволили спланировать и осуществить получение принципиально новых биологически активных производных *мио*-инозита, содержащих на матрице циклита ковалентно присоединенные остатки двух разных соединений с известной фармакологической активностью (остатки никотиновой и γ -аминомасляной кислот). Реакцией тетраникотината *мио*-инозита с N-Вос- γ -аминомасляной кислотой и ди-*трет*-бутилпирокарбонатом в этилацетате и в присутствии пиридина и диметиламинопиридина с последующим кислотным гидролизом соляной кислотой в диоксане был получен 1,4,5,6-тетра-О-никотиноил-2,3-ди-О-(γ -аминобутирил)-*мио*-инозит [23, 25]. Такой подход открывает возможности направленного варьирования соотношения активных компонентов в препарате, изменять при необходимости гидрофильность и время эффективного действия препарата, его проходимость через защитные барьеры организма.

Еще одно успешно реализованное направление работ кафедры по синтезу нелипидных производных *мио*-инозита – получение фосфатов *мио*-инозита. На кафедре биотехнологии и бионанотехнологии были разработаны и осуществлены приоритетные синтезы моно-, ди- и трифосфатов *мио*-инозита в том числе и в оптически активной форме [4, 6, 26]. Фосфаты *мио*-инозита, будучи ключевыми исходными полупродуктами в синтезе инозитсодержащих фосфолипидов, в то же время обладают собственной биологической и фармакологической активностью и нашли применение в качестве компонентов медицинских препаратов, пищевых и косметических продуктов [2].

С целью направленного поиска и отбора новых биологически активных соединений различными группами исследователей были также синтезированы следующие производные *мио*-

инозита: гекса-О-метилловый эфир, гексаацетат, гексапропионат, гексабутират, гексавалерат, гексакaproат, гексапальмитат, гексадихлорацетат, гексасалицилат, гексасульфат, гексадекансульфонат, карбаматы, нитраты, катион-анионные комплексы в форме гексаэфиров с модифицированными аминокислотами [2, 4, 5].

Для многих вышеперечисленных нелипидных производных *мио*-инозита установлены различные виды биологической и фармакологической активности, что начинает широко использоваться как для повышения эффективности действия известных препаратов, так и для конструирования новых лекарственных средств. Среди комплекса полезных свойств, найденных для нелипидных производных *мио*-инозита, наиболее перспективны для биомедицинского применения следующие виды активности: гипогликемическая, гипополипидемическая, противовоспалительная, противоязвенная, антиаллергическая, антеникотинная, антиоксидантная, вазодилаторная, противоишемическая (кардиопротекторная), противоопухолевая, антибактериальная, фибринолитическая и антикоагулянтная. Следует также упомянуть важнейшее ценное свойство *мио*-инозита и его производных – снижение побочных эффектов многих лекарственных средств, что также применяется при различных схемах лечения путем совместного использования медицинских препаратов и производных *мио*-инозита с определенным видом активности [2, 3, 23].

Представленный в обзоре материал показывает широкие возможности использования *мио*-инозита и его многочисленных нелипидных производных в качестве компонентов и носителей известных и новых лекарственных препаратов, придавая им улучшенные фармакологические свойства и расширяя спектр терапевтического действия.

Работа выполнена в рамках реализации научного проекта, финансируемого Советом по грантам Президента Российской Федерации по поддержке молодых российских ученых и ведущих научных школ (грант НШ-3468.2010.4).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Stepanov A.E., Shvets V.I. Synthetic studies of phosphoinositides // Chem. & Phys. Lipids. 1979. V. 25. № 3. P. 247–264.
2. Шве́ц В.И., Степа́нов А.Е., Кры́лова В.Н., Гула́к П.В. *мио*-Инозит и фосфоинозитиды. – М.: Наука, 1987. 248 с.
3. Степа́нов А.Е., Краснопо́льский Ю.М., Шве́ц В.И. Физиологически активные липиды. – М.: Наука, 1991. 136 с.
4. Shvets V.I., Stepanov A.E., Schmitt L., Spiess B., Schlewer G. Inositol phosphates and derivatives: Synthesis, biochemistry and therapeutic potential. – Washington: Amer. Chem. Society Book, 1991. 235 p.

5. Stepanov A.E., Shvets V.I. Advances in phosphoinositides: Chemistry, biochemistry and bio-medical applications. – Washington: Amer. Chem. Society Book, 1998. 298 p.
6. Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Биологически активные фосфаты *мио*-инозита // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 737–744.
7. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Некоторые аспекты технологии получения липосомных форм лекарственных препаратов // Хим.-фарм. журн. 1999. Т. 33. № 10. С. 20–23.
8. Falkenburger B.H., Jensen J.B., Dickson E.J., Suh B.-C., Hille B. Phosphoinositides: Lipid regulators of membrane proteins // J. Physiology. 2010. V. 588. № 17. P. 3179–3185.
9. Balla T., Szentpetery Z., Kim Y.J. Phosphoinositide signaling: New tools and insights // Physiology (Bethesda). 2009. V. 24. P. 231–244.
10. Di Paolo G., De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics // Nature. 2006. V. 443. P. 651–657.
11. Vicinanza M., D'Angelo G., Di Campli A., De Matteis M.A. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking // EMBO J. 2008. V. 27. № 19. P. 2457–2470.
12. Roccia D., Larijani B. Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion // Biochem. J. 2009. V. 418. P. 233–246.
13. Клящицкий Б.А., Шве́ц В.И., Преображенский Н.А. О номенклатуре оптически активных асимметрично замещенных *мио*-инозитов // Журн. орган. химии. 1969. Т. 5. № 1. С. 192–193.
14. Шве́ц В.И., Евстигнеева Р.П. О номенклатуре и изображении рацемических асимметрично замещенных производных *мио*-инозита // Журн. орган. химии. 1972. Т. 8. № 7. С. 1550–1552.
15. Nair S.P., Rao J.M. Патент Индии № 167498 (С.А. 116:181119).
16. Percival E., Young M. Carbohydrates of the brown seaweeds: Part III. *Desmarestia aculeata* // Carbohydrate Res. 1974. V. 32. P. 195–201.
17. Elmann A., Bandurski R.S. Isolation of di-O-(indole-3-acetyl)-*myo*-inositol and tri-O-(indole-3-acetyl)-*myo*-inositol from mature kernels of *Zea mays* // Carbohydrate Res. 1974. V. 36. P. 1–12.
18. Dittrich P., Schilling N. Isolation and characterization of a novel *p*-coumaric acid ester of *myo*-inositol from needles of *Taxus baccata* // Plant Physiol. 1977. V. 59. P. 279–281.
19. Bohlmann F., Ahmed M., Jakupovic J. Inositol angelates from *Inula cappa* // Phytochemistry. 1982. V. 21. № 3. P. 780–782.
20. Gao F., Wang H., Marby T.J. Inositol derivatives and pseudoguaianolides from *Hymenoxys texana* // Phytochemistry. 1990. V. 29. № 7. P. 2273–2276.
21. Kosuge T., Zenda H., Tsuji K. // Yakugaku Zasshi. 1987. V. 107. № 9. P. 665–667.
22. Garegg R.J., Inversen T., Johansson R., Lindberg B. Synthesis of some mono-*O*-benzyl- and penta-*O*-methyl-*myo*-inositols // Carbohydrate Res. 1984. V. 130. P. 322–326.
23. Грачева И.Н., Орехова Е.М., Клящицкий Б.А., Копелевич В.М.В., Тишкин В.С., Степанов А.Е., Шве́ц В.И. Синтез сложных эфиров *мио*-инозита и исследование их противоишемической активности // Хим.-фарм. журн. 1993. № 8. С. 24–27.
24. Carlsson L.A.F., Helgstrand A.J.E., Sjoberg B.O.H., Stjernstrom N.E. 5-Fluoro-3-pyridinemethanol: Esters thereof and therapeutically acceptable salts thereof: пат. США № 3637714, 26.08.1975.
25. Kopelevich V., Gracheva I., Orekhova E., Klyashchitsky B., Stepanov A., Shvets V., Gunar V., Tischkin V. Niacin conjugates as potential drugs. Synthesis and pharmacological activity of N-nicotinoyl-GABA and inositol nicotinate // Abstracts of the 14th Int. Congress on Heterocyclic Chemistry. – Antwerpen, 1993. P. 1–9.
26. Stepanov A.E., Runova O.B., Schlewer G., Spiess B., Shvets V.I. Total syntheses of chiral *sn*-*myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate and its enantiomer // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 38. P. 5125–5128.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА

М.В. Чудинов, доцент, А.В. Матвеев, аспирант, Н.И. Журило, аспирант,
В.В. Простакова, студент, В.И. Шве́ц, заведующий кафедрой
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: mikle@irims.ru

Изучены пути синтеза 5-алкил(арил) замещенных производных 1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновых кислот, предложен новый эффективный способ получения таких соединений циклизацией бис-ацилированных оксаламидразонов.

Routes of synthesizing 5-alkyl(aryl) derivatives of 1[H]-1,2,4-triazole-3-carboxylic acids were studied. A novel efficient method of preparing such compounds by cyclization of bis-acetylated oxalamidrazones was suggested.

Ключевые слова: 1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновая кислота, β-ациламидразон, циклизация, способ синтеза.

Key words: 1[H]-1,2,4-triazole-3-carboxylic acid, β-acylamidrazone, cyclization, synthesis method.

Введение

Гетероциклическая система 1,2,4-триазола входит в состав молекул многих лекарственных препаратов, например, противовирусных (рибавирин, вирамин), противогрибковых (флуконазол), снотворных (триазолам). Для производных 1,2,4-триазола характерен широкий спектр биологической активности. Это обусловило наш интерес к изучению путей синтеза соединений данного ряда.

При всем разнообразии известных способов

построения триазольной системы количество описанных возможных путей получения 1[Н]-1,2,4-триазолов, содержащих в положении 3 карбоксильную группу (или ее аналог) и алкильную (арильную) группу в положении 5, весьма ограничено. Для 3,5-замещенных 1[Н]-1,2,4-триазолов существует несколько универсальных схем получения, в основном сводящихся к циклизации получаемых тем или иным способом β-ациламидразонов, часто без выделения промежуточных продуктов (схема 1, А–D).

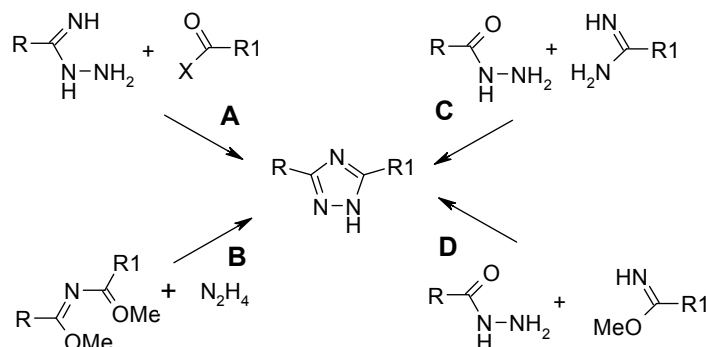


Схема 1.

Однако, если R или R₁ в схеме 1 являются карбоксильной группой, β-ациламидразон представляет собой весьма устойчивое соединение, не склонное к циклизации в мягких условиях. Кроме того, если речь идет о низкомолекулярных соединениях, получение исходных компонентов также может представлять некоторые сложности.

Ранние источники [1, 2] описывают получение 1[Н]-1,2,4-триазол-3-(5)-карбоновых кислот при окислении соответствующих алкил-1,2,4-триазолов перманганатом калия в щелочной среде. При этом выделение их из реакционной массы иногда весьма затруднительно и связано с большими потерями. К тому же, этот способ относительно эффективен только в случае монозамещенного триазола. При необ-

ходимости получения 5-замещенных производных возникает проблема селективного окисления.

Незамещенные и 5-алкил(арил)-замещенные производные 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты могут быть также получены, исходя из различных C2-компонентов, таких как гидразид оксальной кислоты [3], эфиры оксикарбонилформимидной [4] или оксикарбонилтиоформимидной [5] кислоты (схема 2).

Методика, основанная на реакции иминоэфира, получаемого из этилцианформата, с гидразидами соответствующих кислот и последующей термической циклизации β-ациламидразонов (путь С на схеме 2), представляется наиболее универсальной, ввиду доступности синтонов. Однако, как указывается в работе [5],

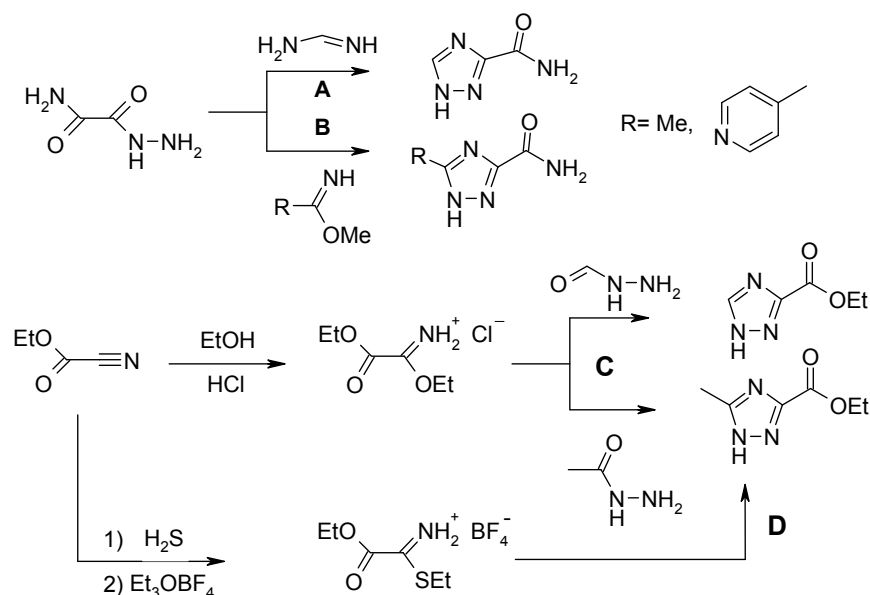


Схема 2.

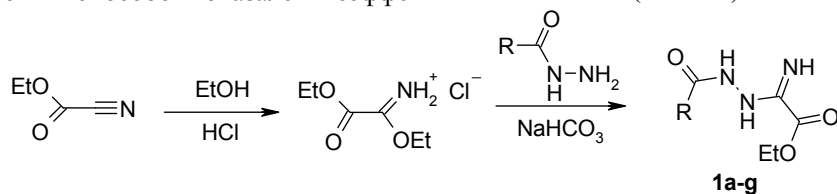
наилучший выход (70-80%) достигается при циклизации β -формиламидразона (сх. 1, $R = H$, $R_1 = COOEt$); для этилового эфира 5-метил-1[H]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты температура реакции повышается со 140 до 215°C, а выход снижается до 44%. Сходным образом из гидразида цианформимидной кислоты был получен 1[H]-1,2,4-триазол-3-карбонитрил, который может быть легко превращен в другие производные 1[H]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты [6]. Однако синтез 5-замещенных карбонитрилов этим способом оказался неэффек-

тивным, даже 5-метилпроизводное было выделено только с выходом 25% [7].

Целью нашей работы стал поиск более эффективных путей получения 5-алкил(арил)-замещенных производных 1[H]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты.

Результаты и их обсуждение

С использованием пути C, представленного на схеме 2, нами был получен ряд β -ациламидразонов **1a-g**, содержащих различные заместители (схема 3).



$R = \text{Me}$ (a) 44%; Et (b) 21%; Pr (c) 23%; $i\text{-Pr}$ (d) 60%; cyclo-Pr (e) 50%; $i\text{-Bu}$ (f) 51%; Ph (g) 50%

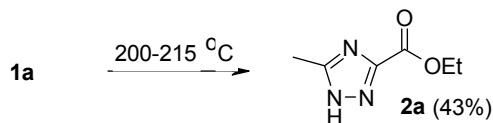


Схема 3.

Как и ожидалось, термическая циклизация оказалась относительно эффективной только для соединения **1a** (выход триазола **2a** 43%), для остальных β -ациламидразонов даже при температурах 250-300°C наблюдалась только возгонка с частичным разложением. Попытка провести циклизацию в высококипящих растворителях (ксилоле, этиленгликоле, хинолине) тоже оказалась неудачной – скорость реакции была очень низкой, меньше скорости разложения исходного соединения, целевой продукт присутствовал только в следовых количествах. Основной идентифицированный продукт реакции – этиловый эфир 5-алкил-1,2,4-оксидиазол-

3-карбоновой кислоты.

Проведя циклизацию соединения **1a** в кипящем уксусном ангидриде, нам удалось повысить выход **2a** до 70%. Однако при попытке циклизовать в этих условиях соединение **1b** мы обнаружили, что в основном продуктом реакции (85%) явился триазол **2a**, присутствовало только 15% целевого соединения **2b** (схема 4).

Это позволило нам предположить, что в данном случае происходит вторичное N-ацилирование β -ациламидразона и замыкание триазольного цикла двумя возможными путями. Судя по соотношению продуктов реакции, скорость циклизации по направлению **a** существ-

венно выше, чем по направлению **b**.

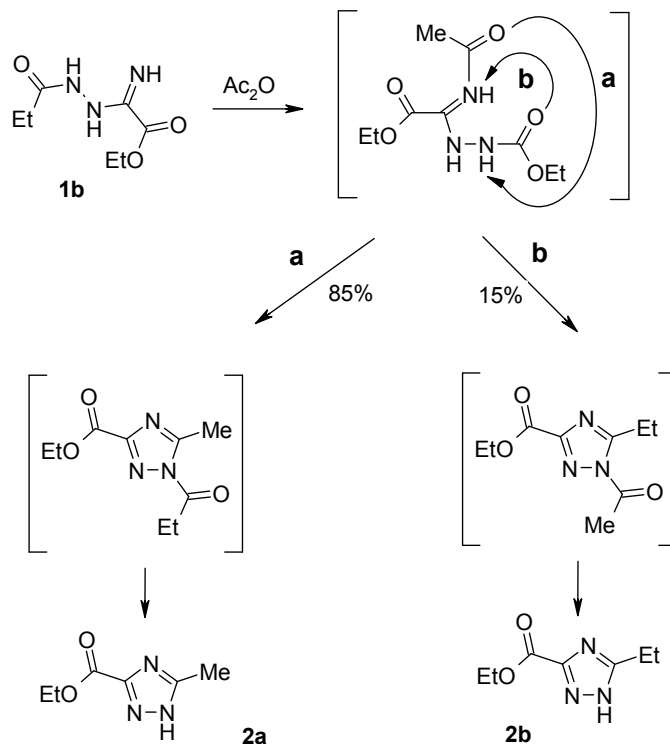


Схема 4.

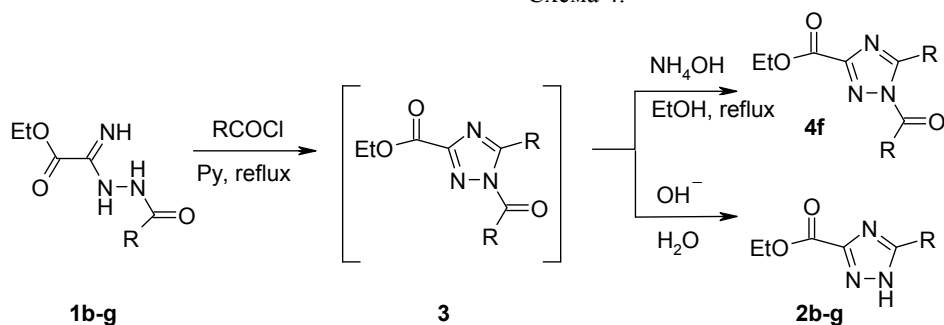


Схема 5.

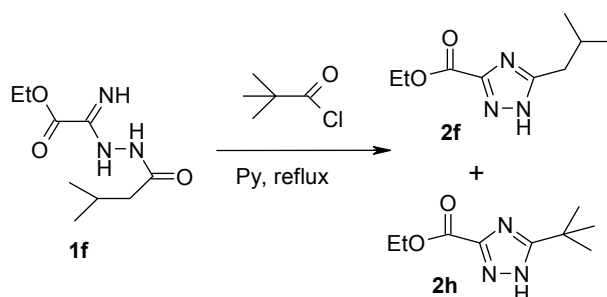


Схема 6.

Попытка получить соединения **2**, проводя N-ацилирование эфира оксикарбонилформимидной кислоты и конденсацию промежуточного N-ацилиминоэфира с гидразином (путь **B** на схеме 1) оказалась неудачной, возможно, ввиду высокой реакционной способности интермедиатов.

Мы предположили, что эффективным способом построения гетероцической системы 1,2,4-триазола может быть реакция β -ацил-

амидразонов **1** с 1 экв. соответствующего хлорангидрида или ангидрида в избытке основания при повышенной температуре (например, в кипящем пиридине) или двухстадийный процесс – N-ацилирование β -ациламидразона с последующей термической циклизацией. Проведенные эксперименты подтвердили это предположение, циклизация β -ациламидразонов в таких условиях протекала быстро и с высокими выходами.

Проводя реакцию описанным выше образом, нам удалось в некоторых случаях выделить промежуточные продукты – N-ацилированные эфиры 1,2,4-триазол-3-карбоновых кислот **3**. Они очень легко (обычно в процессе хроматографического разделения) гидролизировались до эфиров 5-замещенных 1[H]-1,2,4-триазол-3-карбоновых кислот **2b-f** (выходы 75-85%). Также из неочищенного соединения **3f** в одну стадию аммонолизом в спиртовом растворе были получены амиды **4f** с выходом 90% (схема 5).

Для изучения влияния стерических факторов на направление пути циклизации мы провели дополнительный модельный эксперимент: обработали соединение **1f** 1 экв. пивалоилхлорида в кипящем пиридине, с последующим гидролизом на силикагеле (схема 6). Продуктом реакции явилась смесь соединений **2f** и **2h** в соотношении 1:2 (по данным ВЭЖХ). Это показывает, что направление циклизации по пути **a** (схема 4) является предпочтительным, и даже значительные стерические затруднения относительно мало влияют на соотношение скоростей реакций.

Таким образом, предлагаемый способ синтеза позволяет достаточно просто получать труднодоступные производные 5-алкилзамещенной 1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты.

Экспериментальная часть

В работе использовались этилцианформат, хлористый ацетил, гидразингидрат (100%), этиловые эфиры и хлорангидриды пропионовой, масляной, изомасляной, изовалериановой и циклопропанкарбоновой кислот (Sigma-Aldrich), растворители отечественного производства, очищенные по стандартным методикам.

¹H ЯМР-спектры зарегистрированы на приборе Bruker DPX-300 с рабочей частотой 300 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (δ , м.д.), константы спин-спинового расщепления – в Герцах.

Масс-спектр зарегистрирован на приборе API 150EX (Perkin-Elmer Instruments) (ионизация – электроспрей).

ВЭЖХ проводили на хроматографе Waters 740 с использованием колонки Symmetry C₁₈ (4.6×25 см), 5 мкм, при элюировании со скоростью 1 мл/мин. Детекция при 254 нм. Раствор А: Н₂О, раствор В: Н₂О–СН₃CN, 3:7; градиент В: 0% 4 мин, 0–15 % 12 мин.

Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel F₂₅₄ (Merck, Германия), для тонкослойной хроматографии – пластинки Сорбфил (отечественного производства) и Merck F₂₅₄ (Германия).

Гидразиды карбоновых кислот были получены из соответствующих этиловых эфиров и гидразингидрата по стандартной методике, гидрохлорид диэтилового эфира карбонилформимидной кислоты получен по методике [8].

Этил β-изобутирилоксаламидразон (1d). К раствору 1.13 г (0.011 моль) гидразида изомасляной кислоты в 5 мл безводного метанола добавили 2 г (0.011 моль) гидрохлорида диэтилового эфира карбонилформимидной кислоты при перемешивании и охлаждении льдом. По прохождении реакции (контроль по ТСХ, система хлороформ–метанол, 9:1), к реакционной массе прибавили раствор 1 г (0.012 моль) гидрокарбоната натрия в 10 мл воды. Метанол из реакционной массы удалили на ротаторном испарителе. Выпавшие белые кристаллы отфильтровали, осторожно промыли водой и диэтиловым эфиром и высушили на воздухе. Выход 1.2 г (60%). ¹H ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆): 0.84-0.92 (6H, дд, *J*₁ = 3.5, *J*₂ = 6.7, CH(CH₃)₂); 1.24 (3H, дт, *J*₁ = 4.5, *J*₂ = 7.1, OCH₂CH₃); 1.9-2.12 (2.2H, м, CH₂CH(CH₃)₂); 2.34-2.43 (0.8H, д, *J* = 7.0, CH₂CH(CH₃)₂); 4.20 (2H, д кв, *J*₁ = 4.5, *J*₂ = 7.1, OCH₂CH₃); 6.30-6.51 (2H, уш. м, NHNH); 9.54-9.86 (1H, уш. м, =NH).

Аналогично были получены: этил β-ацетилоксаламидразон (**1a**) (44% из гидразида уксусной кислоты), этил β-пропионилоксаламидразон (**1b**) (21% из гидразида пропионовой кислоты), этил β-бутирилоксаламидразон (**1c**) (23% из гидразида масляной кислоты), этил β-циклопропанкарбонилоксаламидразон (**1e**) (50% из гидразида циклопропанкарбоновой кислоты), этил β-изовалерилоксаламидразон (**1f**) (51% из гидразида изовалериановой кислоты) и этил β-бензоилоксаламидразон (**1g**) (50% из гидразида бензойной кислоты).

¹H ЯМР-спектры (DMSO-*d*₆):

1a: 1.24 (3H, м, OCH₂CH₃); 1.89 и 2.07 (1.3H и 1.6H, 2с, C(O)CH₃); 4.20 (2H, м, OCH₂CH₃); 6.39 (2H, уш. д, *J* = 15.2, NHNH); 9.76 (1H, уш. д, *J* = 9.4, =NH).

1b: 0.81-0.92 (3H, м, CH₂CH₂CH₃); 1.20-1.27 (3H, м, OCH₂CH₃); 1.54 (2H, м, CH₂CH₂CH₃); 2.12 и 2.47 (1H и 1H, 2т, *J* = 7.4, CH₂CH₂CH₃); 4.13-4.26 (2H, м, OCH₂CH₃); 6.3-6.55 (2H, уш. м, NHNH); 9.56-9.83 (1H, уш. м, =NH).

1c: 0.87 (3H, дт, *J*₁ = 7.37; *J*₂ = 4.95, CH₂CH₂CH₃); 1.24 (3H, дт, *J*₁ = 7.06, *J*₂ = 3.57, OCH₂CH₃); 1.54 (2H, дт, *J*₁ = *J*₂ = 7.37, CH₂CH₂CH₃); 2.13 и 2.47 (1H и 1H, 2т, *J* = 7.37, CH₂CH₂CH₃); 4.20 (2H, д кв, *J*_{кв} = 7.06; *J*_д = 2.88, OCH₂CH₃); 6.37 и 6.45 (2H, 2 уш. с, NHNH); 9.74 (1H, уш. с, NH).

1e: 0.69-0.81 (4H, м, -CH₂-CH₂- с-Pr); 1.24 (3H, т, *J* = 7.10, OCH₂CH₃); 1.61 и 2.53 (0.5H и 0.5H, 2 м, -CH- с-Pr); 4.21 (2H, д, *J* = 7.06; OCH₂CH₃); 6.42 (2H, уш. д, *J* = 8.0, NHNH); 9.92 (1H, д, *J* = 9.95, =NH).

1f: 0.88 (6H, дд, *J*₁ = 6.63, *J*₂ = 3.47, -CH(CH₃)₂); 1.23 и 1.24 (3H, 2т, *J*₁ = 7.06; *J*₂ = 7.10, OCH₂CH₃); 1.96-2.10 (2.2H, м, CH₂CH(CH₃)₂); 2.39 (0.8H, д, *J* = 7.03, -CH₂CH(CH₃)₂); 4.15-4.25 (2 H, м, OCH₂CH₃); 6.35-6.42 (2H, уш.

м, NHNH); 9.62-9.81 (1H, уш. м, =NH).

1g: 1.27 (3H, т, $J = 7.05$, OCH_2CH_3); 4.25 (2H, кв, $J = 7.05$, OCH_2CH_3); 6.76 (2H, уш. с, NHNH); 7.42-7.58 (3H, м, PhH); 7.77-7.86 (2H, м, PhH); 10.06 (1H, уш. с, =NH).

Этиловый эфир 5-изопропил-1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (2d). К перемешиваемой суспензии 1 г (5 ммоль) соединения **1d** в 5 мл абсолютного пиридина прибавили 0.53 г (5 ммоль) хлорангидрида изомасляной кислоты и нагрели до кипения. Кипятили 24 ч, затем растворитель удалили в вакууме, остаток хроматографировали на открытой колонке с силикагелем (18 г, элюент хлороформ). Фракции, содержащие целевой продукт, объединили, растворитель удалили в вакууме, остаток высушили в вакууме 10 мм рт. ст. в течение 3 ч. Выход 1.03 г (82%). ^1H ЯМР-спектр (CDCl_3): 1.33 (3H, т, $J = 7.14$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$); 1.36 (6H, д, $J = 6.98$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3.24 (1H, м, $J = 6.98$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 4.41 (2 H, кв, $J = 7.14$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

Аналогично были получены: этиловый эфир 5-этил-1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (**2b**) (85% из пропионилхлорида), этиловый эфир 5-циклопропил-1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (**2e**) (75% из хлорангидрида циклопропанкарбоновой кислоты), этиловый эфир 5-фенил-1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (**2g**) (68% из бензоилхлорида).

^1H ЯМР-спектры (CDCl_3):

2b: 1.33 (3H, т, $J = 7.64$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.35 (3H, т, $J = 7.14$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$); 2.92 (2H, кв, $J = 7.64$, CH_2CH_3); 4.42 (2H, кв, $J = 7.14$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

2e: 1.05-1.21 (4H, м, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ с-Pr); 1.38 (3H, т, $J = 7.12$, OCH_2CH_3); 2.13 (1H, м, $-\text{CH}-$ с-Pr); 4.45 (2H, д, $J = 7.12$; OCH_2CH_3).

2g: 1.31 (3H, т, $J = 7.14$, OCH_2CH_3); 4.40 (2H, кв, $J = 7.17$, OCH_2CH_3); 7.35-7.44 (3H, м, PhH);

8.03 (2H, м, PhH).

Этиловый эфир 5-метил-1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (2a). 0.87 г (5 ммоль) β -ацетилосаламидразона (**1a**) кипятили при перемешивании в 5 мл уксусного ангидрида 8 ч. Растворитель удалили в вакууме, остаток суспендировали в 1 мл насыщенного водного раствора гидрокарбоната натрия, отфильтровали, промыли водой (1 мл), высушили на воздухе. Выход 0.54 г (70%). ^1H ЯМР-спектр (ацетон- d_6): 1.33 (3H, т, $J = 7.12$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$); 2.45 (3H, с, 5- CH_3); 4.33 (2 H, кв, $J = 7.12$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

Амид 5-изобутил-1[Н]-1,2,4-триазол-3-карбоновой кислоты (4f). К перемешиваемой суспензии 1.1 г (5 ммоль) соединения **1f** в 5 мл абс. пиридина прибавили 0.60 г (5 ммоль) хлорангидрида изовалериановой кислоты и нагревали до кипения. Кипятили 24 ч, затем растворитель удалили в вакууме, остаток растворяли в этиловом спирте (5 мл), прибавляли 1 мл 30% водного аммиака, нагревали до кипения. Кипятили 72 ч, через каждые 12 ч прибавляя 0.25 мл 30% водного аммиака, выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой и диэтиловым эфиром, высушивали на воздухе. Выход 0.76 г (90%). ^1H ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$): 0.88 (6H, уш. д, $J = 6.88$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.88-2.07 (2.4H, м, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2.56 (0.6H, уш.д, $J = 6.88$, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 7.38-7.77 (0.5H, уш. м, CONH_2); 9.61 (0.6H, с, 1-NH). Молекулярный ион m/z : 169.6.

Данная научно-исследовательская работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы и при финансовой поддержке фонда РФФИ (грант № 10-04-01020-а).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Potts K.T. The chemistry of 1,2,4-triazoles // Chem. Rev. 1961. V. 2. P. 113–124.
2. Верещагина Т.Н., Лопырев В.А. Синтез и превращения карбоновых кислот ряда 1,2,4-триазола. III. Получение и свойства 3-метил-1,2,4-триазол-5-карбоновой кислоты // Химия гетероцикл. соединений. 1970. № 12. С. 1695–1696.
3. Чудинов М.В., Константинова И.Д., Рыжова О.И., Есипов Р.С., Юркевич А.М., Швеи В.И., Мирошников А.И. Новый эффективный способ синтеза 5-замещенных производных 1,2,4-триазол-3-карбоксамидов и рибавирина // Хим.-фарм. журн. 2005. № 4. С. 43–46.
4. Vemishetti P., Leiby R.W., Abushanab E., Panzica R.P. A practical synthesis of ethyl 1,2,4-triazole-3-carboxylate and its use in the formation of chiral 1',2'-seco-nucleosides of ribavirin // J. Het. Chem. 1988. V. 25. P. 651–654.
5. Oliver J.E., Sonnet P.E. Improved routes to methyl 4-methylimidazole-2-carboxylate and methyl 5-methyl-1,2,4-triazole-3-carboxylate // J. Org. Chem. 1973. V. 38. P. 1437–1438.
6. Witkowski J.T., Robins R.K. 1,2,4-Triazole-3-carboxamides as antiviral agents: пат. 3976545 США. № 05/6117432; заявл. 29.09.1975; выдан 24.08.1976.
7. Matsuda K., Morin L. Preparation and reactions of 1-cyanoformimidic acid hydrazide // J. Org. Chem. 1961. V. 26. P. 3783–3787.
8. McKillop A., Chattopadhyay S.K., Henderson A., Avendano C. Applications of ethyl carboethoxyformimidate to heterocyclic synthesis: Preparation of condensed pyrazinones and 1,4-oxazinones // Synthesis. 1997. № 3. P. 301–304.

ЛИПИДНАЯ СТРАТЕГИЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ НУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ

Н.С. Шастина, доцент, Е.О. Баранова, аспирант, Л.Н. Дьякова,
аспирант, Д.В. Лоншаков, студент, В.И. Шве́ц, заведующий кафедрой
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: inosit@yandex.ru

В последние годы широко исследуются различные подходы к конструированию пролекарственных соединений на основе применяемых в терапевтической практике анти-ВИЧ-активных нуклеозидных препаратов. В работе рассмотрены принципы модификации лекарственных средств данного класса с помощью веществ липидной природы, позволяющие образующимся конъюгатам встраиваться в естественные пути транспорта и метаболизма природных липидов, что приводит к повышению биодоступности нуклеозидных агентов. Представлены литературные данные, посвященные исследованиям пронуклеотидного подхода для повышения терапевтической эффективности нуклеозидных препаратов и снижения их побочного действия на организм. Также приводятся результаты собственных экспериментальных исследований путей синтеза и свойств новых липидмодифицированных анти-ВИЧ-нуклеозидов.

In recent years, various approaches to the prodrug design on the basis of anti-HIV active nucleoside compounds used in the therapy are intensively investigated. In this paper, the principles of modifying this class of drugs by lipid substances allowing obtained conjugates to insert in natural lipid transport and metabolic pathways that can increase nucleoside agents bioavailability are described. Literature data associated with the research of the pronucleotide approach serving the purpose of increasing nucleoside drugs therapeutical efficacy and reducing the side effects on the organism are reviewed. Experimental data obtained by the authors in course of research of synthetic routes and properties of the new lipid-modified anti-HIV nucleosides are also presented.

Ключевые слова: анти-ВИЧ-нуклеозиды, пролекарственные соединения, псевдотриглицериды, инозитсодержащие фосфолипиды, биодоступность.

Key words: anti-HIV-nucleosides, prodrugs, pseudo triglycerides, inositol containing phospholipids, bioavailability.

Одной из актуальных проблем современной фармакологии является создание противовирусных препаратов, в частности, для лечения ВИЧ-инфекции. Нуклеозидные анти-ВИЧ-препараты составляют основу высокоактивной антиретровирусной терапии и препятствуют работе обратной транскриптазы вируса, конкурируя с природными субстратами и терминируя растущую цепь вирусной ДНК [1–3]. Однако применяемые в терапии вирусных заболеваний нуклеозидные препараты наряду с высокой эффективностью действия имеют существенные недостатки, связанные с их низкой биодоступностью, слабой способностью к трансмембранному транспорту, необходимостью использования высоких доз этих лекарственных соединений, что сказывается на проявлении ими токсических свойств, формировании резистентных вирусных штаммов.

Эти недостатки стимулируют поиск и изучение различных подходов к структурной модификации данных химиотерапевтических агентов. Одним из путей является создание конъюгатов анти-ВИЧ-нуклеозидов с веществами липидной природы: жирными кислотами, диглицеридами и фосфолипидами [4, 5]. Такие липофильные пролекарственные соединения сами по себе являются фармакологически неактивными, в организме же они подвергаются ферментативному гидролизу, приводящему к

высвобождению фармакологически активного соединения – противовирусного нуклеозида. Данный подход, во-первых, позволяет значительно улучшить биотранспортные характеристики лекарственных средств за счет придания им гидрофобных свойств (рис. 1). Во-вторых, дает возможность нацеливания анти-ВИЧ-нуклеозидов на лимфатическую систему (увеличение их лимфотропности), что обусловлено путями метаболизма соединений липидной природы в организме человека, при этом лимфатический транспорт позволяет избежать первичного метаболизма этих соединений в печени, таким образом повышая их биодоступность. Кроме того, он обеспечивает направленное воздействие модифицированных препаратов на вирусы, так как последние локализуются и распределяются в организме главным образом в лимфатической системе.

Применение пролекарственного подхода к нуклеозидным противовирусным препаратам может привести к преодолению недостатков лекарственных средств данного класса, а также придать им новые свойства.

Конструируя модифицированные нуклеозидные препараты, необходимо учитывать естественные пути метаболизма липидов внутри организма: гидролиз, абсорбцию, внутриклеточную трансформацию в энтероцитах [6, 7]. Важными характеристиками этих соединений

являются тип связи между лекарственным средством и соединением липидной природы, оптимальная скорость гидролиза такой связи *in*

vivo, необходимая для создания терапевтической концентрации лекарственного средства в месте его действия, а также их токсичность.

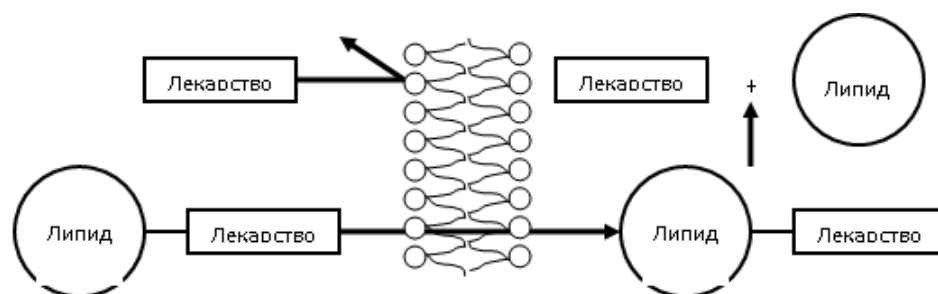
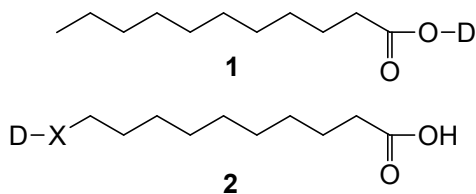


Рис. 1. Принцип использования соединений липидной природы для улучшения мембранотропных свойств гидрофильных фармакологически активных средств.

КОНСТРУИРОВАНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИ-ВИЧ-НУКЛЕОЗИДОВ С ВЕЩЕСТВАМИ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ Пролекарственные соединения на основе жирных кислот

Для создания пролекарственных соединений на основе жирных кислот используется два подхода (рис. 2). При использовании первого подхода фармакологически активное вещество присоединяют к гидрофобной матрице через сложноэфирную связь (соединение 1) [8]. Липофильность препарата в этом случае увеличивается, однако отсутствие свободной карбоксильной группы препятствует связыванию таких соединений с альбумином, осуществляющим транспорт жирных кислот в крови.



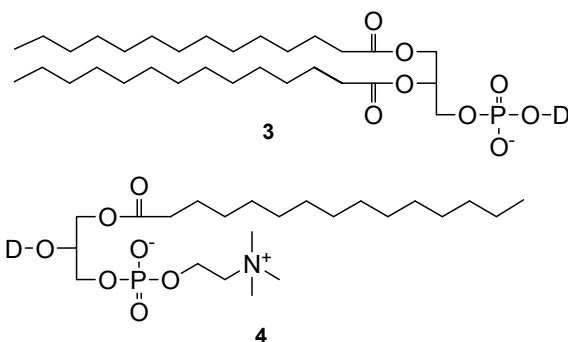
X = O, NH; D (drug) – молекула фармакологически активного соединения

Рис. 2. Жирные кислоты как матрицы для получения липофильных пролекарственных соединений.

Пролекарственные соединения, в которых фармакологически активная молекула находится в ω -положении модифицированной жирной кислоты (соединение 2), могут связываться с альбумином сыворотки крови и в виде комплекса попадать в гепатоциты [2]. Таким образом, появляется возможность доставки лекарственных препаратов в клетки печени.

Пролекарственные соединения на основе фосфолипидов

В большинстве случаев фармакологически активное вещество связывают с фосфатной группой фосфолипида, получая конъюгаты 3 [8, 9], однако в последнее время создаются пролекарственные соединения 4, в которых молекула лекарственного препарата замещает собой жирнокислотную цепь [10] (рис. 3).



D – молекула фармакологически активного соединения

Рис. 3. Подходы к созданию липофильных пролекарственных соединений на основе фосфолипидов.

Данный пролекарственный подход широко применяется для создания конъюгатов фармакологически активных нуклеозидов. Последние подвергаются в организме фосфорилированию до трифосфатов, а использование фосфолипидов в качестве переносчиков позволяет ускорить процесс фосфорилирования за счет того, что первая фосфатная группа уже имеется в молекуле пролекарственного соединения. Осуществлен также синтез липонуклеотидов, в которых аналоги нуклеозидов присоединены к ди- и триацилглицерофосфатам, что увеличивает терапевтическое воздействие лекарства на организм.

Пролекарственные соединения на основе диглицеридов. Псевдотриглицеридный подход

Панкреатические липазы тонкого кишечника, осуществляющие гидролиз сложноэфирных связей в молекулах триглицеридов, в первую очередь гидролизуют связи в положениях 1 и 3 глицеринового остова, во 2-ом положении этот процесс идет с очень незначительной скоростью [5, 11]. Для того чтобы высвобождение лекарственного средства не происходило в просвете кишечника, при создании липофильных пролекарственных соединений фармакологически активные вещества вводятся во 2-ое положение глицеринового остова (рис. 4) [4, 5, 10–13].

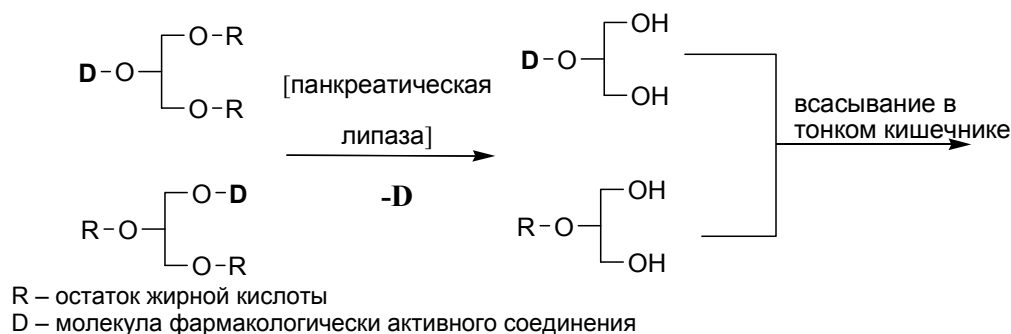


Рис. 4. Стратегии создания псевдотриглицеридных пролекарственных соединений: имитация природных триглицеридов.

Дальнейшие метаболические пути образующихся при ферментативном гидролизе моноглицеридов и жирных кислот зависят от длины жирнокислотных цепей [5]. Желудочно-кишечный тракт богато снабжен лимфатическими и кровеносными сосудами, поэтому абсорбированный материал может попадать либо в кровь (в воротную вену), либо в брыжеечную лимфу (рис. 5). Соединения с короткими цепями ($< C_{10}$) всасываются эпителиальными клетками тощей и подвздошной кишок, попадают в кровь, где связываются с альбумином сыворотки, а затем поступают в печень через воротную вену. Соединения с жирнокислотными цепями средней длины ($C_{10} - C_{12}$) главным образом окисляются, а с длинными цепями ($> C_{12}$) после резорбции эпителиальными клетками – энтероцитами – активируются коферментом А и подвергаются этерификации с образованием новых триглицеридов, которые поступают в лимфу в виде хиломикрон и, в обход печени, через грудной (лимфатический) проток попадают в кровь. Как на апикальной (со стороны просвета

кишечника), так и на противоположной базальной мембранах эпителиальных клеток кишечника находится ряд переносчиков липидов и холестерина, которые вместе с внутриклеточными связывающими белками облегчают абсорбцию и внутриклеточный транспорт таких соединений [5, 14, 15].

Транспорт липидов с жирнокислотными остатками $> C_{12}$ лимфатической системой, а с остатками $< C_{10}$ – кровеносной обусловлен несколькими факторами [6, 7]:

- скорость течения жидкости в воротной вене почти в 500 раз выше, чем в лимфатической системе; это способствует тому, что большинство соединений с $\log P < 5$ (где P – коэффициент распределения между фазами в системе октанол/вода), то есть гидрофильных соединений, всасываются именно в кровь; липиды с остатками длинноцепных жирных кислот, тем более триглицериды, имеют значение $\log P$ намного больше 5 и попадают из энтероцитов в брыжеечную лимфу;

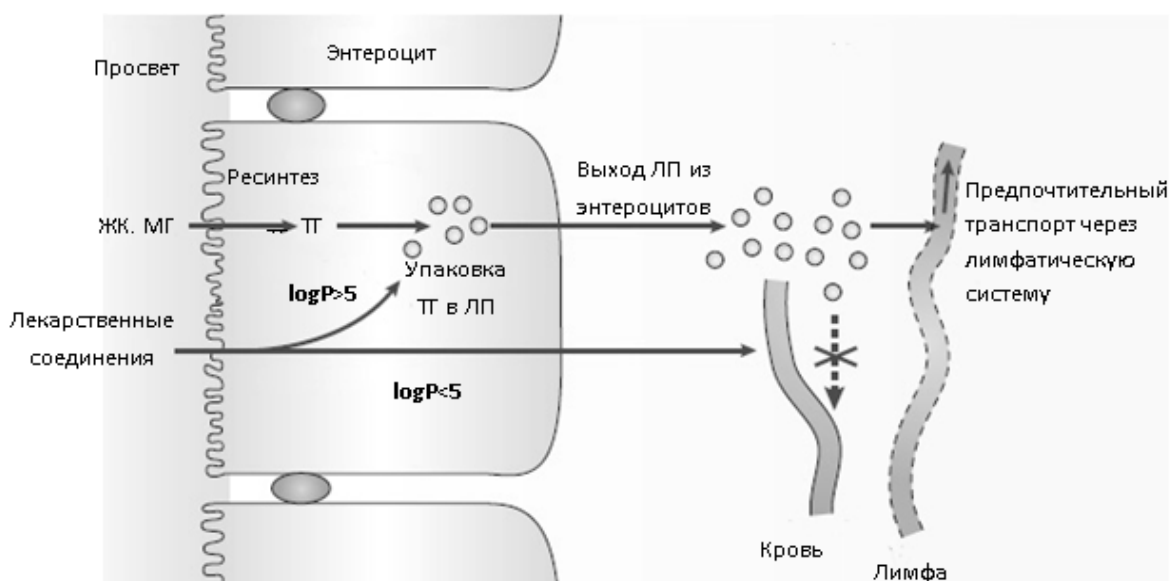


Рис. 5. Схема абсорбции лекарственных соединений в энтероцитах и транспорта в лимфатическую систему и в воротную вену (ЖК – жирные кислоты; МГ – моноглицериды; ТГ – триглицериды; ЛП – липопротеины).

- стенки лимфатических капилляров, в отличие от кровеносных, более перфорированы и проницаемы для соединений с большим молекулярным весом и коллоидных частиц;

- в энтероцитах происходит сборка липопротеинов, главным образом, хиломикронов – шаровидных агрегатов с неполярным ядром из триацилглицеринов и полярной оболочки из фосфолипидов и холестерина. Они обеспечивают транспорт пищевых липидов от кишечника к тканям; достаточно большие размеры липопротеинов обеспечивают их всасывание именно в лимфатическую систему;

- надо также отметить, что наличие в составе липидов остатков моно- и полиненасыщенных жирных кислот способствует сборке более крупных липопротеинов и, следовательно, их лимфатическому транспорту; в лимфу всасываются также и фосфолипиды, особенно фосфатидилхолин.

Таким образом, подход, основанный на увеличении липофильности фармакологически активных соединений посредством их конъюгирования с липидами, содержащими остатки длинноцепных жирных кислот, позволяет нацелить лекарственные средства на лимфатическую систему и, как следствие, на вирусы и опухоли, которые часто локализуются в ней, что особенно актуально для анти-ВИЧ-препаратов, а также на В- и Т-лимфоциты, что важно при использовании иммуномодулирующих средств. Кроме того, данная стратегия позволяет избежать первичного метаболизма лекарственных препаратов в печени и, следовательно, добиться увеличения их биодоступности.

Получение липофильных конъюгатов анти-ВИЧ-нуклеозидов с использованием пронуклеотидного подхода

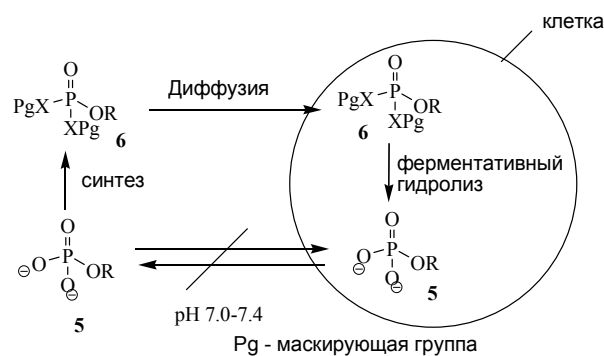
Необходимо отметить, что образование активных фосфатных метаболитов противовирусных нуклеозидных препаратов при действии клеточных нуклеозид(нуклеотид)киназ, лежащее в основе ингибирования вирусспецифических белков в ходе репликативного цикла, зачастую является медленным процессом, снижающим активность данных лекарственных средств. Начальное фосфорилирование является лимитирующей стадией во внутриклеточном метаболизме противовирусных нуклеозидов, поскольку часть из них имеет низкое сродство к нуклеозидкиназам. Кроме того, активность нуклеозидкиназ некоторых клеток, таких как моноциты/макрофаги, может быть недостаточной для удовлетворительного фосфорилирования даже аналогов нуклеозидов, имеющих высокое сродство к ферменту (например, 3'-азидо-3'-дезокситимидина, AZT) [14–17]. Поэтому одним из подходов для решения проблемы инициации фосфорилирования явля-

ется превращение противовирусных нуклеозидов в пролекарственные формы, содержащие в 5'-положении нуклеозида фосфо- или фосфонатэфирные фрагменты, что позволяет в результате внутриклеточного гидролиза получать требуемый нуклеозидмонофосфат.

Внутриклеточная доставка монофосфатной формы приводит к более эффективному образованию трифосфата нуклеозида, чем посредством естественного метаболического пути, и более выгодна для тех препаратов, которые в своей исходной нуклеозидной форме гидролизуются быстрее, чем фосфорилируются клеточными киназами до дидезоксинуклеозидмонофосфата.

Такой пронуклеотидный подход способствует инициации фосфорилирования, позволяет уменьшить промежуток времени от момента введения пролекарственного соединения в организм до момента начала его действия, улучшить характеристики трансмембранного транспорта и изменить внутриклеточный метаболизм нуклеозидных препаратов. Некоторые из таких препаратов, имеющие высокую активность, способны быстро проникать в клетки-мишени и доставлять туда монофосфатную форму противовирусных нуклеозидов, уменьшать их токсическое действие вследствие снижения вводимой дозы [18–21].

Увеличение мембранотропности фосфоэфиров является важной проблемой, с которой сталкиваются при использовании пролекарственных соединений, имеющих в своей структуре фосфатные группы. Фосфат **5** (рис. 6) с низким значением pK_a (от 1 до 2) при физиологическом значении pH 7.0–7.4 полностью депротонирован и отрицательно заряжен. Поэтому он не может проникать через клеточные мембраны, кроме случаев активного транспорта: эндо- и экзоцитоза или с помощью вирусов. По этой причине необходимо вводить маскирующие защитные группы фосфорного центра, которые будут скрывать отрицательный заряд и способствовать проникновению молекулы **6** через мембраны. Но как только она попадет в клетку, защитные группы должны удалиться либо химическим (pH 7.3), либо ферментативным гидролизом (pH 6.5), с образованием исходного отрицательно заряженного фосфата **5**, который не может выйти во внеклеточное пространство через мембрану и, в отличие от защищенного, имеет фармакологическую активность. Причем гидролиз соединения **6** должен идти как можно с большей скоростью, что позволит увеличить концентрацию лекарства в клетке и, следовательно, уменьшить дозу вводимого в организм лекарственного препарата [22].



X = O, NH

R – остаток фармакологически активного соединения

Рис. 6. Принцип использования защитных групп (Pg) на примере фосфомоноэфиров.

Такие защитные группы основаны на создании фосфотриэфиров. Этот подход, использующий маскирующие защитные группы, может быть успешно применен для улучшения

мембранопроницаемости как фосфомоноэфиров **5**, так и фосфодиэфиров.

Было показано [22, 23], что для обеспечения ферментативного расщепления соединения **6** с биodeградируемой защитной группой до соединения **5** необходимо, чтобы гидролиз проходил на некотором расстоянии от фосфорного центра фосфотриэфира **6**. Фермент гидролизует лишь концевую часть Y защитной группы, на которую направлена его активность, другая ее часть X отщепляется самопроизвольно. Эта идея получила название концепции «трехкомпонентного пролекарственного соединения» (рис. 7). На основе этого принципа создано достаточно много биodeградируемых защитных групп, в которых сайт действия фермента удален от атома фосфора на некоторое расстояние. Однако при разработке таких защит надо помнить о возможной токсичности продуктов гидролиза.

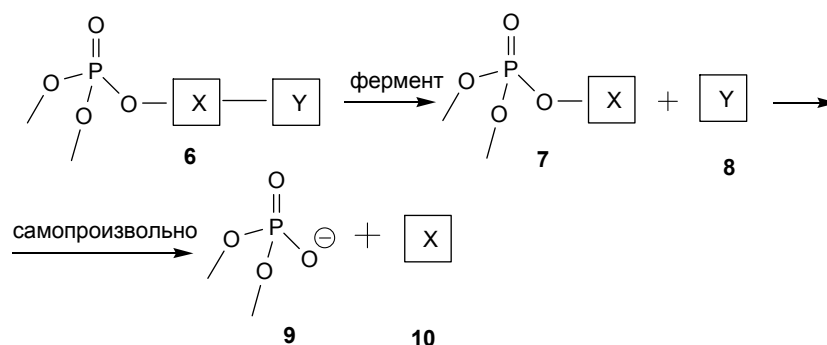


Рис. 7. Концепция «трехкомпонентного пролекарственного соединения».

Наиболее известными и широко используемыми в практике являются следующие маскирующие защитные группы (рис. 8):

- ацилоксиалкильные защиты, к которым относятся ацетоксиметильная (AM) защита ($R^1 = H$, $R^2 = Me$) и пивалоилоксиметильная (POM) защита ($R^1 = H$, $R^2 = tBu$) (соединение **11**) [24, 25];

- тиоэтильные производные [10, 11], из которых достаточно распространенными являются S-[(2-гидроксиэтил)сульфидил]-2-тиоэтиловый (DTE) эфир **12** и S-ацил-2-тиоэтиловый (SATE) эфир **13** [26, 27];

- циклическая салициловая (*cycloSal*) защитная группа (соединение **14**), формирующая шестичленное кольцо, которое маскирует отрицательный заряд на фосфате [28–30].

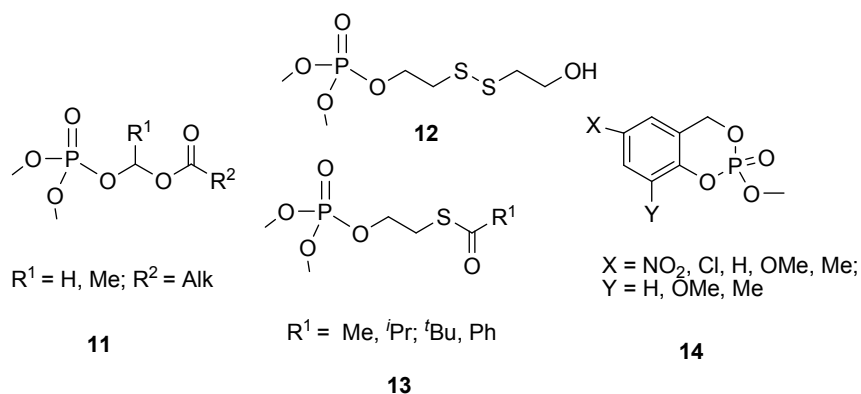
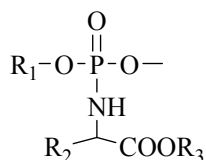


Рис. 8. Примеры маскирующих защитных групп фосфорного центра.

Еще одним подходом к маскировке фосфатных групп и, как следствие, к увеличению мембранотропности фосфоэфиров является синтез на их основе амидофосфатов **15** (рис. 9). Использование в структуре амидофосфатов гидрофобных аминокислот и липидов, содержащих остатки длинноцепных кислот и спиртов, позволяет придать им дополнительную гидрофобность, что, во-первых, актуально для улучшения мембранопроницаемости таких производных, а во-вторых, способствует лимфатическому транспорту пролекарственных соединений [31].

**15**

$\text{R}_1 = \text{Ar}, \text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}(\text{CH}_2)_3, \text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}(\text{CH}_2)_3;$

$\text{R}_2 = \text{H}, (\text{L})\text{CH}_3, (\text{L}) \text{ и } (\text{D})(\text{CH}_3)_2\text{CH},$
 $(\text{L}) \text{ и } (\text{D})\text{PhCH}_2;$

$\text{R}_3 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{Ph}, \text{C}(\text{CH}_3)_3$

Рис. 9. Амидофосфаты как мембранотропные производные фосфоэфиров.

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ ЛИПИДМОДИФИЦИРОВАННЫХ АНТИ-ВИЧ-НУКЛЕОЗИДОВ

На кафедре биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова осуществляется комплекс научных исследований по созданию и изучению свойств новых липонуклеозидных конъюгатов на основе ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ, в течение многих лет проводятся работы по направленному химическому синтезу, выделению и изучению свойств природных и модифицированных биологически активных липидов, компонентов нуклеиновых кислот с целью создания новых противовирусных препаратов с повышенной эффективностью терапевтического действия.

В развитие данных исследований нами на основе псевдотриглицеридного подхода были разработаны стратегии и осуществлен синтез новых пролекарственных соединений анти-ВИЧ-активных нуклеозидов (3'-азидо-3'-дезокситимидина, AZT и 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидина, d4T) **16–21** (рис. 10). Соединение структурных фрагментов полученных глицеролипидных производных проводили с использованием биodeградируемых сложно-эфирных и функциональных фосфорных связей [32].

Модификация спейсерного звена липофильного вектора многоатомными спиртами дает возможность образования между ним и противовирусным нуклеозидом фосфоэфирных

связей, то есть получения пролекарственных соединений **20, 21**. Поскольку фосфорилирование является лимитирующей стадией внутриклеточной модификации нуклеозидов перед тем, как они начнут встраиваться обратной транскриптазой вируса в цепь ДНК [2], такой пронуклеотидный подход позволит уменьшить промежуток времени от момента введения пролекарственного соединения в организм до момента начала его действия.

Кроме того, введение остатков двухатомных спиртов (1,6-гександиола или 1,12-додекандиола) повышает липофильность и, следовательно, позволяет улучшить мембранотропные свойства пролекарственных соединений, нацеливая их на лимфатическую систему организма.

Модификация спейсерной части молекулы введением в ее структуру остатка глицерина приводит к получению пролекарственного соединения **18**, имеющего в своем составе несколько остатков фармакологически активных веществ, что может увеличить бионакопление лекарства в клетках-мишенях. Последнее, в свою очередь, способствует снижению дозы пролекарственного препарата и уменьшению его неблагоприятных побочных эффектов на здоровые клетки.

В процессе транспорта пролекарственных соединений в организме человека к клеткам-мишеням они могут подвергаться как химическому, так и ферментативному гидролизу. Поэтому важной задачей является конструирование пролекарственных соединений с контролируемым высвобождением фармакофоров преимущественно по месту их действия, то есть в клетках-мишенях. При изучении свойств таких конъюгатов необходимо исследовать, в какой степени они подвержены химическому и ферментативному гидролизу.

Для синтезированных на основе нуклеозидных препаратов псевдотриглицеридных пролекарственных соединений, предназначенных для перорального применения, желательно, чтобы скорость их химического гидролиза была достаточно низкой во избежание преждевременного высвобождения лекарственного средства в процессе транспорта в организме к клеткам, инфицированным ВИЧ.

Исследование гидролитических свойств конъюгатов анти-ВИЧ-активных нуклеозидов и производных 1,3-диглицерида **16–19, 21** и проведение предварительных исследований кинетики гидролиза данных липонуклеозидов в буферных растворах, моделирующих pH сред пищеварительного тракта, крови, лимфатической системы, показали, что они стабильны в нейтральных условиях (pH 7.3); в основных условиях (pH 9.5) время половинного гидролиза конъюгатов значительно уменьшается (табл.).

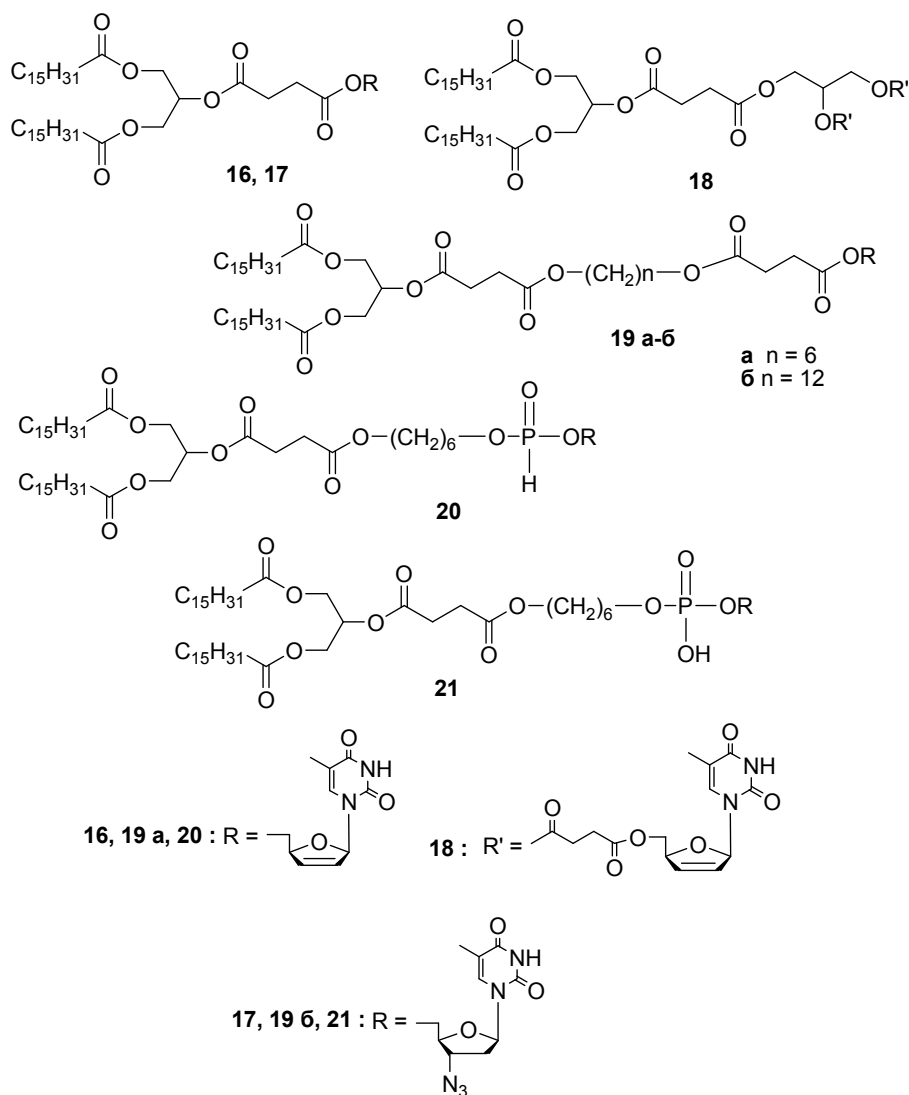


Рис. 10. Глицеролипидные пролекарственные соединения на основе AZT и d4T, полученные с использованием псевдотриглицеридной стратегии.

Так как пролекарственные средства конструируются на основе подхода биоимитации физико-химических и метаболических характеристик природных триглицеридов, то они должны быть чувствительны к действию панкреатической липазы тонкого кишечника человека, подвергаясь гидролизу с образованием 2-псевдомоноглицеридов, которые всасываются клетками эпителия кишечника – энтероцитами [11].

Модель липидного расщепления является широко используемым подходом для оценки липидных систем доставки лекарств *in vitro*. Липолиз пролекарственных средств **16–21** под действием панкреатической липазы свиньи и исследование кинетики гидролиза осуществляли инкубированием липонуклеозидов с ферментом с активностью 375 U/мл при 37°C в PIPES-буфере (pH 6.5) в присутствии тауродезоксихолата натрия в качестве кофактора фермента. Полученные данные по времени половинного гидролиза конъюгатов, а также динамике образования продуктов свидетельствуют о высокой чувствительности исследуемых

пролекарственных соединений к действию панкреатической липазы свиньи (табл.).

Обычно для увеличения лимфатической абсорбции лекарственных соединений предлагаются три вида липидных систем доставки – эмульсии, смешанные мицеллы, липосомы. В большинстве случаев такие лекарственные формы повышают синтез хиломикронов в энтероцитах, и липофильные препараты поступают в кишечную лимфу путем ассоциации с продуктами усвоения жиров, секретируясь совместно с лимфатическими липопротеинами. Установлено, что липонуклеозиды эффективно включаются в фосфолипидный бислой липосом, способных осуществлять транспорт этих лекарственных форм в макрофаги – «хранилища» ВИЧ-инфекции, и таким образом уменьшать токсичность противовирусных нуклеозидов в отношении других клеток. Для разработки таких форм доставки терапевтических агентов на основе синтезированных пролекарственных соединений нами были отработаны подходы к созданию липосомальных препаратов различного

Таблица. Экспериментальные данные химического и ферментативного гидролиза липонуклеозидов.

Соединение	Химический гидролиз t½, ч			Ферментативный гидролиз t½, мин
	pH 9.5	pH 8.5	pH 7.3	Панкреатическая липаза, pH 6.5
16	2.5	6.0	7.0	23.0
17	14.2	18.0	>26.0*	8.5
18	3.0	6.0	9.5	15.0
19a	2.0	3.5	8.0	6.0
19b	15.0	20.0	>28.0*	17.0
20	-	-	-	1.0
21	7.5	18.0	>22.0*	2.5

* Значение получено экстраполяцией экспериментальных данных.

состава и определены их свойства. Осуществлено включение липонуклеозидов **17**, **19b** и **21** в липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и холестерина, при этом размеры образующихся частиц составили порядка 200–400 нм.

Нами также проводились исследования другого варианта модификации анти-ВИЧ-активных нуклеозидов (AZT и d4T), основанного на использовании в качестве липидной транспортной системы фосфатидилинозита.

Создание лекарственных препаратов на основе природного шестиатомного циклического спирта *мио*-инозита представляется перспективным направлением в конструировании и модификации фармакологически активных соединений. Интерес к химии производных *мио*-инозита обуславливается их высокой биологической активностью. Известно, что *мио*-инозит обладает витаминной активностью и оказывает гиполипидемическое, липотропное, противоопухолевое действие. Кроме того, фосфоинозитиды, являясь минорными компонентами клеточных мембран, принимают активное участие в процессах клеточной регуляции [33]. Поэтому создание на их основе липофильных производных противовирусных нуклеозидов дает возможность улучшить фармакокинетические свойства препаратов, их проницаемость через биологические мембраны, пролонгировать их действие и способствовать направленному транспорту нуклеозидов в клетки-мишени.

Для создания инозитсодержащих липонуклеозидов нами были предложены оригинальные стратегии синтеза сложных фосфолипидов, позволяющие с помощью современных методов функционализации структурных фрагментов

молекул сократить количество синтетических стадий и получить соединения природного и модифицированного строения. На основе разработанных стратегий было проведено сравнительное изучение различных подходов к получению и осуществлен синтез липофильных конъюгатов AZT и d4T **22–24** (рис. 11).

При сравнении двух вариантов получения конъюгатов анти-ВИЧ-активных препаратов и фосфатидилинозита **22**, **23** было обнаружено преимущество стратегии, основанной на первоначальном введении бифункционального спейсера в молекулу частично замещенного *мио*-инозита с последующей этерификацией нуклеозидов, нежели базирующейся на предварительном синтезе нуклеозидного производного, несущего связующий остаток янтарной кислоты [34]. Одновременное введение нескольких остатков сукцинильного эфира AZT дало возможность получить динуклеозидсодержащий фосфоинозитид **24**.

Исследование устойчивости нуклеозид-фосфолипидов **22–24** в условиях pH-зависимого и ферментативного гидролиза с использованием сыворотки крови показало, что данные соединения существенно стабильнее в нейтральных условиях, в основных условиях время полового гидролиза значительно уменьшается, при этом ферменты не оказывают существенного влияния на деградацию этих соединений. Таким образом, характер выявленного в ходе экспериментов изменения устойчивости соединений в различных условиях позволяет отнести полученные конъюгаты к перспективным модификациям противовирусных нуклеозидных препаратов.

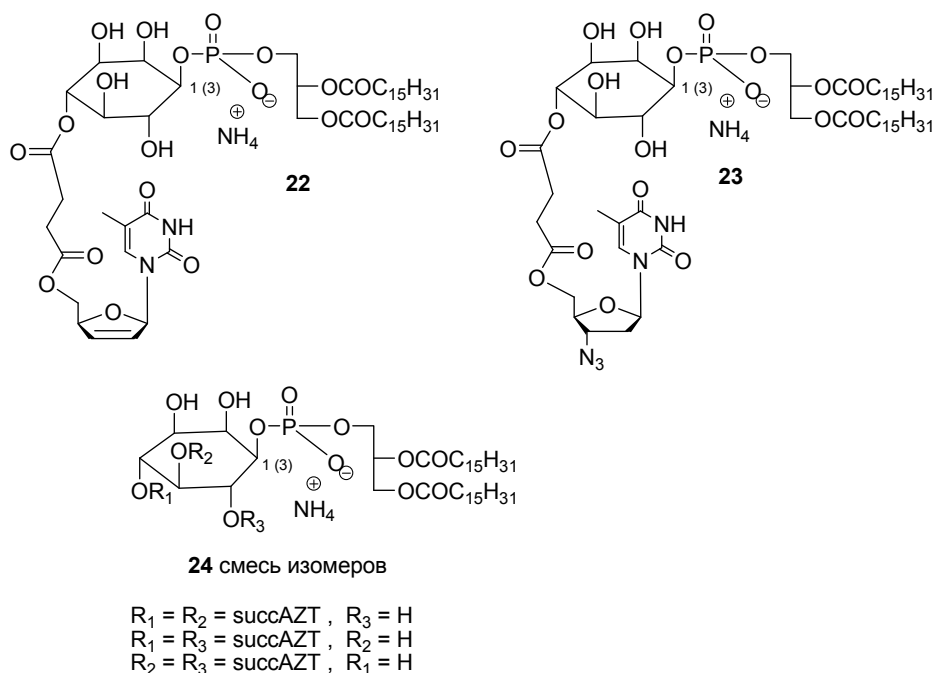


Рис. 11. Конъюгаты AZT и d4T и фосфатидилинозита.

Более полное изучение медико-биологических свойств исследуемых липофильных производных нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ позволит получить препараты с улучшенными свойствами. Таким образом, разработка липидной стратегии для структурной модификации применяемых в медицинской практике анти-ВИЧ-активных нуклеозидов и получение новых соединений с

высокой биологической активностью предоставляют возможность потенциального выхода на эффективные противовирусные средства.

Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № 14.740.11.0120).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use // J. Clin. Virol. 2004. V. 30. № 2. P. 115–133.
2. Schinazi R.F., Hernandez-Santiago B.I., Hurwitz S.J. Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses // Antivir. Res. 2006. V. 71. P. 322–334.
3. Mehello Y., Clercq E. Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: Where do we stand and where do we go? // J. Med. Chem. 2010. V. 53. P. 521–538.
4. Charman W.N., Porter C.J.H. Lipophilic prodrugs designed for intestinal lymphatic transport // Adv. Drug Deliv. Rev. 1996. V. 19. P. 149–169.
5. Lambert D.M. Rationale and applications of lipids as prodrug carrier // Eur. J. Pharm. Sci. 2000. V. 11 (Suppl. 2). P. S15–S27.
6. Trevaskis N.L., Charman W.N., Porter C.J.H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. V. 60. P. 702–716.
7. Porter C.J.H., Trevaskis N.L., Charman W.N. Lipids and lipid-based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. P. 231–248.
8. Gumina G., Choi Y., Chu C.K. Antiviral nucleosides: Chiral synthesis and chemotherapy. – Amsterdam: Elsevier, 2003. P. 1–76.
9. Holy A. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies // Antivir. Res. 2006. V. 71. P. 248–253.
10. Ali S.M., Khan A.R., Ahmad M.U., Sheikh S., Ahmad I. Synthesis and biological evaluation of gemcitabine–lipid conjugate (NEO6002) // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 2571–2574.
11. Scriba G.K.E. Phenytoin-lipid conjugates as potential prodrugs of phenytoin // Arch. Pharm. (Weinheim). 1993. V. 326. P. 477–481.
12. Lalanne M., Paci A., Andrieux K., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Deroussent A., Re M., Vassal G., Couvreur P., Desmaële D. Synthesis and biological evaluation of two glycerolipidic prodrugs of didanosine for direct lymphatic delivery against HIV // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 17. P. 2237–2240.
13. Wong A., Toth I. Lipid, sugar and liposaccharide based delivery systems // Curr. Med. Chem. 2001. V. 8. № 9. P. 1123–1136.

14. Clercq E. Toward improved anti-HIV chemotherapy: Therapeutic strategies for intervention with HIV infections // J. Med. Chem. 1995. V. 38. № 14. P. 2491–2517.
15. Zemlicka J. Lipophilic phosphoramidates as antiviral pronucleotides // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1587. P. 276–286.
16. Jones R.J., Bischofberger N. Minireview: Nucleotide prodrugs // Antiviral Res. 1995. V. 27. P. 1–17.
17. Saboulard D., Naesens L., Cahard D., Salgado A., Pathirana R., Velazquez S., McGuigan C., Clercq E., Balzarini J. Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine // Mol. Pharmacol. 1999. V. 56. P. 693–704.
18. Hu L. Prodrugs: Effective solutions for solubility, permeability and targeting challenges // IDrugs. 2004. V. 7. № 8. P. 736–742.
19. Uckun F.M., Pendergrass S., Venkatachalam T.K., Qazi S., Richman D. Stampidine is a potent inhibitor of zidovudine- and nucleoside analog reverse transcriptase inhibitor-resistant primary clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates with thymidine analog mutations // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 11. P. 3613–3616.
20. Birkus G., Hitchcock M., Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with nucleoside reverse transcriptase inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 3. P. 716–723.
21. Clercq E. Antiviral drug discovery and development: Where chemistry meets with biomedicine // Antivir. Res. 2005. V. 67. № 2. P. 56–75.
22. Schultz C. Prodrugs of biologically active phosphate esters // Bioorg. Med. Chem. 2003. V. 11. P. 885–898.
23. Carl P., Chakravarty P., Katzenellenbogen J. A novel connector linkage applicable in prodrug design // J. Med. Chem. 1981. V. 24. № 5. P. 479–480.
24. Schultz C., Vajanaphanich M., Harootunian A.T., Sammak J.P., Barrett E.K., Tsien Y.R. Acetoxymethyl esters of phosphates, enhancement of the permeability and potency of cAMP // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 6316–6322.
25. Dickson J.K., Biller S.A., Magnin D.R. [et al.]. Orally active squalene synthase inhibitors: bis((acyloxy)alkyl) prodrugs of the α -phosphonosulfonic acid moiety // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 661–664.
26. Lefebvre I., Perigaud C., Pompon A., Aubertin A.-M., Girardet J.-L., Kirn A., Gosselin G., Imbach J.-L. Mononucleoside phosphotriester derivatives with *S*-acyl-2-thioethyl bioreversible phosphate-protecting groups: Intracellular deliver of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-monophosphate // J. Med. Chem. 1995. V. 38. P. 3941–3950.
27. Villard A.-L., Coussot G., Lefebvre I., Augustijns P., Aubertin A.M., Gosselin G., Peyrottes S., Perigaud C. Phenyl phosphotriester derivatives of AZT: Variations upon the SATE moiety // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 7321–7329.
28. Meier C. *cycloSal*-pronucleotides – design of chemical trojan horses // Mini Rev. Med. Chem. 2002. V. 2. P. 219–234.
29. Meier C., Clercq E., Balzarini J. Nucleotide delivery from *cycloSal*igenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphates (*cycloSal*-AZTMP) // Eur. J. Org. Chem. 1998. V. 1998. P. 837–846.
30. Meier C., Lorey M., Clercq E., Balzarini J. *cycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and antiviral evaluation of a new d4TMP delivery system // J. Med. Chem. 1998. V. 41. P. 1417–1427.
31. Liang Y., Narayanasamy J., Schinazib R.F., Chu C.K. Phosphoramidate and phosphate prodrugs of (–)- β -D-(2*R*,4*R*)-dioxolane-thymine: Synthesis, anti-HIV activity and stability studies // Bioorg. Med. Chem. 2006. V. 14. P. 2178–2189.
32. Лоншаков Д.В., Баранова Е.О., Лютик А.И., Шастина Н.С., Шве́ц В.И. Синтез глицеролипидных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и исследование их свойств // Хим.-фарм. журн. 2010. Т. 44. № 10. С. 27–34.
33. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signaling // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2000. V. 1. P. 11–21.
34. Шастина Н.С., Тучная О.А., Эйнисман Л.И., Каширичева И.И., Степанов А.Е., Юркевич А.М., Шве́ц В.И. Исследования в области производных асимметрично замещенного мио-инозита. XXXIX. Синтез конъюгата 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидина с фосфатидилинозитом, нового нуклеозидфосфолипида с потенциальной анти-ВИЧ-активностью // Биоорган. химия. 2003. Т. 29. № 3. С. 296–302.

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ОЛИГОМЕРОВ ПОЛИАМИДНЫХ МИМЕТИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

М.В. Ширяева, аспирант, Ю.Г. Кириллова, доцент, О.В. Есипова, доцент,
С.В. Еремин, старший преподаватель, *Т.А. Лукьянова, научный
сотрудник, В.И. Шве́ц, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* ООО «НПФ Лутех»

e-mail: pna-miht@yandex.ru

Разработан Вос-протокол ручного твердофазного синтеза новых последовательностей отрицательно заряженных олигомеров полиамидных миметиков нуклеиновых кислот с регулярной структурой псевдопептидного остова на основе L-глутаминовой кислоты и глицина и различным положением карбоксиэтильного остатка. Представлены условия для их удаления с полимерного носителя, выделения и доказательства структуры.

A *Wos-protocol for manual solid-phase synthesis of novel sequences of negatively charged oligomeric polyamide mimetics of nucleic acids with a regular structure of the pseudopeptide backbone based on L-glutamic acid and glycine and having various positions of the carbethoxyethyl moiety was developed. Conditions for their cleavage from polymeric carrier, isolation and structure confirmation are presented.*

Ключевые слова: пептидно-нуклеиновые кислоты, полиамидные миметики нуклеиновых кислот, твердофазный синтез, Вос-протокол.

Key words: peptide nucleic acids, polyamide mimetics of nucleic acids, solid-phase synthesis, *Wos-protocol*.

В настоящее время ведется интенсивный поиск различных ДНК-миметиков, одной из разновидностей которых являются пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), имеющие в своем составе псевдопептидные фрагменты. Следует отметить, что ПНК обладают рядом преимуществ по сравнению с другими ДНК-миметиками. Во-первых, благодаря остову неприродного строения они устойчивы к действию клеточных ферментов; во-вторых, длина олигомера, необходимая для связывания с мишенью, может быть короче десяти мономерных единиц (в то время как необходимая для специфичного связывания длина в случае природных олигонуклеотидов составляет от 11 до 15 нуклеотидов) [1]. Также в литературе описаны примеры использования ПНК как противоопухолевых, противовирусных агентов и антибактериальных препаратов.

К настоящему моменту на основе «классических» ПНК (аминоэтилглициновых) (рис. 1А) [2] и принципах гибридизации с нуклеиновыми кислотами (НК) создан ряд технологий и методов, успешно применяемых в молекулярной биологии (расщепление и очистка нуклеиновых кислот, анализ и определение генетических мутаций, альтернатива саузерн-блоттингу, контроль над ПЦР-амплификацией) [3].

Мономерное звено «классических» ПНК – удобный синтон для дальнейшей дериватизации как по гетероциклическому, так и псевдопептидному фрагментам. При сохранении основных структурных черт остова все модифицированные ПНК имеют свой индивидуальный набор свойств: гибридизационные характерис-

тики, растворимость, способность к проникновению через клеточную и ядерную мембраны. Введение различных остатков в α - или γ -положения псевдопептида или встраивание циклических фрагментов привело к возникновению следующего поколения ПНК – хиральных ациклических и циклических полиамидных миметиков нуклеиновых кислот (ПАНКМ). Изучение свойств этих соединений, таких как аффинность (эффективность связывания с некомплементарными нуклеиновыми кислотами) и селективность (чувствительность к некомплементарным гетероциклическим основаниям) по отношению к олигонуклеотидам природного строения, направлены на выявление фундаментальных принципов взаимосвязи структуры полиамидного НК-миметика и точности комплементарного молекулярного узнавания, а также на расширение прикладного применения ПАНКМ и их аналогов *in vitro* и *in vivo*. Интересной и перспективной является регулярная полианионная хиральная модификация. В данном случае ПАНКМ заряжены одноименно с НК, а расположение хиральных центров в α - или γ -положениях остова определяют параметры и направление закручивания образующейся спирали (вправо или влево). Такая модификация будет сочетать, по всей видимости, высокую аффинность, устойчивость ПАНКМ и некоторые свойства природных нуклеиновых кислот.

В области создания новых видов ПАНКМ наше внимание направлено на отрицательно заряженные ПАНКМ на основе L-глутаминовой кислоты (рис. 1Б). Введение отрицательного заряда в структуру «классических» ПНК, по

всей видимости, будет повышать их растворимость в воде, снижать самоагрегацию, позволит управлять процессом гибридизации путем

изменения ионной силы раствора, а также увеличит специфичность их связывания с протяженными последовательностями НК.

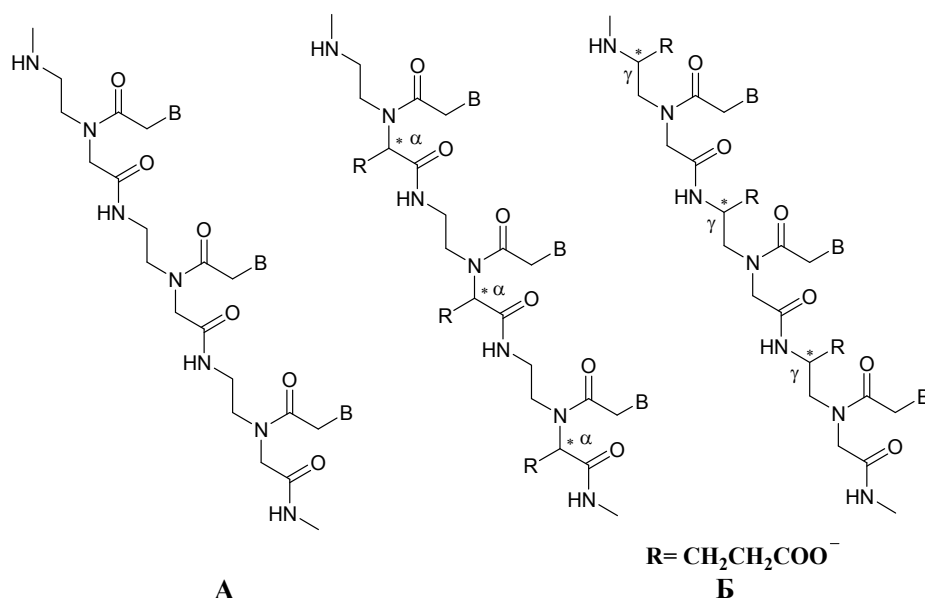


Рис. 1. Структура «классических» ПНК (А) и отрицательно заряженных α - и γ -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты (Б).

Ранее в нашей лаборатории были получены тиминсодержащие декамеры отрицательно заряженных (ОЗ) α -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты [4] по модифицированному Вос-протоколу синтеза «классических» ПНК [5, 6] на МВНА-смоле (полистирол с (4-метилбензгидрил)аминогруппами, сшитый 1-2% дивинилбензола). Однако для синтеза олигомеров ОЗ ПАНКМ, содержащих другие гетероциклические основания (рис. 2), необходима иная система для их полного деблокирования и удаления с полимерного носителя. Поэтому основной задачей данного этапа исследований был поиск такой системы и отработка методики твердофазного синтеза ОЗ ПАНКМ.

Загрузку полимерного носителя осуществляли конденсацией первого мономера с аминогруппами полимерного носителя и последующим кэпированием непрореагировавших аминогрупп системой уксусный ангидрид–диметилформамид–дихлорметан (Ac₂O/DMF/DCM, 1:1:1, v/v/v) в присутствии 2 экв. диизопропилэтиламина (DIEA).

Вос-защитную группу удаляли трифторуксусной кислотой (TFA) с добавлением 5% *m*-крезола. Нейтрализация концевой аминогруппы растущей цепи олигомера в сочетании с активацией *in situ* свободной α -карбоксильной группы мономера позволяет избежать реакции N-ацильного переноса, которая является причиной образования структурных изомеров продуктов олигомеризации [5]. Мономер ПАНКМ

активировали системой HBTU/DMF/DIEA (HBTU – гексафторфосфат О-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония) и добавляли к полимерному носителю. Реакцию конденсации проводили при перемешивании потоком аргона в течение 2 ч. Полноту протекания реакции контролировали по качественному нингидриновому тесту Кайзера [7]. Использование трехкратных избытков мономеров по отношению к реакционноспособным аминогруппам, увеличение времени конденсации с 10–15 мин [2, 3] до 2 ч позволило отказаться от дополнительных этапов кэпирования после каждой стадии конденсации. Для деблокирования и удаления с носителя полученных олигомеров ПАНКМ необходимой длины использовали систему «low-high» TFMSA (трифторметансульфокислота) [4]. Обработка раствором «low» (TFMSA/TFA/*m*-крезол/DMS, 1:11:2:6, v/v/v/v) (DMS – диметилсульфид) приводит к удалению всех защитных групп, а раствором «high» (TFMSA/TFA/*m*-крезол, 1:8:1, v/v/v) – к отщеплению олигомера ПАНКМ от полимерного носителя. Однако, синтезированные нами последовательности, включающие более трех мономерных звеньев, деградировали в данной системе из-за слишком жестких условий. В дальнейшем была найдена альтернативная система для отщепления ОЗ ПАНКМ со смолы – TFMSA/TFA/TES (3:1:0.1, v/v/v) (TES – триэтилсилан).

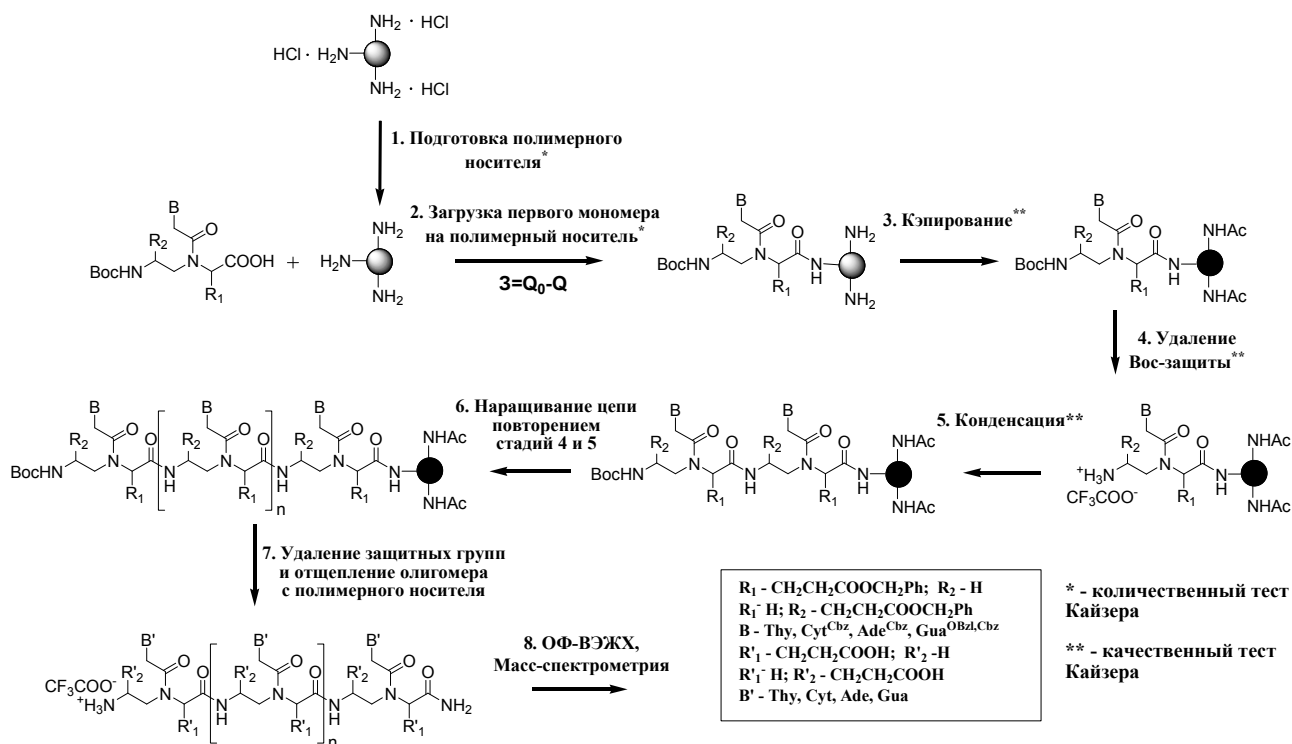


Рис. 2. Общая схема Вос-протокола твердофазного синтеза отрицательно заряженных α - и γ -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты.

По предложенной стратегии были синтезированы три различные последовательности α - и γ -ОЗ ПАНКМ:

1) Тример $\text{NH}_2(\text{TAC})\text{CONH}_2$ (Gly Ψ -*L*-Glu) (1) – данный олигомер получили при удалении с полимерного носителя системой «low-high» TFMSA (по 30 мин, 0°C).

2) Гексамер $\text{NH}_2(\text{TAGTAC})\text{CONH}_2$ (Gly Ψ -*L*-Glu) (2) – данный олигомер в условиях удаления с носителя системой «low-high» TFMSA выделить не удалось. При использовании данной системы последовательность расщепляется на фрагменты, отличающиеся по массе на одно мономерное звено, а также олигомеры различной длины, не содержащие гетероциклических оснований и карбоксиметильного линкера. Возможной причиной этого является наличие в олигомерах отрицательного заряда. Целевой олигомер был получен при удалении с носителя системой TFMSA/TFA/TES (30 мин, 0°C).

3) Тример $\text{NH}_2(\text{TCT})\text{CONH}_2$ (*L*-Glu Ψ Gly) (3) – данный олигомер также получили при удалении с полимерного носителя системой TFMSA/TFA/TES (30 мин, 0°C).

Полученные олигомеры выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Структуры синтезированных соединений подтверждали с помощью MALDI-TOF (матричной десорбционно-ионизационной времяпролетной) масс-спектрометрии (рис. 3).

Данные олигомеры ОЗ ПАНКМ были получены в количествах, необходимых для доказательства их структуры.

Таким образом, разработан Вос-протокол ручного твердофазного синтеза отрицательно заряженных ПАНКМ, подобраны условия для всех стадий синтеза ОЗ α -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты и глицина, содержащих четыре гетероциклических основания ДНК; найдена система для удаления олигомеров с полимерного носителя. Однако, для синтеза ОЗ γ -ПАНКМ требуется подбор условий (время реакции, соотношение компонентов и пр.), т.к. возможны побочные реакции циклизации.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реагенты и растворители: HBTU, уксусный ангидрид (Acros, Бельгия), TFA, TES, DIEA, Py (пиридин) (Lancaster, Великобритания), TFMSA (Acros Organics, США), DMS (Aldrich, США), *m*-крезол (Sigma-Aldrich, Германия), реактивы марки «х. ч.» и «ч. д. а.» отечественного производства: диметилформамид, дихлорметан, фенол, KCN, нингидрин, KOH, LiAlH_4 , триэтиламмоний хлорид, фталиевый ангидрид, P_2O_5 , CaCl_2 , NaHCO_3 , диэтиловый эфир, H_2SO_4 .

Мономеры ОЗ ПАНКМ были наработаны в препаративных количествах по ранее описанным методикам – α -мономеры [6, 8, 9] и γ -мономеры [10, 11].

Твердофазный синтез осуществляли на MBHA-смоле (100 мг, 0.591 ммоль $\text{NH}_2/\text{г}$ смолы) (Acros, Бельгия) с загрузкой полимерного носителя 0.310 ммоль $\text{NH}_2/\text{г}$ смолы. Все стадии синтеза проводили при перемешивании потоком аргона.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на обращенной фазе, колонка Ultrasphere ODS C18

(4.6×150 мм; 5 мкм), в системе 0.1 М ацетат аммония с градиентом метанола от 0 до 30% за 30 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 254 нм (Knauer/ UV VIS Detector LCD 2563, Германия). MALDI-TOF-масс-спектры полученных олигомеров ПАНКМ регистрировали на приборах Brucker UltraFlex и Brucker MicroFlex (Германия); в качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты или 3-гидроксипиколиновой кислоты в системе вода–ацетонитрил, 1:1.

Общий протокол твердофазного синтеза

(1) Удаление Вос-защиты^{**}: TFA–м-крезол (95:5, v/v), 3 мл, 1×20 мин и 1×10 мин;

(2) Промывка DMF/DCM (1:1, v/v), 4 мл, 2×2 мин; промывка DMF, 4 мл, 2×2 мин;

(3) Конденсация^{**}: 0.085 М раствор HBTU (1 экв./1 экв. мономера) в DMF добавляли к раствору мономера (3 экв./1 экв. свободных NH₂-групп смолы) и DIEA (2 экв./1 экв. мономера) в DMF до конечной концентрации мономера 0.05 М. Выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Время конденсации 2 ч;

(4) Промывка DMF, 4 мл, 2×2 мин; промывка DMF/DCM (1:1, v/v), 4 мл, 2×2 мин;

(5) Качественный нингидриновый тест Кайзера [7], если тест был положительным – проводили повторную конденсацию.

Этапы (1)–(5) повторяли до получения олигомера необходимой длины.

^{**} Качественный нингидриновый тест Кайзера. В случае синтеза последовательностей

длиннее тримера, после удаления Вос-защиты проводится количественный нингидриновый тест Кайзера каждый третий цикл для отслеживания загрузки (должна совпадать с первоначально рассчитанным значением).

NH₂(TAC)CONH₂ (GlyΨ-L-Glu) (1) получали деблокированием и удалением с 10.0 мг полимерного носителя системой TFMSA/TFA/DMS/м-крезол (30 мин, 0°C). ВЭЖХ, время удерживания: 2.17 мин. Масс-спектр (MALDI-TOF), m/z : 1026.0 $[M+H]^+$.

NH₂(TAGTAC)CONH₂ (GlyΨ-L-Glu) (2) получали деблокированием и удалением с 10.0 мг полимерного носителя системой TFMSA/TFA/TESi (30 мин, 0°C). ВЭЖХ, время удерживания: 18.04 мин. Масс-спектр (MALDI-TOF), m/z : 2075 $[M+H]^+$.

NH₂(TCT)CONH₂ (L-GluΨGly) (3) получали деблокированием и удалением с 6.7 мг полимерного носителя системой TFMSA/TFA/TESi (30 мин, 0°C). ВЭЖХ, время удерживания: 10.15 мин. Масс-спектр (MALDI-TOF), m/z : 1017.0 $[M+H]^+$.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (госконтракт № 14.740.11.0634) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-01026а).

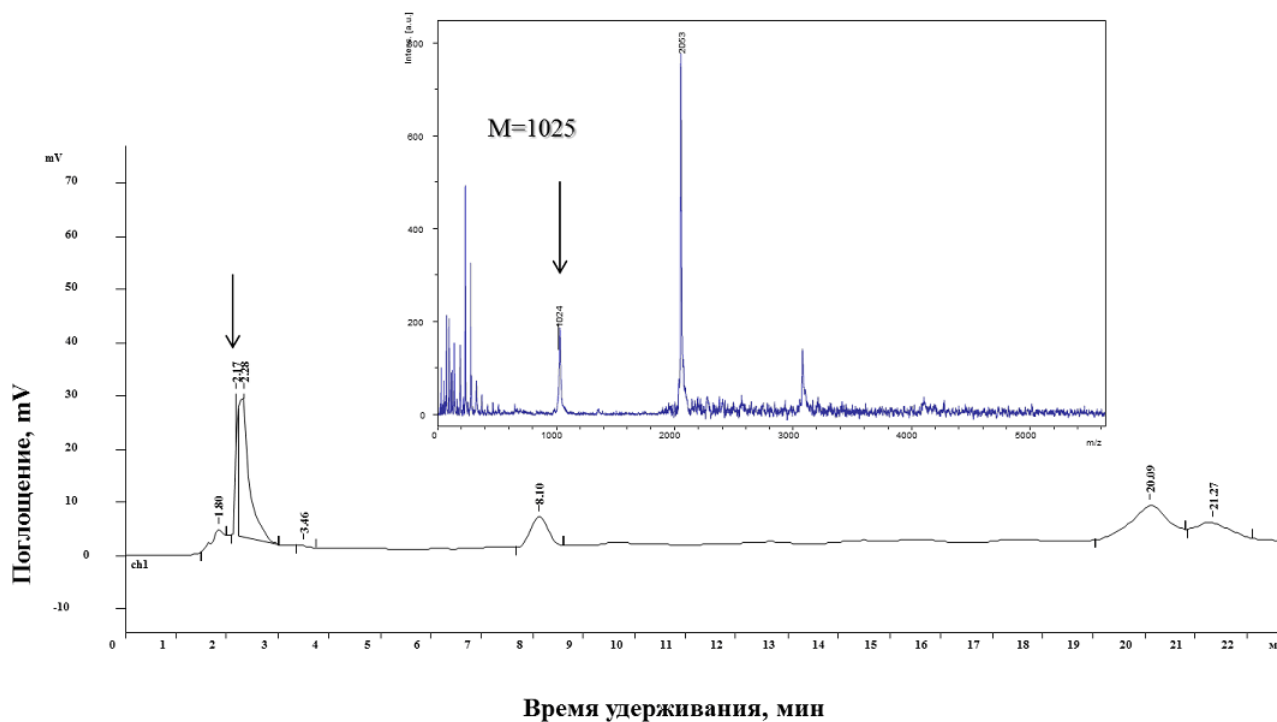


Рис. 3. Хроматограмма аналитической ОФ-ВЭЖХ реакционной массы после удаления со смолы тримера NH₂(TAC)CONH₂ (GlyΨ-L-Glu) (1) (условия см. Эксперимент. часть) и его MALDI-TOF-масс-спектр.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Jakimov D., Cetojevic-Simin D., Kojic V., Mrdanovic J. Peptide nucleic acid (PNA) more than anyone could imagine at the first sight // *Archive Oncology*. 2000. V. 8. № 1. P. 11–14.
2. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R. H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide // *Science*. 1991. V. 254. P. 1497–1500.
3. Pellestor F., Paulasova P. The peptide nucleic acid, efficient tools for molecular diagnosis // *Int. J. Mol. Med*. 2004. № 13. P. 521–525.
4. Боярская Н.П., Кириллова Ю.Г., Есипов Д.С., Шве́ц В.И. Твердофазный синтез декамера отрицательно заряженных ПНК с псевдопептидной связью *Glyψ-L-Glu* // *Вестник МИТХТ*. 2007. Т. 2. № 5. С. 33–36.
5. Christensen L., Fitzpatrick R., Gildea B., Petersen K.H., Hansen H.F., Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Coull J., Berg R.H. Solid-phase synthesis of peptide-nucleic acids // *J. Peptide Science*. 1995. V. 3. P. 175–183.
6. Прохоров Д.И., Кириллова Ю. Г., Боярская Н.П., Тевяшова А.Н., Есипова О.В., Звонкова Е.Н., Шве́ц В.И. Синтез тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК // *Хим.-фарм. журн.* 2005. Т. 39. № 6. С. 39–43.
7. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. – Киев: Наукова думка, 1992. С. 360.
8. Boyarskaya N.P., Prokhorov D.I., Kirillova Yu. G., Zvonkova E.N., Shvets V.I. Synthesis of protected pseudopeptides from dicarboxylic amino acids by Mitsunobu condensation // *Tetrahedron Lett*. 2005. V. 46. № 43. P. 7359–7362.
9. Баранов А.В., Цвид Н.С., Лукьянченко В.И, Прохоров Д.И., Кириллова Ю.Г., Шве́ц В.И. Исследование путей синтеза цитозинового мономера отрицательно заряженных пептидно-нуклеиновых кислот // *Вестник МИТХТ*. 2007. Т. 2. № 5. Р. 28–32.
10. Боярская Н.П., Прохоров Д.И., Стотланд Е.А., Кириллова Ю. Г., Звонкова Е. Н., Шве́ц В.И. Синтез двух новых тиминсодержащих мономеров отрицательно заряженных ПНК // *Доклады Академии наук*. 2006. Т. 48. № 1. Р. 55–58.
11. Кириллова Ю.Г, Баранов А.В., Прохоров Д.И., Есипова О.В., Шве́ц В.И. Препаративное получение β-аминоспиртов из производных дикарбоновых аминокислот // *Журн. орган. химии*. 2009. Т. 45. № 9. Р. 1330–1332.

ЧИСЛЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СВОБОДНОЙ КОНВЕКЦИИ ДЛЯ ПРОЦЕССА НАПРАВЛЕННОЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ CdZnTe

Л.Б. Берлинер, ведущий научный сотрудник, Л.А. Гвелесиани, аспирант

кафедра Материалы микро-, опто- и наноэлектроники МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: berliner.leonid@gmail.com, lgveliesiani@yandex.ru

Предложен метод расчета теплообмена с учетом конвекции для процесса направленной кристаллизации в ростовой ампуле. Метод основан на численном расчете двухфазной задачи с неизвестной границей раздела фаз. Расчет проводили в два этапа: на первом этапе решали тепловую задачу, в которой область ампулы кристалл/расплав рассматривается как однофазная область с переменными теплофизическими параметрами, на втором этапе – как двухфазную задачу, в которой в твердой фазе рассматривали тепловую задачу, а в жидкой фазе – тепловую задачу совместно с задачей расчета свободной конвекции. Расчеты проводили в интегральной среде разработки COMSOL Multiphysics 3.5.

Computation method of the radiative heattransfer and free convection in the growth ampoule was suggested. It is based on numeric computation of two phase problem with unknown shape of interface. Computation was realized in two steps: on the first step heat transfer problem was solved, in which crystal/melt region was considered as one phase region with variable thermo physical properties, on the second step two phase problem was solved, in which thermal problem was solved in solid phase and thermal problem together with free convection problem in melt phase. Computations were carried out in the integrated development environment COMSOL Multiphysics 3.5.

Ключевые слова: твердые растворы CdZnTe, вертикальная направленная кристаллизация, радиационный теплообмен, свободная конвекция.

Key words: solid solutions CdZnTe, vertical crystal growth, radiative heat transfer, free convection.

Процесс вертикальной направленной кристаллизации (ВНК) CdZnTe описывали многие авторы. Так, в предыдущих статьях [1, 2] нами рассмотрена тепловая задача выращивания монокристаллов CdZnTe применительно к условиям опытной установки в ОАО «ГИРЕДМЕТ» без учета свободной конвекции расплава. В пионерской работе Derby et al. [3] выполнено моделирование температурных полей и конвективных потоков в расплаве для процесса ВНК CdZnTe, однако радиационный теплообмен рассчитан по упрощенной формуле. В более поздних работах [4, 5] радиационный теплообмен рассчитывали более строго, но изменение положения ампулы в печи моделировали перемещением температурного профиля нагревателя относительно ампулы. При таком подходе не учитывали, что длина штока, перемещающего ампулу, и положение ампулы относительно торцов рабочего пространства печи меняются.

Целью данной работы является разработка алгоритма совместного решения уравнений радиационного теплообмена и уравнений движения расплава в переменном поле температур. Задача моделирования процесса ВНК CdZnTe рассматривается здесь с учетом свободной конвекции расплава при радиационном теплообмене и в условиях изменяющейся в ходе процесса геометрии установки: учитывается изменение расстояния ампулы от торцов печи и изменение длины штока в рабочем пространстве печи.

Математическая модель

Согласно [1, 2], математическая модель процесса ВНК описывается системой уравнений теплопереноса в кристалле, расплаве, ампуле,

штоке и уравнением гидродинамики Навье-Стокса для расчета свободной конвекции расплава. При этом скорость перемещения межфазной границы кристалл/расплав и ее форма априори неизвестны, и приходится решать сложную задачу Стефана с подвижной границей.

Задачей математической модели является расчет тепловых потоков и положения и формы фронта кристаллизации (ФК) в зависимости от распределения температур на нагревателе (рис. 1), от положения ампулы относительно нагревателя, от геометрических и конструктивных особенностей печи.

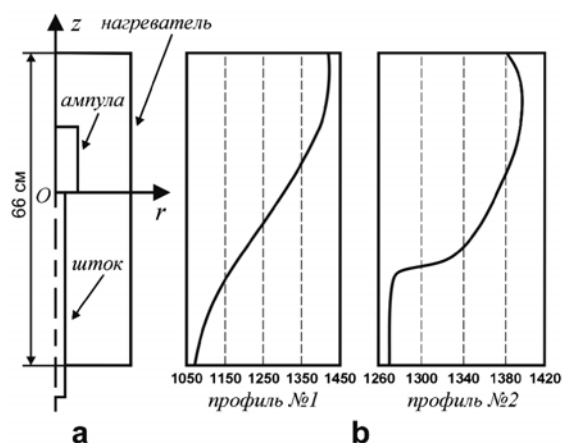


Рис. 1. Процесс ВНК для CdZnTe: а) – схема процесса; б) – температурные профили на нагревателе без подпорной зоны (профиль 1) и с подпорной зоной (профиль 2).

Уравнения математической модели можно выразить двумя способами в зависимости от выбора неподвижной системы координат, связанной либо с нагревателем печи, либо с

ампулой. Если ампула движется относительно неподвижного муфеля, в уравнения входит скорость вытягивания ампулы вдоль оси z : $-v_{pull}e_z$. Если же ампула неподвижна, а относительно нее перемещается нагреватель, то скорость вытягивания ампулы не входит в уравнения математической модели и учитывается лишь при задании граничных условий на нагревателе печи. Принятый в последнем случае способ задания неподвижной системы координат кажется нам более удобным и принят в настоящей работе.

Математическая модель включает уравнение теплопроводности:

$$(\rho_i C_{Pi}) \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \nabla \cdot (-k_i \nabla T) = -\rho_i C_{Pi} \mathbf{u} \cdot \nabla T; \quad (1)$$

уравнение гидродинамики в приближении Буссинеска:

$$\rho_m \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho_m (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot [-p \mathbf{I} + \eta (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T)] + \rho_m \beta_T \Delta T \mathbf{g}, \quad (2)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0; \quad (3)$$

уравнение изотермы кристаллизации для определения положения ФК:

$$T(r, z, t) = T_m. \quad (4)$$

Граничные условия для уравнения теплопроводности: на оси симметрии: $\frac{\partial T}{\partial r} = 0$; на границах внутренних областей: $k_i \nabla T = k_j \nabla T$; на ФК равенство тепловых потоков с учетом теплоты кристаллизации: $(-k_m \nabla T + k_s \nabla T) \cdot \mathbf{n} =$

$= \rho_m \Delta H v_{pull} \frac{v_{cryst}^*}{(\mathbf{n} \cdot \mathbf{e}_z)}$; на внешних границах ампулы и штока условие радиационного теплообмена: $-\mathbf{n} \cdot (-k_i \nabla T) = \varepsilon_j (G - \sigma T^4)$, $(1 - \varepsilon_j)G = J_0 - \varepsilon_j \sigma T^4$; на теплоизлучающих границах муфеля обращенных к ампуле условие радиационного теплообмена дополняется температурным полем, заданным в виде функции от координаты z и времени t : $T_{muffel} = T(z + z_i)$, $z_i = z_{max} - v_{pull} \cdot t$.

Граничные условия для уравнения гидродинамики: на оси симметрии: $\mathbf{u} \cdot \mathbf{e}_r = 0$, $\frac{\partial(\mathbf{u} \cdot \mathbf{e}_z)}{\partial r} = 0$; на верхней границе расплава: $\mathbf{n} \cdot \mathbf{u} = 0$; $\mathbf{e}_r \cdot (-p \mathbf{I} + \eta (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T)) \mathbf{e}_z = 0$, на нижней и боковой границах расплава: $\mathbf{u} = 0$.

В уравнения и граничные условия входят: T – температура, К; T_m – температура плавления CdZnTe, К; T_{muffel} – распределение температур на поверхности нагревателя печи, К; t – время, с; $\mathbf{u}$ – вектор скорости расплава, м/с; k_i – коэффициент теплопроводности, Вт/(м·К); C_{Pi}

– теплоемкость, Дж/(К·кг); ρ_i – плотность, кг/м³; $(\nabla \mathbf{u})^T$ – матрица производных компонентов скорости, транспонированная по отношению к матрице $\nabla \mathbf{u}$; p – давление, Па; $\mathbf{g}$ – вектор ускорения свободного падения, м/с²; $\mathbf{I}$ – единичная матрица; β_T – коэффициент объемного теплового расширения расплава, 1/К; η – вязкость, Па·с; ε_j – степень черноты; J_0 – суммарный исходящий поток излучения, включающий собственное излучение $\varepsilon_j \sigma T^4$ и отраженное излучение $(1 - \varepsilon_j)G$, Вт/м²; $\sigma = 5.6693 \cdot 10^{-12}$ Вт/(м²·К⁴) – постоянная Стефана-Больцмана; z_{max} – длина штока в рабочей зоне печи в момент времени $t = 0$, м; v_{pull} – скорость вытягивания ампулы, м/с; $v_{cryst}^*(r, z)$ – проекция на ось z безразмерной скорости кристаллизации; $\mathbf{n}$ – нормаль к поверхности; $\mathbf{e}_z$, $\mathbf{e}_r$ – единичные векторы вдоль направлений Oz , Or . Нижние индексы i, j могут принимать значения: $m, s, a, support, furnace$ или $muffel$, что соответствует областям расплава, кристалла, ампулы, штока, нагревателя или торцов муфеля.

Граничное условие для уравнения гидродинамики на верхней границе расплава получено в предположении, что ампула заполнена непольностью и между верхней стенкой ампулы и расплавом имеется небольшой зазор пренебрежимо малой толщины. В результате имеет место свободная поверхность расплава, что означает нулевую скорость в направлении вектора нормали к поверхности расплава и нулевые вязкие напряжения вдоль свободной поверхности расплава.

Алгоритм расчета

Расчет процесса ВНК представляет сложную двухфазную задачу с неизвестной границей раздела фаз, меняющейся в ходе выращивания кристалла. Для решения этой задачи предлагается двухуровневая итерационная схема расчета с использованием программных пакетов Comsol Multiphysics и Matlab [6, 7]. Расчет проводили в квазистационарном приближении при скорости вытягивания ампулы $v_{pull} = 1$ мм/час.

Правомерность такого подхода подтверждается оценками длительности переходных процессов времени роста, проводимости и конвекции:

$$\begin{aligned} \tau_{growth} &= \frac{R}{v_{pull}} = 8.1 \cdot 10^4 \text{ с}, \\ \tau_{cond} &= \frac{R^2 \cdot \rho_m \cdot C_{Pm}}{v_{pull} \cdot k_m} = 360 \text{ с}, \\ \tau_{conv} &= \frac{R}{v_{max}} \approx 56 \text{ с}, \end{aligned} \quad (5)$$

где $R = 2.25$ см – внутренний радиус ампулы, $v_{\max} \approx 0.04$ см/с – максимальная скорость конвективных потоков в расплаве (см. результаты

расчетов), прочие тепло-физические параметры моделируемой системы приведены в табл. 1.

Таблица 1. Теплофизические свойства моделируемой системы [1].

Параметр	Значение	Описание
ρ_s	5680 кг/м ³	Плотность кристалла
ρ_m	5680 кг/м ³	Плотность расплава
k_s	1.5 Вт/(К·м)	Теплопроводность кристалла
k_m	3 Вт/(К·м)	Теплопроводность расплава
C_{ps}	159 Дж/(К·кг)	Теплоемкость кристалла
C_{pm}	187 Дж/(К·кг)	Теплоемкость расплава
T_m	1371 К	Температура кристаллизации
ΔH	209200 Дж/кг	Тепловой эффект кристаллизации
η	$0.25 \cdot 10^{-2}$ Па·с	Динамическая вязкость
D_s	$5 \cdot 10^{-11}$ м ² /с	Коэффициент диффузии Zn в кристалле
D_m	$1 \cdot 10^{-8}$ м ² /с	Коэффициент диффузии Zn в расплаве
k_{Zn}	1.35	Равновесный коэффициент сегрегации Zn

На первом этапе решается однофазная тепловая задача, в которой область ампулы кристалл/расплав рассматривается как однофазная область с переменными теплофизическими свойствами, зависящими от температуры [2]. В результате расчета получаем положение границы раздела фаз.

На втором этапе решается двухфазная задача, в которой в твердой фазе рассматривается тепловая задача, а в жидкой фазе – тепловая задача совместно с задачей расчета свободной конвекции.

Расчет проводили по итерационной схеме. За основу брали межфазную границу, полученную на первом этапе. Далее по изотерме кристаллизации рассчитывали положение новой межфазной границы. Окончанием итерационного процесса являлось совпадение межфазных границ двух последних итераций. Обычно требовалось 3 – 4 итерации.

Построение геометрии моделируемых областей производили с помощью системы Comsol Multiphysics и её компонента – Comsol Script. Создавали m-файл сценария, в котором задавали геометрические параметры установки (табл. 2). Построение геометрии осуществляли при помощи функций, задающих прямоугольные объекты, и операций композиции и декомпозиции этих объектов. Далее m-файл сценария выполняли в Comsol Script и геометрию импортировали в Comsol Multiphysics.

Важным моментом реализации итерационной схемы стало построение межфазной границы, определяющей области кристалла и расплава. Для этого координаты фронта кристаллизации r и z экспортировали в текстовый

файл, используя возможности постпроцессорной обработки результатов расчета. Затем с помощью средств системы Matlab эти координаты упорядочивали и сохраняли в виде массива в mat-файле. В Comsol Script выполняли m-файл сценария построения геометрии, в котором осуществлялись загрузка mat-файла с координатами ФК и построение геометрии внутренней области ампулы. Эту геометрию импортировали в Comsol Multiphysics, и объединяли с геометрией ампулы и муфеля печи, построенной первоначально без учета межфазной границы.

Таблица 2. Геометрические параметры установки.

Параметр	Значение	Описание
R_a	2.5, 4.5 см	Радиус ампулы
H_a	8 см	Высота ампулы
d_a	0.25 см	Толщина стенки ампулы
R_h	5.25 см	Радиус муфеля
H_h	66 см	Высота муфеля
R_{sh}	1 см	Радиус штока
d_{sh}	0.25 см	Толщина стенки штока

Важным моментом получения корректных результатов является построение конечно-элементной сетки метода конечных элементов, применяемого в Comsol Multiphysics. Сетка должна сгущаться к границам областей (рис. 2) и содержать достаточно большое количество элементов: в наших расчетах их было порядка 60 тыс.

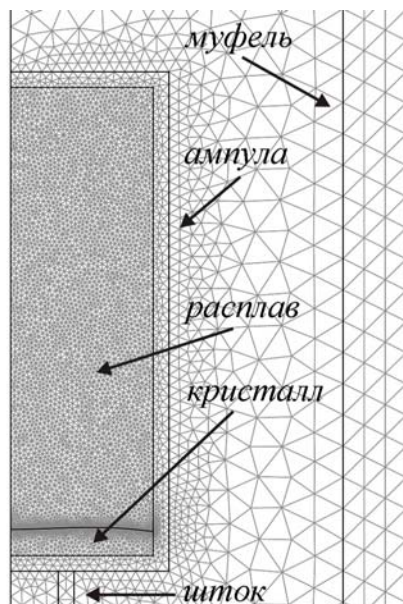


Рис. 2. Конечно-элементная сетка (~60 тыс. элементов).

Расчеты проводили при двух температурных профилях нагревателя (рис. 1) без подпорной зоны с максимальным перепадом температур в расплавленной зоне 40 К и с подпорной зоной 1260 К с максимальным перепадом температур 20 К. Расчеты проводили со штоком и без штока для ампул радиусом 2.5 см и 4.5 см при скорости перемещения штока 1 мм/ч. Использовали персональный компьютер с четырехъядерным процессором частотой 2.66 ГГц и объемом оперативной памяти 8 Гб.

Результаты вычислительного эксперимента

Исследовано влияние технологических параметров процесса ВНК на форму межфазной границы кристалл/расплав, на структуру конвективных потоков, поле температур и его градиентов в расплаве. При этом рассмотрены ампулы с различными радиусами: 2.5 см и 4.5 см, а также различные профили температур на нагревателе: температурный профиль с большим перепадом температур в ампуле 40 К (профиль 1, рис. 1) и температурный профиль с перепадом 20 К (профиль 2, рис. 1). Оценена величина максимальных скоростей в расплаве и максимальных градиентов на фронте кристаллизации. Выполнен сравнение результатов расчета по трем моделям: полной двухфазной модели с использованием уравнения Навье-Стокса в жидкой фазе, упрощенной однофазной модели с использованием уравнения Навье-Стокса в жидкой и твердой фазах с переменной вязкостью и упрощенной тепловой модели с переменными теплофизическими параметрами.

Пример расчета формы ФК для ампулы со штоком и температурным профилем нагре-

вателя, соответствующим профилю 1 (рис. 1), приведен на рис. 3. Из рис. 3 видно, что полная двухфазная модель и однофазная модель с переменной вязкостью дают близкие результаты, однако при расчете с переменной вязкостью возникают проблемы сходимости и точности расчетов, а именно: для получения приемлемой сходимости необходимо в каждом расчете строить грубую сетку с малым количеством элементов. Кроме этого, для каждого расчета необходимо подбирать соотношение вязкости жидкой и твердой фаз. Кривая 3 на рис. 3 получена при соотношении вязкостей 10^6 и значении параметра максимального размера элемента сетки 0.4, в то время, как в расчетах по двухфазной модели величина этого параметра была порядка 0.03 – 0.05, а вдоль ФК – 0.001.

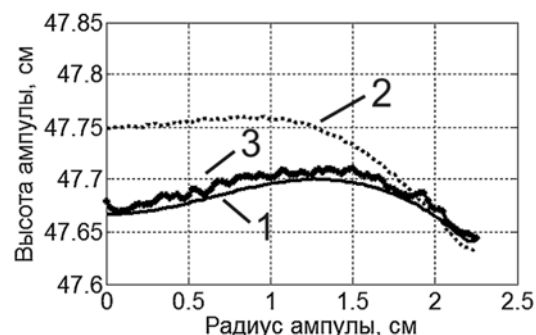


Рис. 3. Формы ФК в начальной стадии процесса ($z_t = 47$ см) по трем моделям:

1 – двухфазная модель, 2 – однофазная тепловая модель с переменным коэффициентом теплопроводности, 3 – однофазная модель с переменным коэффициентом вязкости.

Структура конвективных потоков при двух температурных профилях нагревателя и трех позициях ампулы радиуса 2.5 см: в начале, середине и в конце процесса показана на рис. 4.

В начальной стадии процесса (рис. 4а, 4д) ярко выражены два конвективных вихря, полностью заполняющих расплав до оси симметрии ампулы: нижний протяженный вихрь, вращающийся против часовой стрелки по направлению к ФК, и вихрь, прилегающий к верхней стенке ампулы и вращающийся в противоположном направлении по часовой стрелке. Максимальная скорость расплава для температурного профиля с большим перепадом температур (профиль 1) равна 0.044 см/с, а для температурного профиля с меньшим перепадом температур (профиль 2) – ниже и равна 0.031 см/с. Это объясняется меньшим перепадом температур для профиля 2. Области с максимальной скоростью в этих случаях располагаются вблизи ФК и внутренней стенки ампулы.

В средней стадии процесса (рис. 4б, 4е)

часть расплава движется по часовой стрелке вокруг двух вихрей, расположенных в углах стенок ампулы и ФК. Другие части расплава движутся вокруг этих вихрей также по часовой стрелке. Максимальная скорость расплава для профиля 1 равна 0.048 см/с, а для профиля 2 – 0.042 см/с. Области с максимальной скоростью в этих случаях смещаются к свободной поверхности расплава у верхней стенки ампулы. Таким образом, если в начальной стадии

процесса расплав двигался против часовой стрелки к ФК, то в средней стадии процесса направление движения меняется и расплав движется от ФК. Такая смена направлений движения расплава связана, по-видимому, с тем, что верхний вихрь, наблюдаемый в начальной стадии процесса, по мере кристаллизации начинает преобладать и заполняет все рабочее пространство расплава, вытесняя при этом нижний вихрь.

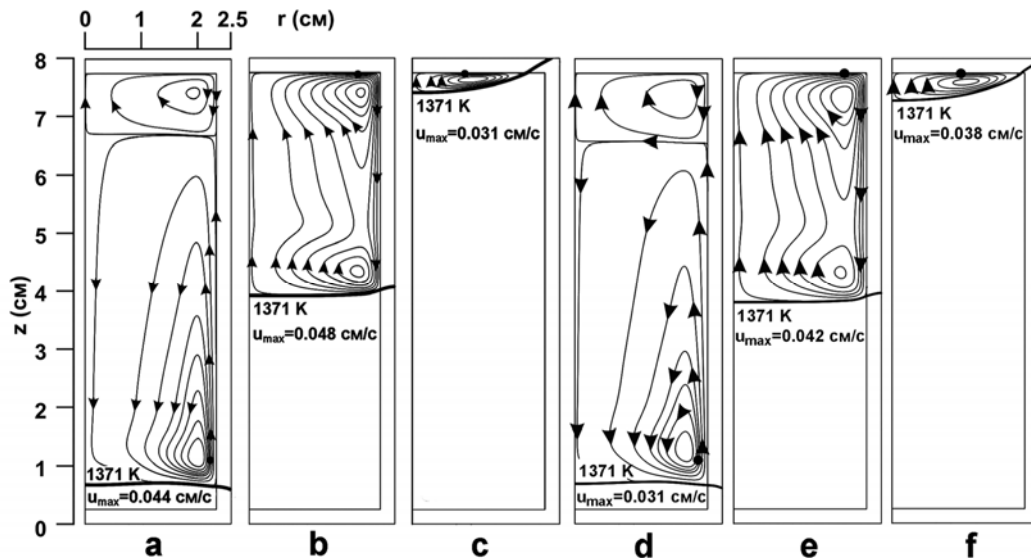


Рис. 4. Изолинии функции тока в расплаве для профиля 1 (a, b, c) и профиля 2 (d, e, f) при положениях ампулы: $z_t=47$ см (a), $z_t=42$ см (b), $z_t=36$ см (c), $z_t=38$ см (d), $z_t=33$ см (e), $z_t=27$ см (f).

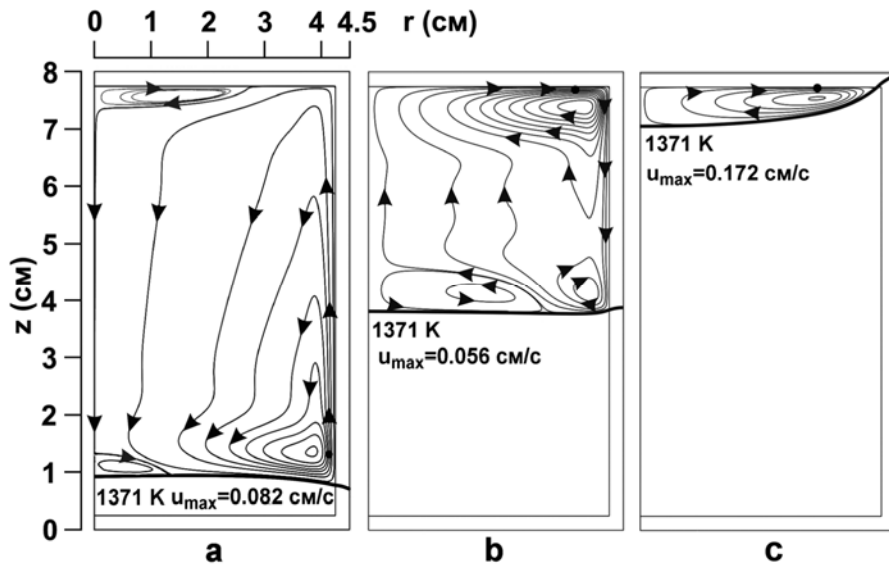


Рис. 5. Изолинии функции тока в расплаве для профиля 1 при положениях ампулы: $z_t=47$ см (a), $z_t=42$ см (b), $z_t=36$ см (c).

В конечной стадии процесса (рис. 4с, 4f) остается один вихрь, вращающийся по часовой стрелке, максимальные скорости расплава равны 0.031 см/с и 0.038 см/с для температурных профилей 1 и 2, соответственно.

Структура конвективных потоков для ампулы большего радиуса, т.е. 4.5 см, при темпера-

турном профиле нагревателя 1 представлена на рис. 5. На начальной стадии процесса, как видно из рис. 5а, структура конвективных потоков изменяется: появляется небольшой третий вихрь с вращением по часовой стрелке вблизи оси симметрии и ФК, при этом большой верхний вихрь, рассмотренный ранее в аналогичном

случае (рис. 4а), существенно уменьшается в размерах и сдвигается к оси симметрии ампулы. На средней стадии процесса (рис. 5b) верхний вихрь и появившийся дополнительный третий вихрь также расширяются на все пространство расплава. При этом верхний вихрь распадается на три вихря: большой вихрь, вращающийся вокруг двух малых вихрей, примыкающих к стенке ампулы в верхней и нижней частях расплава. Максимальные скорости расплава увеличиваются с ростом радиуса ампулы, проходя в ходе процесса кристаллизации через минимум: 0.082 см/с, 0.056 см/с и 0.172 см/с.

Из рассмотрения рис. 4 и 5 следует, что форма ФК существенно не меняется в связи с изменением структуры конвективных потоков. В обоих случаях ФК преимущественно имеет выпуклость в сторону расплава на начальной стадии процесса,

которая меняется на вогнутость на завершающих стадиях процесса. Структура конвективных потоков важна для понимания изменения радиальной и осевой сегрегации Zn в расплаве CdTe.

Изменение температурных полей в ампуле, кристалле и в расплаве показано на рис. 6 для двух температурных профилей нагревателя. Перегрев расплава максимален в начале кристаллизации и составляет 40 К для профиля 1 и 20 К – для профиля 2. Максимальные градиенты температур на ФК порядка 14 К/см для профиля 1 и порядка 5 К/см – для профиля 2. Особый интерес представляет рассмотрение распределения поля градиентов температур в расплаве вблизи ФК. Пример такого распределения приведен на рис. 7 для ампулы радиуса 2.5 см и профиля температур 1 для двух положений ампулы в начале и в середине процесса при кристаллизации ~50% расплава.

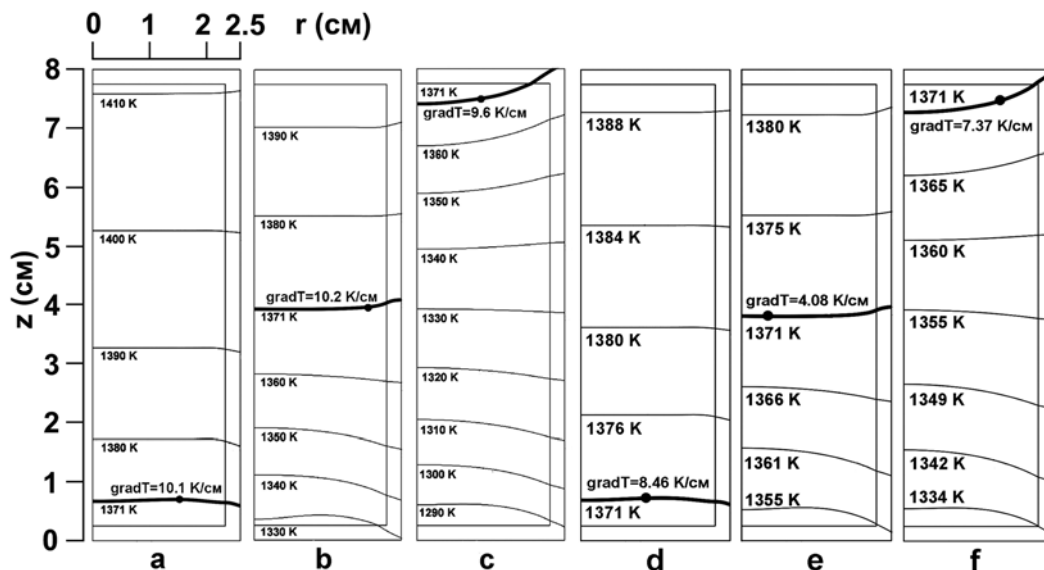


Рис. 6. Изолинии температуры для профиля 1 (a, b, c) и профиля 2 (d, e, f) при положениях ампулы: $z_t = 47$ см (a), $z_t = 42$ см (b), $z_t = 36$ см (c), $z_t = 38$ см (d), $z_t = 33$ см (e), $z_t = 27$ см (f).

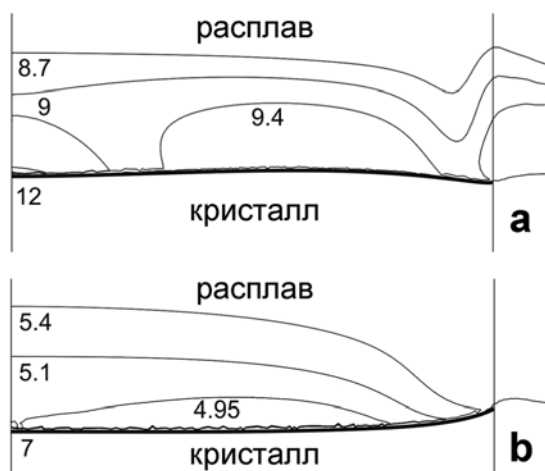


Рис. 7. Изолинии градиентов температуры (К/см) в расплаве вблизи ФК при положениях ампулы: $z_t = 47$ см (a), $z_t = 42$ см (b) для профиля 1.

Исследование влияния температурного профиля нагревателя, влияния штока, изменения радиуса ампулы на форму ФК на разных стадиях процесса показано на рис. 8 – 10. Для сравнения здесь приведены результаты расчетов по двум моделям: полной двухфазной модели и однофазной тепловой модели, не учитывающей конвекцию расплава. Как следует из рисунков, изотермы температуры плавления во всех случаях для ампулы радиуса 2.5 см исходят из одной точки на внутренней поверхности ампулы, т.е. учет конвекции не влияет на распределение температур на стенках ампулы (рис. 8, 9).

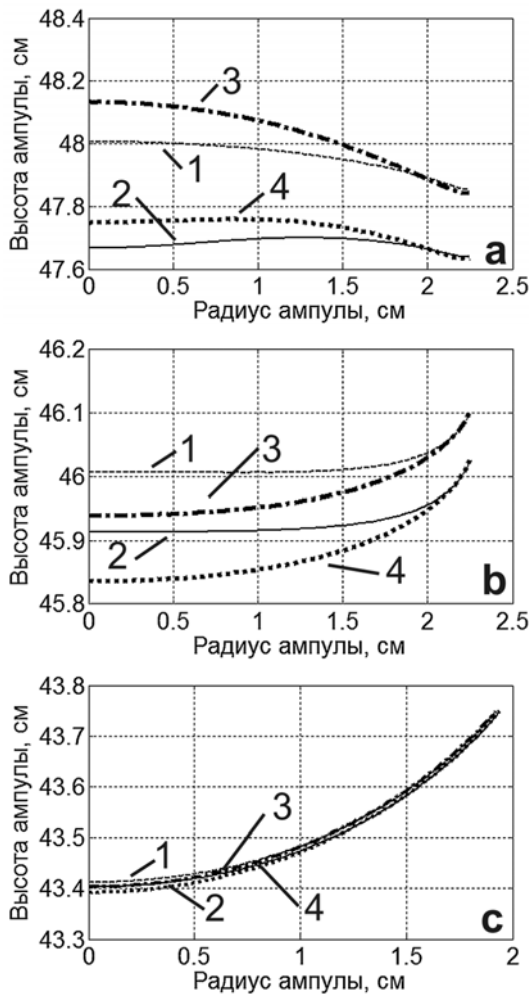


Рис. 8. Форма межфазной границы кристалл/расплав для профиля 1 при трех положениях ампулы: $z_t = 47$ см (а), $z_t = 42$ см (б), $z_t = 36$ см (с) для различных вариантов расчета: 1 – без штока, 2 – со штоком; упрощенный расчет по однофазной тепловой модели без штока (3) и со штоком (4).

При увеличении радиуса ампулы скорости потоков в расплаве увеличиваются, и их влияние на распределение температур на стенках ампулы уже заметно (рис. 10). Независимо от радиуса ампулы, влияние штока сводится к смещению ФК вниз ко дну ампулы. При этом влияние штока на форму ФК наиболее выражено в начальной стадии процесса: ФК немного прогибается в сторону кристалла (рис. 8а, 9а). По мере кристаллизации влияние штока на положение и форму ФК уменьшается (рис. 8б, 8с, 9б, 9с). Отметим, что на рис. 8а, кривые 1 и 2 ниже кривых 3 и 4, а на рис. 8б – наоборот выше. Это соответствует структуре конвективных потоков, показанных на рис. 4а, 4б: в первом случае потоки направлены из горячей зоны в холодную, а во втором – из холодной в горячую.

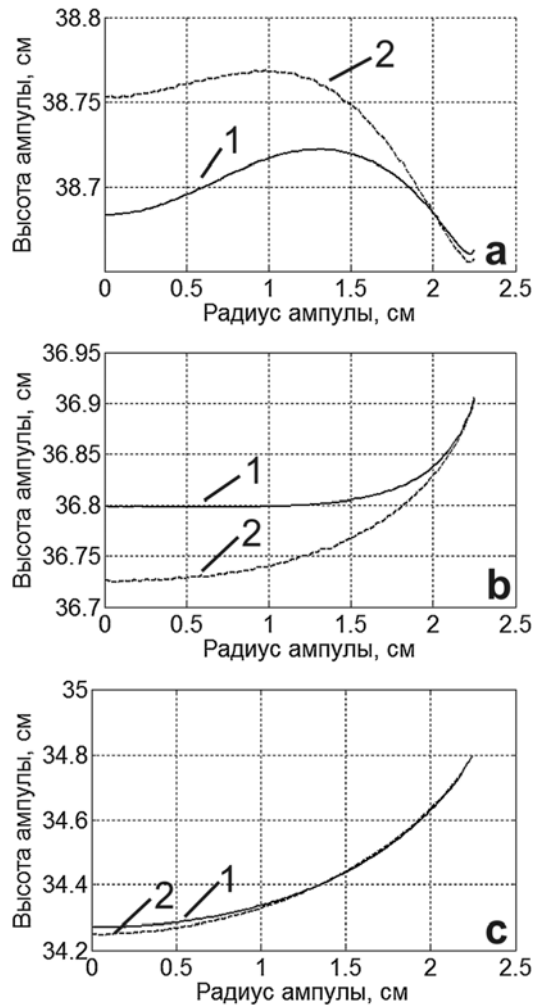


Рис. 9. Форма межфазной границы кристалл/расплав для профиля 2 при трех положениях ампулы: $z_t = 38$ см (а), $z_t = 33$ см (б), $z_t = 27$ см (с): 1 – полный расчет, 2 – упрощенный расчет по однофазной тепловой модели.

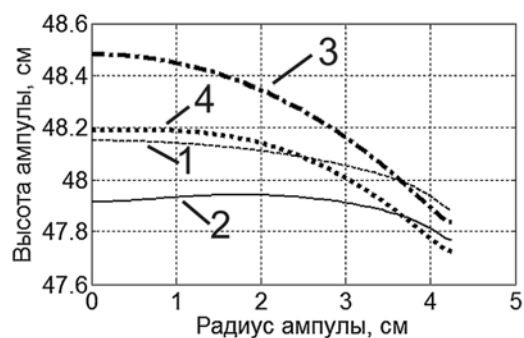


Рис. 10. Форма межфазной границы кристалл/расплав в начальной стадии процесса ($z_t = 47$ см) для ампулы радиуса 4.5 см: расчет по двухфазной модели без штока (1) и со штоком (2); расчет по однофазной тепловой модели без штока (3) и со штоком (4).

На рис. 11 показано изменение безразмерной скорости v_{cryst}^* вдоль ФК для начальной стадии процесса и температурного профиля нагревателя 1. Из рисунка видно, что учет теплоты

кристаллизации в предположении, что скорость кристаллизации совпадает со скоростью вытягивания $v_{cryst} = v_{pull}$, является грубым приближением. Решение задачи моделирования процесса ВНК с учетом теплового эффекта также осуществляется по итерационной схеме. На первой итерации решается задача без учета теплового эффекта и рассчитывается безразмерная скорость кристаллизации как отношение $\frac{\Delta z_{ФК}}{\Delta z_{шток}}$. На второй итерации в рас-

чет включается тепловой эффект с этой скоростью кристаллизации (рис. 11, кривая 1). Результат третьей итерации совпадает с результатом второй итерации.

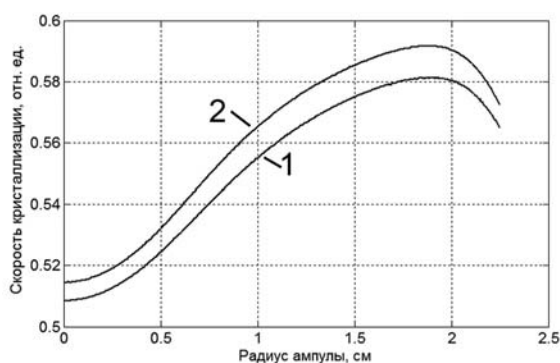


Рис. 11. Скорость кристаллизации вдоль ФК для профиля 1 в начальной стадии:
1 – скорость без учета теплового эффекта;
2 – скорость с учетом теплового эффекта.

Заключение

Проведен расчет процесса ВНК с доминирующим радиационным нагревом в условиях изменяющегося положения ампулы в установке

с учетом влияния торцов муфеля и меняющейся длины штока, перемещающего ампулу в рабочем пространстве установки. Полная двухфазная модель сопоставлена с упрощенными однофазными моделями. Проведены расчеты с учетом влияния штока и без него. Показано, что учет влияния штока позволяет получить более точную форму ФК в начальной стадии процесса. Установлено, что в приближенных расчетах температурных полей оправдано использование упрощенной однофазной тепловой модели с переменными теплофизическими коэффициентами.

Выявлено, что структура конвективных потоков меняется в ходе процесса кристаллизации. Результаты по исследованию структуры конвективных потоков согласуются с экспериментальными данными по изменению характера радиальной сегрегации Zn по длине слитка.

Исследованы изменения скорости кристаллизации вдоль фронта кристаллизации и вдоль оси кристалла. Найдено, что на начальной стадии кристаллизации скорость принимает минимальное значение 0.51 мм/ч на оси симметрии кристалла, проходит через максимум 0.59 мм/ч и уменьшается до 0.57 мм/ч, приближаясь к стенкам ампулы. При скоростях перемещения ампулы $v_{pull} < 1$ мм/ч влияние теплового эффекта на форму межфазной границы и структуру конвективных потоков незначительно, но при скоростях v_{pull} более 1 мм/ч необходимо учитывать скорость кристаллизации v_{cryst} , меняющуюся в радиальном и осевом направлениях. При этом расчет усложняется, т.к. требуются дополнительные итерации для определения в каждой точке ФК скорости кристаллизации v_{cryst} .

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гвелесиани Л.А. Модель процесса вертикальной направленной кристаллизации монокристаллов $Cd_{1-x}Zn_xTe$ // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 2. С. 18–22.
2. Берлинер Л.Б., Гвелесиани Л.А. Численный расчет радиационного теплообмена для процесса направленной кристаллизации $CdZnTe$ // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 5. С. 13–18.
3. Kuppurao S., Brandon S., Derby J.J. Modeling the vertical Bridgman growth of cadmium zinc telluride. I. Quasi-steady analysis of heat transfer and convection // J. Crystal Growth. 1995. V. 155. P. 93–102.
4. Martinez-Tomas C., Munoz V., Triboulet R. Heat transfer simulation in a vertical Bridgman CdTe growth configuration // J. Crystal Growth. 1999. V. 197. P. 435–442.
5. Martinez-Tomas C., Munoz V. CdTe crystal growth process by the Bridgman method: Numerical simulation // J. Crystal Growth. 2001. V. 222. P. 435–451.
6. Бирюлин Г.В., Егоров В.И. Применение ЭВМ для решения задач теплопроводности в программе COMSOL Multiphysics: учебное пособие. – С.-Пб.: СПб ГУ ИТМО, 2006. 81 с.
7. Курбатова Е.А. MATLAB 7. Самоучитель. – М.: Диалектика, 2005. 256 с.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА НЕПРЕРЫВНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ С НЕЛИНЕЙНОЙ КИНЕТИКОЙ РОСТА

* Ю.Л. Гордеева, доцент, * Ю.А. Ивашкин, профессор,

Л.С. Гордеев, профессор

*Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

e-mail: l.s.gordeev@yandex.ru

Приведены результаты математического моделирования процесса микробиологического синтеза в биореакторе с перемешиванием непрерывного действия с нелинейной кинетикой роста. Получены оценки концентрации субстрата, биомассы и продукта.

The performance of a continuous bioreactor was theoretically analyzed for steady-state operation. The effect of substrate feed concentration and dilution rate was analyzed. Equations for estimation of productivity and of concentrations of the substrate and biomass were obtained.

Ключевые слова: моделирование, биореактор, нелинейная скорость роста, ферментация, продуктивность, оптимизация.

Key words: modeling, bioreactor, nonlinear growth rate, fermentation, productivity, optimization.

Рассматривается процесс микробиологического синтеза в аппарате непрерывного действия, кинетическая модель которого достаточно широко используется при описании получения различных продуктов [1–7]. Процесс реализуется следующим образом. В аппарат с перемешиванием объемом V непрерывно поступает субстрат с объемной скоростью Q и концентрацией субстрата S_f . В аппарате синтезируется биомасса с концентрацией X и продукт с концентрацией P . Из аппарата непрерывно выводится поток с той же объемной скоростью Q и концентрацией компонентов – субстрата S , биомассы X и продукта P . Для моделирования процесса использованы условия идеального перемешивания.

Система уравнения модели (материального баланса) имеет вид:

$$\begin{cases} -D \cdot X + \mu \cdot X = 0 \\ D \cdot (S_f - S) - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X = 0 \\ -D \cdot P + (\alpha \cdot \mu + \beta) \cdot X = 0, \end{cases} \quad (1)$$

где $D=Q/V$, ч⁻¹; V – объем реактора, л; Q – объемная скорость потока, л/ч; μ – удельная скорость роста биомассы, ч⁻¹; $Y_{X/S}$ – стехиометрический коэффициент, г/г; X , S , P – концентрации биомассы, субстрата и продукта на выходе из реактора, соответственно, г/л; S_f – концентрация субстрата в потоке, поступающем в реактор, г/л; α , β – константы.

Удельная скорость роста записана в виде:

$$\mu = \mu_m \cdot (1 - P/P_m) \cdot S / (K_m + S + S^2/K_i), \quad (2)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость роста, ч⁻¹; P_m – константа насыщения продукта, г/л; K_i – константа ингибирования субстрата, г/л.

Из первого уравнения системы (1) получаем:

$$D = \mu. \quad (3)$$

Соотношение (3) означает, что величины D и μ имеют взаимоограничение, т.е. величина потока D должна соответствовать удельной скорости роста. Это взаимоограничение будет отмечено ниже.

Учитывая (3) и (2), получим:

$$P = P_m \cdot (1 - D/\mu_m \cdot (K_m + S + S^2/K_i)/S). \quad (4)$$

Из второго уравнения и третьего уравнений системы (1) получаем:

$$X = (S_f - S) \cdot Y_{X/S}, \quad (5)$$

$$-D \cdot P + (\alpha \cdot D + \beta) \cdot X = 0. \quad (6)$$

С учетом (4), (5) и (6) запишем уравнения относительно концентрации субстрата S :

$$D \cdot P_m \cdot (1 - D/\mu_m \cdot (K_m + S + S^2/K_i)/S) = (\alpha \cdot D + \beta) \cdot (S_f - S) \cdot Y_{X/S}. \quad (7)$$

Решение (7) относительно концентрации субстрата на выходе из реактора S имеет вид:

$$S = \frac{B}{2 \cdot A} \pm \sqrt{\left(\frac{B}{2 \cdot A}\right)^2 + \frac{C}{A}}, \quad (8)$$

где

$$A = (\alpha \cdot D + \beta) - (K \cdot D^2 \cdot P_m) / (\mu_m \cdot K_i), \quad (9)$$

$$B = (\alpha \cdot D + \beta) \cdot S_f + (K \cdot D^2 \cdot P_m) / \mu_m - K \cdot D \cdot P_m, \quad (10)$$

$$C = K \cdot D^2 \cdot P_m \cdot K_m / \mu_m, \quad (11)$$

$$K = 1/Y_{X/S}.$$

Выбор знака ($\pm$) в выражении (8) определяется условием ограничения для S :

$$0 \leq S \leq S_f. \quad (12)$$

Знак равенства в (12) относится к предельным случаям.

Таким образом, для X и P имеем:

$$X = \left(S_f - \left(\frac{B}{2 \cdot A} \pm \sqrt{\left(\frac{B}{2 \cdot A}\right)^2 + \frac{C}{A}} \right) \right) \cdot Y_{X/S}, \quad (13)$$

$$P = X \cdot (\alpha + \beta/D). \quad (14)$$

Формула расчета продуктивности D·P (производительности по целевому компоненту P) имеет вид:

$$D \cdot P = X \cdot (\alpha \cdot D + \beta). \quad (15)$$

Анализ полученных соотношений показывает следующее. Если в процессе субстрат исчерпывается полностью, т.е. $S=0$, удельная скорость роста μ обращается в нуль и процесс ферментации не протекает. Далее, если концентрация продукта достигает (или близка) значения P_m , удельная скорость роста также равна нулю. Это означает, что предельное максимальное значение P не может превышать P_m .

Величина протока D , как отмечалось ранее, ограничена условием (3). Это означает, что максимальное значение D в процессе должно быть меньше величины, определяющей полное вымывание субстрата из аппарата. Очевидно, что тогда образование продукта не происходит. Математически это означает, что $P=0$, и тогда из (2) получаем предельное значение D :

$$\max D = \frac{\mu_m \cdot S_f}{K_m + S_f + S_f^2 / K_i}. \quad (16)$$

Таким образом, в соотношениях (8)-(15):

Таблица 1. Численные значения параметров (базовый вариант).

Параметр	$Y_{X/S}$	α	β	μ_m	P_m	K_m	K_i
Величина	0.4 г/г	2.2 г/г	0.2 ч ⁻¹	0.48 ч ⁻¹	50 г/л	1.2 г/л	22 г/л

Рис. 1 иллюстрирует нелинейную зависимость удельной скорости роста μ от концентрации субстрата в реакторе при всех значениях концентрации продукта. Кроме того, при определенных концентрациях субстрата эта скорость имеет максимальное значение. Последнее предполагает возможность получения продукта с максимальной скоростью или максимального количества в единицу времени с единицы объема реактора.

Приведем некоторые результаты моделирования процесса, полученные из решения уравнений модели (8)-(17).

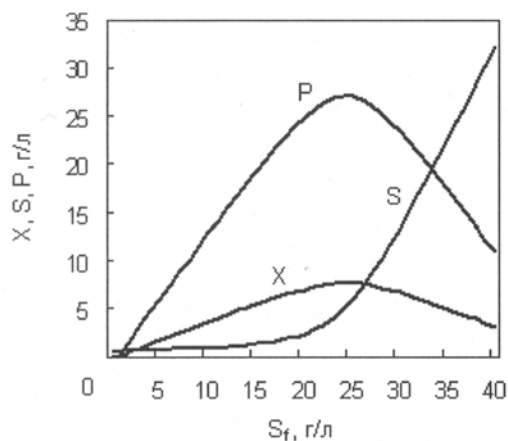


Рис. 2. Зависимость концентраций компонентов на выходе из биореактора от концентрации субстрата в поступающем потоке при $D=0.15$ ч⁻¹.

$$0 < D \leq \max D, \quad (17)$$

где $\max D$ вычисляется по формуле (16) для любого значения S_f .

На рис. 1 показана зависимость удельной скорости роста μ от концентрации субстрата S при нескольких значениях P .

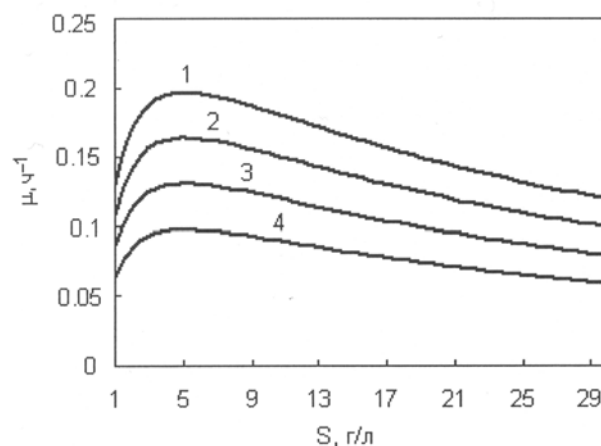


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста μ от концентрации субстрата в биореакторе при: 1 – $P=20$ г/л; 2 – $P=25$ г/л; 3 – $P=30$ г/л; 4 – $P=35$ г/л.

На рис. 2 приведены зависимости концентрации компонентов на выходе из реактора от концентрации субстрата S_f в поступающем потоке при постоянной скорости протока D . При моделировании использованы данные табл. 1. Величина скорости протока $D=0.15$ ч⁻¹.

Влияние величины максимальной удельной скорости роста на концентрацию продукта P показано на рис. 3 [6] при $D=0.1636$ ч⁻¹.

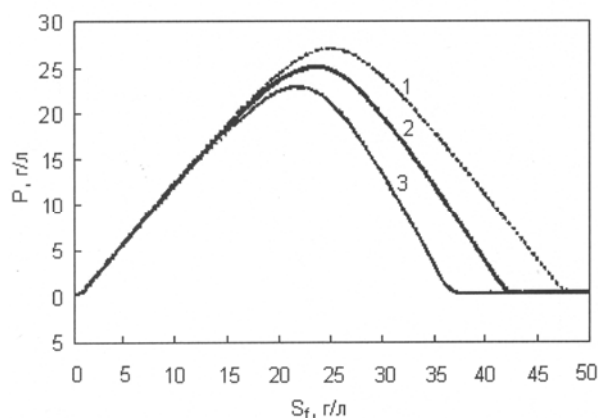


Рис. 3. Влияние максимальной удельной скорости роста μ_m на концентрацию продукта P в реакторе при: 1 – $\mu_m=0.52$ ч⁻¹; 2 – $\mu_m=0.48$ ч⁻¹; 3 – $\mu_m=0.44$ ч⁻¹.

Характер зависимостей концентрации продукта P на рис. 2 и 3 отражает возможность реализации процесса в условиях достижения максимального значения P . При этом очевид-

ным является факт существования, по крайней мере, двух режимов ферментации, дающих одинаковое значение P . Это же относится и к величине продуктивности $(D \cdot P)$, так как на приведенных рисунках $D = \text{const}$. Численные данные, соответствующие максимальному значению P и $(D \cdot P)$ для рис. 2, следующие: при $D = 0.15 \text{ ч}^{-1}$: $P_{\max} = 27.08 \text{ г/л}$; $S = 5.14 \text{ г/л}$; $X = 7.66 \text{ г/л}$; $(D \cdot P) = 4.062 \text{ г/(л} \cdot \text{ч)}$. Соответствующее значение концентрации $S_f = 24.3 \text{ г/л}$. Важно отметить, что для этих данных неизрасходованный субстрат составляет 21% от поступающего.

Данные, полученные для других численных значений D и S_f (рис. 3 при $\mu_m = 0.48$), следующие [6]: при $D = 0.1636 \text{ ч}^{-1}$: $P_{\max} = 25.0 \text{ г/л}$; $S = 5.138 \text{ г/л}$; $X = 7.3 \text{ г/л}$; $(D \cdot P) = 4.09 \text{ г/(л} \cdot \text{ч)}$. Значение концентрации $S_f = 23.3991 \text{ г/л}$.

В качестве примера существования двух режимов, реализующих одинаковое значение P на выходе из реактора, приведем данные для значений $S_f = 15.55 \text{ г/л}$ и $S_f = 32.99 \text{ г/л}$ (использованы значения статьи [3]).

Для $S_f = 15.55 \text{ г/л}$ при $D = 0.15 \text{ ч}^{-1}$: $S = 1.401 \text{ г/л}$; $X = 5.66 \text{ г/л}$; $P = 20.0 \text{ г/л}$; $(D \cdot P) = 3.0 \text{ г/(л} \cdot \text{ч)}$.

Для $S_f = 32.99 \text{ г/л}$ при $D = 0.15 \text{ ч}^{-1}$: $S = 18.839 \text{ г/л}$; $X = 5.66 \text{ г/л}$; $P = 20.0 \text{ г/л}$; $(D \cdot P) = 3.0 \text{ г/(л} \cdot \text{ч)}$.

При этом процент неиспользованного субстрата в первом случае составит 9%, во втором – 57%. Таким образом, режимы, одинаковые по показателям P и X различаются количеством использованного субстрата.

Рис. 3 показывает, что значение максимальной концентрации P , а также положение экстремума, изменяется в зависимости от величины максимальной удельной скорости роста μ_m .

Максимальное значение P (рис. 2 и 3) удобно вычислить аналитически по S , т.е. записать необходимое условие экстремума (используя формулу (4)):

$$\frac{dP}{dS} = 0. \quad (18)$$

Это условие дает:

$$S^{opt} = (K_m \cdot K_i)^{1/2}. \quad (19)$$

Подставляя это значение в (4), получим:

$$P_{\max} = P_m \cdot \left(1 - \frac{D}{\mu_m} \cdot \frac{K_m + (K_m \cdot K_i)^{1/2} + \frac{K_m \cdot K_i}{K_i}}{(K_m \cdot K_i)^{1/2}} \right) \quad (20)$$

или

$$P_{\max} = P_m \cdot \left(1 - \frac{D}{\mu_m} \cdot \left(2 \cdot \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right) \right). \quad (21)$$

Максимальное значение для X будет:

$$X = (S_f - S) \cdot Y_{X/S} = (S_f - (K_m \cdot K_i)^{1/2}) \cdot Y_{X/S}. \quad (22)$$

Таким образом, для любого значения S_f с учетом ограничения по S (12) расчет условий максимального значения P и, следовательно, $(D \cdot P)$ можно выполнить по формулам (19)–(22).

Для записи условия существования множественности стационарных состояний воспользуемся выводом в работе [3]. Основопологающим соотношением для множественности по S_f при постоянном значении D является условие (условие наличия экстремума на кривых рис. 2 и рис. 3):

$$\frac{dP}{dS_f} = 0. \quad (23)$$

Для выполнения этого условия запишем (2) при $\mu = D$:

$$D = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{P_m}{P} \right) \cdot \frac{1}{K_m/S + 1 + S/K_i}. \quad (24)$$

Далее, это соотношение перепишем в виде:

$$D = N(P)/R(S), \quad (25)$$

где

$$N(P) = \mu_m \cdot (1 - P_m/P);$$

$$R(S) = (K_m/S) + 1 + (S/K_i).$$

Из уравнений (5) и (6) запишем:

$$P = Y_{X/S} \cdot (\alpha + \beta/D) \cdot (S_f - S). \quad (26)$$

Используя (23), имеем:

$$\frac{dP}{dS_f} = Y_{X/S} \cdot (\alpha + \beta/D) \cdot (1 - dS/dS_f) = 0. \quad (27)$$

Откуда следует:

$$\frac{dS}{dS_f} = 1. \quad (28)$$

Из дифференцирования (25) по S_f с учетом (23) и (28) получаем условие:

$$\frac{dR(S)}{dS} = 0. \quad (29)$$

Используя (8), условие $\frac{dS}{dS_f} = 1$ будет [3]:

$$a_4 + \left(\frac{a_4 \cdot (a_3 + a_4 \cdot S_f)}{\left((a_3 + a_4 \cdot S_f)^2 + 4 \cdot a_1 \cdot K_m \right)^{0.5}} \right) = 2 \cdot a_1, \quad (30)$$

где

$$a_1 = \frac{\mu_m \cdot a_2}{D \cdot P_m} - 1/K_i, \quad (31)$$

$$a_2 = (\alpha + \beta/D) \cdot Y_{X/S}, \quad (32)$$

$$a_3 = 1 - \frac{\mu_m}{D}, \quad (33)$$

$$a_4 = \frac{\mu_m}{D \cdot P_m} \cdot a_2. \quad (34)$$

Таким образом, требование множественности выполняется, если параметры процесса соответствуют условию (30) и условию (29). В последнем соотношении $R(S) = (K_m/S) + 1 + (S/K_i)$.

Нетрудно видеть, что условие (30) приводит к соотношению

$$S = (K_m \cdot K_i)^{1/2} \quad (35)$$

и, следовательно, имеем:

$$(K_m \cdot K_i)^{1/2} = \frac{B}{2 \cdot A} \pm \sqrt{\left(\frac{B}{2 \cdot A}\right)^2 + \frac{C}{A}}. \quad (36)$$

Понятно, что соотношения (29) и (30) можно использовать, в основном, в качестве проверочных для совокупности параметров процесса, определяющих существование множественности стационарных состояний.

В заключение отметим следующее. При моделировании процесса микробиологического синтеза для непрерывных условий с нелинейной кинетикой получены зависимости для расчета концентраций компонентов на выходе из биореактора с перемешиванием. Приведены численные результаты, показавшие возможность существования множественности стационарных состояний, что важно для практической реализации процесса. Показана возможность и сформулированы соотношения для обеспечения условий получения максимума продукта.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Agarwal P., Koshy G., Ramirez M. An algorithm for operating a fed-batch fermenter at optimum specific-growth rate // *Biotechnol. Bioeng.* 1989. № 33. P. 115–125.
2. Henson M.A., Seborg D.E. Nonlinear control strategies for continuous fermenters // *Chem. Eng. Sci.* 1992. № 47. P. 821–835.
3. Kumar G.P., Subrahmanya J.V.K., Chidambaram M. Periodic operation of a bioreactor with input multiplicities // *Can. J. Chem. Eng.* 1993. № 71. P. 766–770.
4. McLain R.B., Kurtz M.J., Henson M.A., Doule III Francis J. Habituating control for nonsquare nonlinear processes // *Ind. Eng. Chem. Res.* 1996. № 35. P. 4067–4077.
5. Ruan L., Chen X.D. Comparison of several periodic operations of a continuous fermentation process // *Biotechnol. Prog.* 1996. № 12. P. 286–288.
6. Saha P., Patwardhan S.C., Ramahandra Rao V.S. Maximizing productivity of a continuous fermenter using nonlinear adaptive optimizing control // *Bioprocess Eng.* 1999. № 20. P. 15–21.
7. Henson, M. Exploiting cellular biology to manufacture high-value products // *IEEE Control Systems Magazine*. 2006. August. P. 54–62.
8. Гордеева Ю.Л., Винаров А.Ю., Ивашкин Ю.А. Численное моделирование статики непрерывного ферментативного процесса в аппарате с перемешиванием // *Математические методы в технике и технологиях: сб. трудов XXI Междунар. конф., Саратов, 27–30 мая 2008. – Саратов, 2008. Т. 6. С.109–110.*
9. Гордеева Ю.Л., Винаров А.Ю., Ивашкин Ю.А. Динамические характеристики непрерывного ферментативного процесса в аппарате с перемешиванием // *Математические методы в технике и технологиях: сб. трудов XXI Междунар. конф., Саратов, 27–30 мая 2008. – Саратов, 2008. Т. 6. С.110–112.*

КЛАССИФИКАЦИЯ ДИАГРАММ СОСТОЯНИЯ ТРОЙНЫХ РАССЛАИВАЮЩИХСЯ СИСТЕМ

Л.А. Серафимов, профессор, А.В. Фролкова, ассистент,

В.В. Илларионов, аспирант

кафедра Химии и технологии основного органического синтеза МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: illarionovvv@inbox.ru

Предложена классификация диаграмм состояния трехкомпонентных систем с учетом наличия различного количества областей как двух-, так и трехфазного расслаивания.

Triple stratified systems equilibrium diagrams classification with account taken of different quantity of areas for both two- and three-phase stratification has been offered.

Ключевые слова: диаграммы состояния, область расслаивания, классификация, уравнение Шлефли-Коши, уравнение Эйлера.

Key words: equilibrium diagrams, area of stratification, classification, Schlöfli-Cauchy equation, Euler equation.

В основе любых научных знаний лежит систематизация информации. Основным видом систематизации является классификация, то есть распределение объектов по группам, классам, типам на основе установления их сходства или различия между ними.

Классификации диаграмм фазового равновесия уделялось значительное внимание и 30, и 20 лет назад, и на сегодняшний день эта задача не потеряла своей актуальности.

Различают классификацию порядка и классификацию эквивалентности. Первую можно применить, если известно все множество классифицируемых объектов. В основе второй лежит какое-либо свойство или несколько свойств. При классификации диаграмм в основу берется свойство смеси, а именно совокупность особых точек с индексом +1 или -1 [1]. При этом учитывается, что динамические системы дистилляции и ректификации реализуют только особые точки типа обобщенного узла или обобщенного седла.

Первая классификация диаграмм фазового равновесия бинарных систем была предложена Свентославским [2] и основывалась на отклонении от закона Рауля. В настоящее время для бинарных систем классической принято считать классификацию, основанную на топологических свойствах, как частный случай многокомпонентных смесей.

Для тройных систем также широко известны три классификации. Это классификация Ю.В. Гурикова [3], классификация В.Т. Жарова [4], и классификация, предложенная Л.А. Серафимовым в [1] и подробно описанная в [5]. Все они отличаются обозначением того или иного типа или включением антиподов [4]. Однако все предложенные классификации рассматривают тройные системы с гомогенной жидкой фазой. Системам с расслаивающейся жидкой фазой уделялось значительно меньше внимания. В работе [6] была предложена классификация

диаграмм состояния тройных расслаивающихся систем. Автор использовал уравнение Шлефли-Коши с целью получения всего множества диаграмм фазового равновесия трехкомпонентных систем, при этом использовал следующее ограничение: внутри симплекса размерности m , соответствующего множеству составов $m+1$ компонентной жидкой смеси, может находиться не более одной области расслаивания с $m+1$ жидкими фазами. Однако, ряд диаграмм, приведенных в [6], не подчиняются уравнению Эйлера [7–9].

В работе [10] предложена новая классификация диаграмм состояния тройных расслаивающихся систем. Автор также учитывал критические многообразия, что позволило снять противоречия, связанные с невыполнением уравнения Шлефли-Коши или Эйлера. Однако и здесь рассмотрены трехкомпонентные системы, на бинарных составляющих которых возможна только одна область расслаивания.

В [11] рассмотрен случай бинарной системы с двумя областями расслаивания. Позже подобные системы были математически смоделированы [12]. В работе [13] приведена классификация диаграмм состояния бинарных систем с одной и двумя областями расслаивания. При переходе к тройным смесям диаграмма состояния может значительно усложняться, поскольку помимо двухфазного, в системе могут присутствовать области трехфазного расслаивания, причем их расположение и сочетание настолько разнообразно, что число диаграмм состояния может достигать десятка сотен.

В связи с этим до сих пор остается актуальным вопрос классификации диаграмм состояния тройных расслаивающихся систем.

Рассмотрим основные особенности такого рода диаграмм. Во-первых, это количество областей двухфазного расслаивания на границах концентрационного симплекса (рис.1 а). Их число может варьироваться от 1 до 6.

Последнему случаю отвечает диаграмма, когда на всех бинарных составляющих имеется по две области двухфазного расслаивания. Системы такого рода пока не известны, однако, нельзя исключать возможность их существования, поскольку такие системы не являются термодинамически противоречивыми.

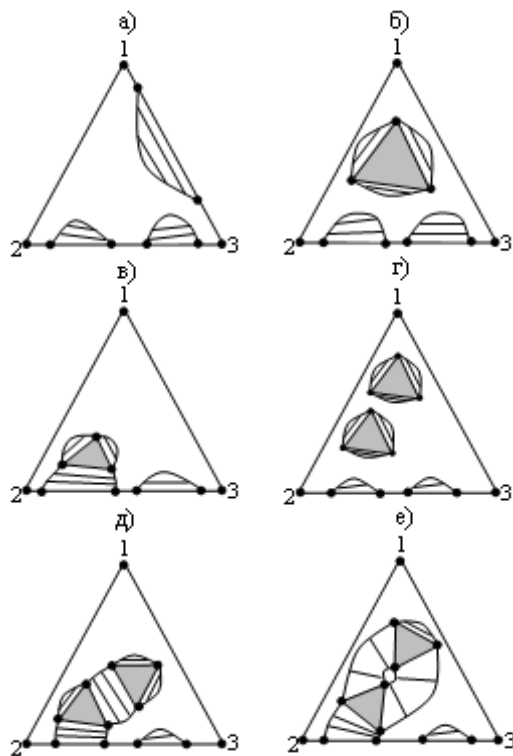


Рис. 1. Диаграммы состояния трехкомпонентных систем с различным числом областей расслаивания.

Во-вторых, это наличие областей трехфазного расслаивания, их количества, а также расположения в концентрационном симплексе системы. Области расслаивания могут не касаться своими границами областей двухфазного расслаивания бинарных составляющих (рис. 1б) или иметь с последними общие границы (рис. 1в). В случае если в системе имеется больше одной области трехфазного расслаивания, то здесь возможен ряд случаев:

- области трехфазного расслаивания не имеют общих границ (рис. 1г);
- области трехфазного расслаивания соединены между собой одной областью двухфазного расслаивания (рис. 1д);
- области трехфазного расслаивания соединены двумя областями двухфазного расслаивания (рис. 1е).

Общим свойством ряда концентрационных симплексов является подчинение альтернативной суммы всех геометрических элементов симплексов уравнению Шлефли-Коши (1):

$$\alpha_0 - \alpha_1 + \alpha_2 = 2, \quad (1)$$

где α_0 – число точек на диаграмме состояния; α_1 – число линий; α_2 – число областей, в том числе следует учитывать область вне фазового треугольника.

Взаимосвязь между элементами диаграммы расслаивания дается уравнением Эйлера (2):

$$\sum \alpha_0 q = 2\alpha_1, \quad (2)$$

где: q – количество связей точки.

На примере диаграммы состояния трехкомпонентной системы, приведенной на рис. 1в, проиллюстрируем выполнение обоих уравнений: здесь $\alpha_0 = 10$; $\alpha_1 = 15$; $\alpha_2 = 7$. Следовательно, согласно уравнению Шлефли-Коши: $\alpha_0 - \alpha_1 + \alpha_2 = 10 - 15 + 7 = 2$. Условие выполняется. Из 10 точек 3 точки (вершины треугольника) имеют $q = 2$, 4 точки – $q = 3$ и три – $q = 4$. Отсюда следует:

$$\begin{cases} \sum \alpha_0 q = 3 \cdot 2 + 4 \cdot 3 + 3 \cdot 4 = 30; \\ 2\alpha_1 = 2 \cdot 15 = 30 \end{cases} \quad \text{условие выполняется.}$$

Классификация диаграмм состояния тройных систем будет основана на анализе областей двух- и трехфазного расслаивания, их количестве и расположении в концентрационном симплексе.

Представим обозначение классификации следующим набором символов:

$$A.B.C.D.E.F. \quad (3)$$

Первый символ – А отвечает за число компонентов в системе. В нашем случае $A=3$. Символ В обозначает число областей двухфазного расслаивания в бинарных составляющих тройных систем. С точки зрения числа таких областей, диаграммы, содержащие не более одной области расслаивания в бинарных составляющих или две области двухфазного расслаивания на одной составляющей – неразличимы. В связи с этим, предлагается вести учет областей на каждой из бинарных составляющих, а именно В [1-2, 1-3, 2-3]. Использование данного приема целесообразно в реальных системах, поскольку в данном случае будет иметь принципиальное значение принадлежность области расслаивания той или иной бинарной составляющей.

Символ С – это число областей двухфазного расслаивания внутри концентрационного симплекса, которые связаны либо исключительно с областями трехфазного расслаивания, либо не имеет общих границ ни с какой другой областью (циклы).

Символ D – это число областей трехфазного расслаивания. E – число общих границ областей трехфазного и двухфазного расслаивания бинарных составляющих. F – определяет связь областей трехфазного расслаивания в концентрационном симплексе системы, а именно

число общих областей двухфазного расслаивания.

Следует отметить, что класс системы определяется первыми четырьмя символами, а именно A.B.C.D. Символы E и F определяют тип системы.

Рассмотрим ряд примеров, когда в системе отсутствует область трехфазного расслаивания. Здесь возможны следующие случаи: 3.1.0.0, 3.1.1.0, 3.2.0.0, 3.2.1.0, 3.3.0.0, 3.3.1.0, 3.4.0.0, 3.4.1.0, 3.5.0.0, 3.5.1.0, 3.6.0.0, 3.6.1.0. Последовательность (3) в классификации в данном случае ограничена четырьмя символами, поскольку в отсутствие области трехфазного расслаивания символы E и F утрачивают свой смысл. Систе-

мы, содержащие не более одной области двухфазного расслаивания в бинарных составляющих, могут относиться к классам 3.1.0.0, 3.1.1.0, 3.2.0.0, 3.2.1.0, 3.2.2.0, 3.3.0.0, 3.3.1.0, 3.3.2.0 (рис. 2). Причем сюда относятся случаи, как с закрытыми, так и с открытыми бинодалями. Случаи б, в; г, д; ж, з и к, л являются подтипами одного и того же типа системы. Однако подтипы в настоящей классификации учтены не будут, поскольку при переходе к более сложным системам число подтипов может достигать десятков. В диаграммах состояния е-м присутствуют циклы, количество которых в некоторых случаях подтипов представленного класса может достигать двух.

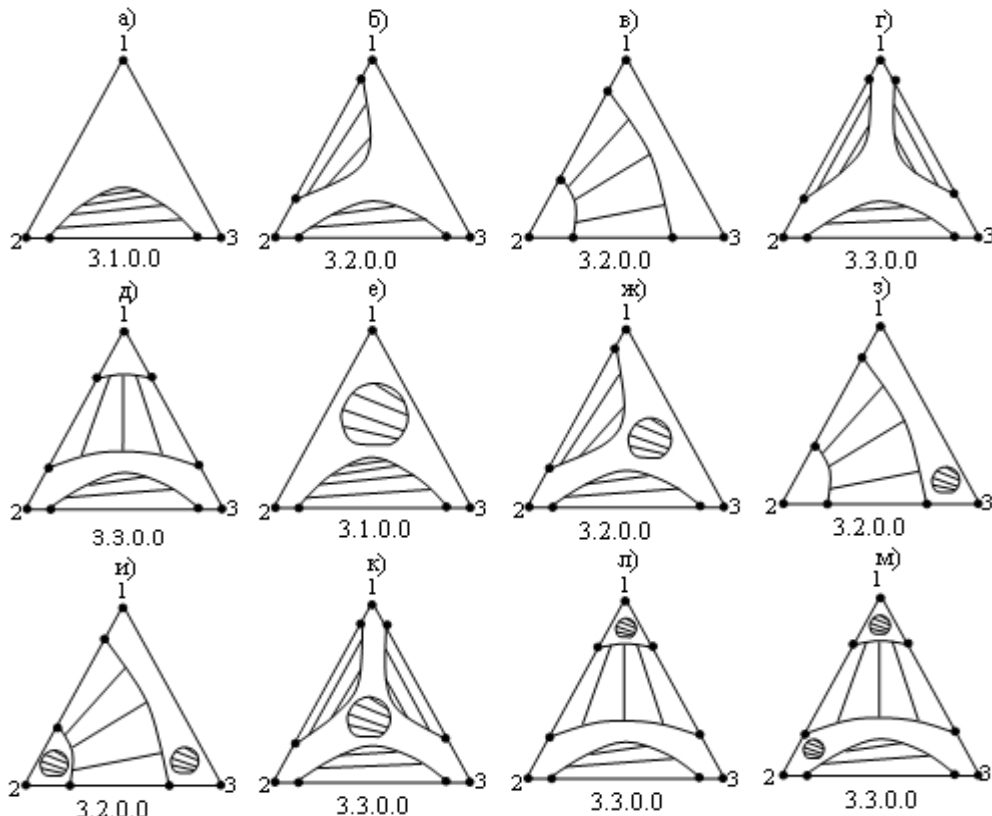


Рис. 2. Диаграммы состояния трехкомпонентных систем с одной областью расслаивания на бинарной составляющей.

Системы, содержащие две области двухфазного расслаивания хотя бы в одной из бинарных составляющих, могут относиться к следующим классам: 3.2.0.0, 3.2.1.0, 3.3.0.0, 3.3.1.0, 3.4.0.0, 3.4.1.0, 3.5.0.0, 3.5.1.0, 3.6.0.0, 3.6.1.0. На рис.3 представлены все случаи, за исключением систем с открытыми бинодалями (последние являются подтипами представленных систем) и систем с циклами. Диаграммы в и г, относящиеся к классу 3.4.0.0, легко различить, если расписать принадлежность областей бинарным составляющим: 3.4 [2,1,1].0.0 и 3.4 [2,2,0].0.0, соответственно. Количество циклов в диаграммах состояния систем с двумя областями двухфазного расслаивания на бинарных составляющих в различных подтипах с открытыми бино-

далями может достигать 4, например 3.6.4.0.

При рассмотрении следующих классов, ограничимся несколькими примерами, поскольку количество диаграмм состояния тройных систем доходит до десятков сотен. Также не будем затрагивать системы с циклами двухфазного расслаивания.

Далее перейдем к случаю, когда в системе имеется одна область трехфазного расслаивания. Разберем ряд примеров: область является «изолированной» или имеет общую границу с областью двухфазного расслаивания бинарной составляющей. В последовательности (3) рассматриваемой классификации у такого рода систем будет отсутствовать только символ F. Указанные случаи представлены на рис. 4.

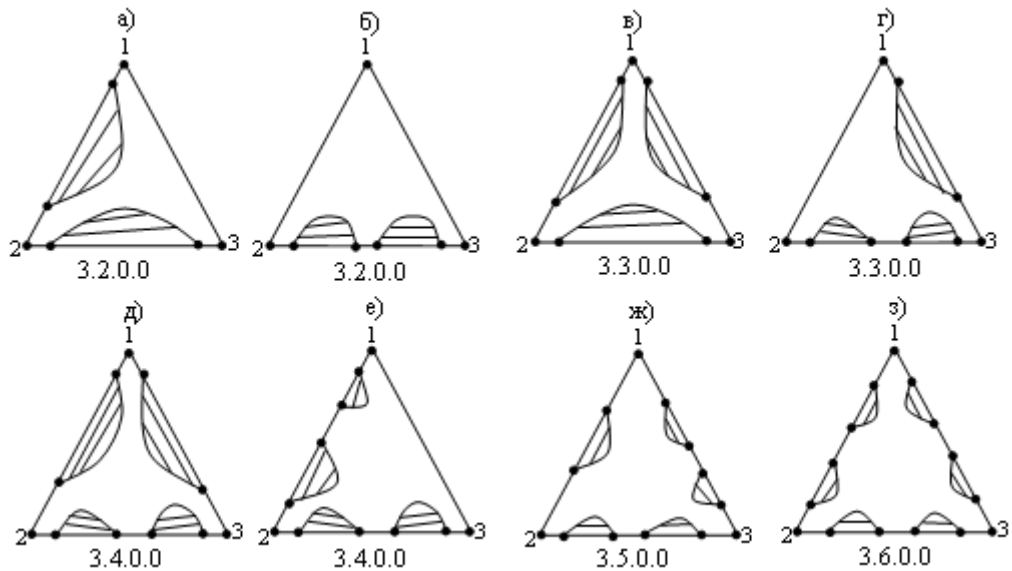


Рис. 3. Диаграммы состояния трехкомпонентных систем с двумя областями расслаивания на бинарной составляющей.

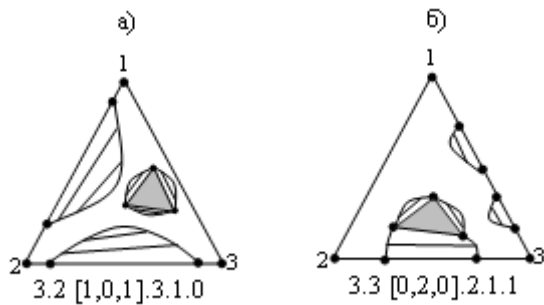


Рис. 4. Диаграммы состояния трехкомпонентных систем с одной областью трехфазного расслаивания.

Рассмотрим системы, в которых имеется две или более областей трехфазного расслаивания. В этом случае последовательность (3) классификации будет полной, поскольку появляется вероятность существования общих областей двухфазного расслаивания между областями трехфазного расслаивания.

В качестве примера приведем диаграмму 3.2 [0,0,2] и рассмотрим все возможные для нее случаи (рис. 5).

Из рис. 5 видно, что для диаграмм 3.2[0,0,2].0.0 возможны два подтипа – а и б. Аналогично, подтипы можно выделить для диаграмм 3.2 [0,0,2].3.1.0, 3.2 [0,0,2].4.2.0.2, 3.2 [0,0,2].5.2.0.1, 3.2 [0,0,2].3.2.2.1, 3.2 [0,0,2].6.2.0.0, 3.2 [0,0,2].4.2.2.0.

С увеличением числа областей двух- и трехфазного расслаивания растет и число подтипов диаграмм состояния. У подтипов одинаковое число общих границ трехфазного расслаивания и двухфазного расслаивания бинарных составляющих, а также одинаковое число общих областей двухфазного расслаивания, гранича-

щих с областями трехфазного расслаивания. Подтипы различаются только расположением областей в концентрационном симплексе, наличием открытых или закрытых бинодалей.

На рис. 6 представлены примеры более сложных систем.

Подведем итоги:

1. Предложена новая классификация диаграмм состояния тройных расслаивающихся систем, базирующаяся на анализе областей двух- и трехфазного расслаивания, их количестве, и границ соприкосновения.

2. Последовательность символов классификации представлена в виде: A.B.C.D.E.F. Первые четыре символа определяют класс системы (число компонентов системы, количество областей двухфазного расслаивания на бинарных составляющих, количество областей двухфазного расслаивания внутри концентрационного симплекса, количество областей трехфазного расслаивания). Символы E и F определяют тип диаграммы, а именно взаимное расположение областей двух- и трехфазного расслаивания.

3. Для тройных систем в последовательности (3) классификации A является неизменным числом и равно 3. Диапазон изменения B - от 1 до 6, при этом для систем, содержащих не более одной области расслаивания B может принимать значения 1, 2, 3, а для систем, в которых хотя бы на одной из бинарных составляющих имеется две области расслаивания B меняется от 2 до 6. Для различия систем такого рода было дополнительно внесено уточнение, а именно определение областей двухфазного расслаивания по бинарным составляющим [1-2, 1-3, 2-3]. C может принимать значения от 0 до 5. Диапазон изменения D – от 0 до 3.

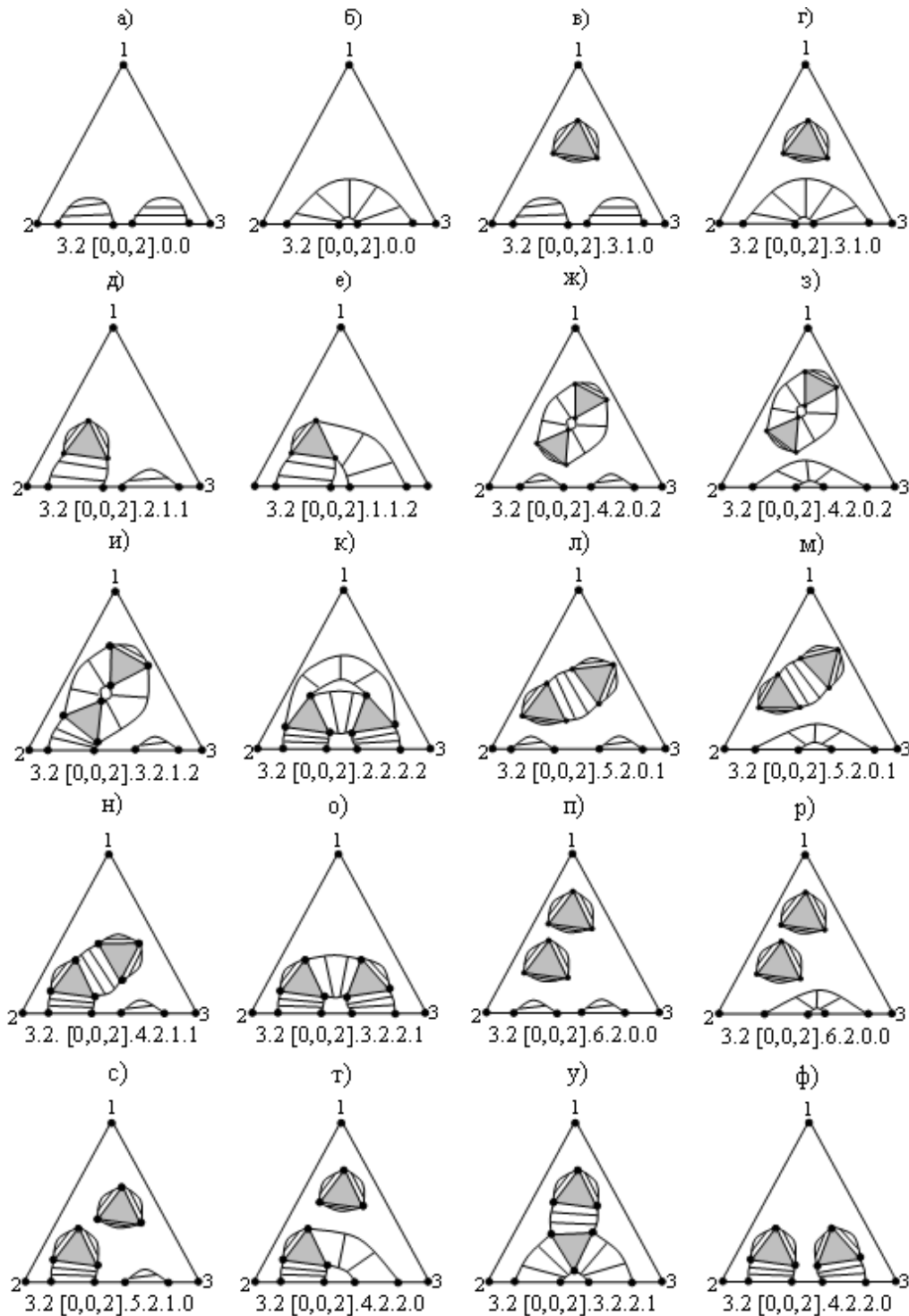


Рис. 5. Различные типы диаграмм состояния трехкомпонентных систем 3.2 [0,0,2].

4. Параметр E в последовательности классификации может принимать значения от 0 до 6, при этом всегда $E \leq B$ и $E \leq D$; F может меняться от 0 до 3.

Если в системе отсутствует область трехфазного расслаивания символы E и F утрачивают свой смысл и в последовательности (3) классификации не отражаются. Если $D=1$, в (3) отсутствует только параметр F , при этом E может принимать значения 0 или 1.

5. Количество диаграмм состояния тройных

расслаивающихся систем с учетом всех подтипов может достигать десятков сотен. Используя предложенную классификацию можно легко подсчитать число типов диаграмм состояния, принадлежащих любому классу. Если принять, что $D_{\max}=3$, то количество типов диаграмм согласно классификации равно 327, без учета внутренних циклов двухфазного расслаивания.

6. Альтернативная сумма всех геометрических элементов симплекса каждой из представленных диаграмм состояния подчиняется

уравнению Шлефли-Коши. Для внутренних и граничных элементов концентрационного сим-

плекса наблюдается строгое соответствие характеристик Эйлера.

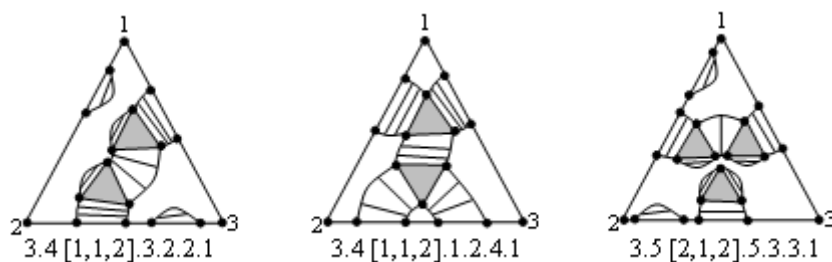


Рис. 6. Сложные структуры диаграмм состояния трехкомпонентных систем, относящихся к разным классам.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Серафимов Л.А. Теоретические принципы построения технологических схем ректификации неидеальных многокомпонентных смесей: автореф. дис. ... д-ра техн. наук. – М., 1967. 22 с.
2. Свентославский В.А. Азеотропия и полиазеотропия / Пер. с англ. под ред. Л.А. Серафимова. – М.: Химия, 1968. 244 с.
3. Гуриков Ю.В. Некоторые вопросы структуры диаграмм двухфазного равновесия жидкость–пар тройных гомогенных растворов // Журн. физ. химии. 1958. Т. 32. № 9. С. 1980–1996.
4. Жаров В.Т., Серафимов Л.А. Физико-химические основы дистилляции и ректификации. – Л.: Химия, 1975. 239 с.
5. Серафимов Л.А. Правило азеотропии и классификация многокомпонентных смесей VII. Диаграммы трехкомпонентных смесей // Журн. физ. химии. 1970. Т. 44. № 4. С. 1021–1027.
6. Береговых В.В. Исследование в области физико-химических основ ректификации тройных расслаивающихся смесей: дис. ... канд. техн. наук. – М., 1971. 192 с.
7. Серафимов Л.А. Симплексные числа // Ученые записки МИТХТ. 2002. Вып. 5. С. 3–7.
8. Харари Ф. Теория графов. – М.: Мир, 1973. 302 с.
9. Оре О. Теория графов. – М.: Наука, 1988. 352 с.
10. Фролкова А.К. Теоретические основы разделения многокомпонентных многофазных систем с использованием функциональных комплексов: дис. ... д-ра техн. наук. – М., 2000. 364 с.
11. Френсис Л. Равновесие жидкость–жидкость / Пер. с англ. под ред. Д.С. Циклеса. – М.: Химия. 1969. 239 с.
12. Бабурина Л.В., Маклашина Н.С. Моделирование равновесий жидкость–жидкость–пар для бинарных и трехкомпонентных систем // Журн. физ. химии. 1997. Т. 71. № 1. С. 86–90.
13. Серафимов Л.А., Фролкова А.В., Илларионов В.В. Элементы множества диаграмм бинарных систем // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 3. С. 55–60.

СИНТЕЗ ФАЗОВЫХ ПОРТРЕТОВ ДИАГРАММ ЧЕТЫРЕХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАКА ИНДЕКСА ОСОБОЙ ТОЧКИ, СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ ЧЕТЫРЕХКОМПОНЕНТНОМУ АЗЕОТРОПУ

Л.А. Серафимов, профессор, А.В. Фролкова, ассистент,
Д.В. Медведев, аспирант, Г.А. Семин, студент

кафедра Химии и технологии основного органического синтеза МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: medvedev-dv@bk.ru

Рассмотрена методика определения знака индекса особой точки, соответствующей четырехкомпонентному азеотропу, на основе развертки граничного пространства тетраэдра с использованием правила азеотропии в форме Серафимова.

A method of Poincaré index determination for a singular point corresponding to a 4-component azeotrope is proposed. The method is based on the equation of azeotropic relationship. 2-Dimensional diagram covering the 3-dimensional residue curve map as a surface is meant to be given originally.

Ключевые слова: фазовый портрет диаграммы дистилляционных линий, особая точка векторного поля над жидкость-пар, седло, узел, азеотроп, правило азеотропии, синтез диаграмм, знак индекса Пуанкаре, развертка диаграммы четырехкомпонентной системы.

Key words: phase portrait of residue curve map, singular point of a vector field formed by liquid-vapor equilibrium nodes, saddle point, node point, azeotrope, azeotropic relationship, Poincaré index sign.

Как известно [1, 2], знание диаграммы дистилляционных линий многокомпонентной системы имеет решающее значение для проектирования процессов разделения этой системы на целевые продукты или фракции. Область науки, в которой изучаются структуры фазовых портретов, называется термодинамико-топологическим анализом.

Подавляющее большинство диаграмм дистилляционных линий распадается на отдельные области развития фазовых процессов, границы между которыми определяют термодинамические ограничения на процесс разделения. В связи с этим необходимые составы конечных продуктов разделения зачастую могут быть недостижимы.

Для трехкомпонентных систем имеется всего 49 фазовых портретов с различной структурой [1]. Исследования показали, что для четырехкомпонентных смесей число фазовых портретов резко возрастает, причем классификация только по типам позволяет выделить 530 групп диаграмм [1]. С учетом подтипов это число достигает нескольких сотен тысяч. Составление полного атласа диаграмм четырехкомпонентных смесей наталкивается таким образом на серьезные трудности. В связи с этим рекомендуется термодинамико-топологический анализ проводить для каждой конкретной четырехкомпонентной смеси с целью выявления ее поведения, например, при ректификации.

В настоящее время можно в зависимости от исходной информации определить следующие задачи синтеза фазовых портретов четырехкомпонентных смесей:

1) даны температуры кипения всех чистых компонентов и азеотропов; необходимо определить качественную структуру фазового портрета;

2) даны параметры уравнений локальных составов всех бинарных составляющих; необходимо определить все составы азеотропов и структуру фазового портрета;

3) даны температуры кипения чистых компонентов, бинарных и тройных азеотропов; необходимо определить возможные в этом случае структуры фазового портрета (в том числе отсутствие или наличие четырехкомпонентного азеотропа).

Так как в настоящее время данных по азеотропии четырехкомпонентных смесей очень мало, в основном актуальны задачи типа 2 и 3.

Решение задачи типа 3 подразумевает: 1) определение знака индекса особой точки, соответствующей четырехкомпонентному азеотропу (если он имеется), и 2) определение типа этой точки.

Настоящая статья посвящена определению знака индекса особой точки, соответствующей четырехкомпонентному азеотропу, при известной структуре развертки – поверхности диаграммы-тетраэдра дистилляционных линий.

В общем случае особые точки граничного пространства тетраэдра входят в уравнение правила азеотропии в форме Серафимова, которое имеет вид [3]

$$(N_3 - C_3) + (N_2 - C_2) + N_1 = 2, \quad (1)$$

здесь N – число особых точек типа «узел», C – число особых точек типа «седло», нижний индекс соответствует компонентности особой точки, т.е. числу образующих ее компонентов.

Уравнение, записанное для полного пространства диаграммы дистилляционных линий четырехкомпонентной системы, выглядит следующим образом [4]:

$$2(N_4^+ - N_4^- + C_4^+ - C_4^-) + (N_3^+ - N_3^- + C_3^+ - C_3^-) + (N_2^+ - N_2^- + C_2^+ - C_2^-) + (N_1^+ - N_1^-) = 0 \quad (2)$$

Верхний индекс здесь соответствует знаку индекса Пуанкаре особой точки. Дело в том, что на двумерной поверхности особые точки типа «узел» всегда имеют положительный индекс, точки типа «седло» – отрицательный, поэтому в уравнении (1) эти знаки опущены. В случае же трехмерного концентрационного пространства как узлы, так и седла могут быть и положительными, и отрицательными. Так, в отличие от индекса устойчивого узла, всегда положительного, индекс неустойчивого узла зависит от размерности пространства:

$$i_{N^H} = (-1)^{n-1}, \quad (3)$$

где n есть компонентность системы, а $(n-1)$, таким образом, – размерность концентрационного симплекса. Что касается седла, то знак индекса этой особой точки определяет число отрицательных характеристических корней матрицы линейного приближения системы уравнений открытого равновесного испарения – т. н. порядок седла (r) [5]:

$$i_C = (-1)^r. \quad (4)$$

В уравнения (1) и (2) не входят особые точки типа «седлоузел», которые могут быть расположены на ребрах тетраэдра или в его вершинах (CN_2 и CN_1), так как индекс Пуанкаре этих точек, определенный относительно поверхности, равен нулю.

Общее число особых точек на развертке равно:

$$M_3 + M_2 + M_1 = (N_3 + C_3) + (N_2 + C_2 + CN_2) + (N_1 + CN_1). \quad (5)$$

Максимальное же число особых точек на развертке определяется числом концентрационных треугольников, ребер и вершин тетраэдра (случаи полиазеотропии, когда на одном элементе концентрационного симплекса расположено более одной азеотропной точки, мы здесь не рассматриваем), т.е.:

$$(M_3 + M_2 + M_1)_{\max} = \alpha_2 + \alpha_1 + \alpha_0 = 4 + 6 + 4 = 14, \quad (6)$$

где α_i – элемент поверхности тетраэдра размерности i : грань, ребро или точка.

Справедливость сказанного подтверждает расчет характеристики Эйлера, которая в случае двумерных замкнутых поверхностей должна быть равна 2 [6]:

$$\mathcal{E} = \alpha_2 - \alpha_1 + \alpha_0 = 4 - 6 + 4 = 2. \quad (7)$$

Поверхность тетраэдра гомеоморфна двумерной сфере, поэтому все особые точки в уравнении (1) равноправны, чего нельзя сказать о внутренней особой точке, соответствующей че-

тырехкомпонентному азеотропу, входящей в уравнение Серафимова (2) с коэффициентом повторяемости 2.

Число граничных особых точек при переходе от развертки к полной диаграмме остается неизменным, а из вида уравнений (1) и (2) следует, что это число всегда четно. Вместе с тем при таком переходе изменяется картина распределения особых точек по знакам индекса и по типам в соответствии со следующей схемой:

$$\begin{array}{lll} N_3^Y \rightarrow N_3^+(\vee\vee)C_3^- & N_2^Y \rightarrow N_2^+ & \\ N_3^H \rightarrow N_3^-(\vee\vee)C_3^+ & N_2^H \rightarrow N_2^- & N_1^Y \rightarrow N_1^+ \\ C_3 \rightarrow C_3^+(\vee\vee)C_3^- & C_2 \rightarrow C_2^+ & N_1^H \rightarrow N_1^- \\ & C_2 \rightarrow C_2^- & \end{array} \quad (8)$$

Здесь знак (vv) означает «либо, либо» [7], верхние индексы «Y» и «H» введены для обозначения, соответственно, устойчивых и неустойчивых узловых точек поверхности тетраэдра.

Причина такого изменения заключается в том, что индекс особой точки определяется произведением характеристических корней системы, рассматриваемой в m -мерном пространстве:

$$\text{sign}(i) = \text{sign} \left(\prod_i^m \lambda_i \right). \quad (9)$$

Переход от поверхности тетраэдра к полному объему приводит, таким образом, к появлению третьего характеристического корня. Данное обстоятельство можно интерпретировать графически. Для этого надо вспомнить, что рассматриваемые особые точки типа обобщенного узла или седла характеризуют траектории открытого равновесного испарения и ректификации, движение вдоль которых, следовательно, может быть разложено по координатным осям. Если использовать треугольники и тетраэдры Розебума, то первые характеризуются двумя независимыми координатными осями, а вторые – тремя; естественными координатными осями выступают при этом концентрации компонентов, которые могут быть изменены независимо друг от друга. Преобразования точек (8) связаны с переходом от двумерного пространства к трехмерному, при котором данная особая точка как центр системы координат приобретает дополнительную координатную ось, причем соответствующая этой оси интегральная кривая в общем случае может быть направлена как к особой точке, так и от нее. Так как в дифференциальных уравнениях открытой равновесной дистилляции параметр dt меньше нуля, то в случае если фигуративная точка, движущаяся по траектории, приближается к особой точке, $\lambda_i > 0$; в случае же ее удаления от особой точки $\lambda_i < 0$.

Рассматривая особую точку, соответствующую

щую тройному азеотропу, в пространстве развертки, можно выделить две координатные оси, которые сохраняются при переходе к тетраэдру. Третья координатная ось здесь принадлежит исключительно внутреннему пространству тетраэдра, а потому развертка не несет о ней

никакой информации и не определяет знака третьего характеристического корня. Последний, следовательно, может быть как положительным, так и отрицательным, обуславливая бивариантность перехода (8) для точки тройного азеотропа (рис. 1).

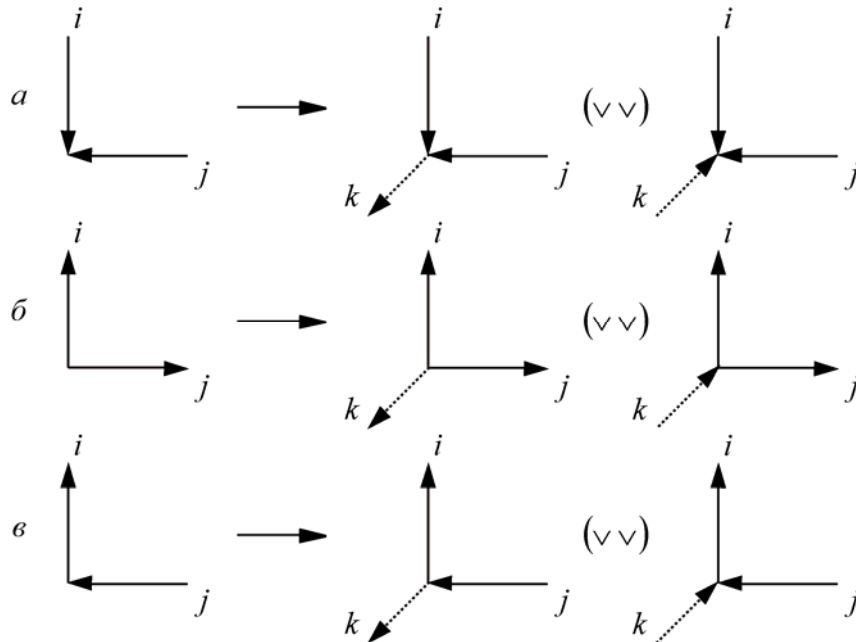


Рис. 1. Возможное изменение типа и знака индекса особой точки, соответствующей тройному азеотропу, при переходе от развертки к тетраэдру в случае: *a* – устойчивого узла; *б* – неустойчивого узла; *в* – седла.

Для особой точки, принадлежащей ребру тетраэдра (т.е. для бинарного азеотропа), координатные оси выделяются следующим образом: две из них расположены в плоскостях соответствующих тройных диаграмм, для которых данный двойной азеотроп является общим, а третья ось совпадает с ребром тетраэдра, на котором расположен данный азеотроп. Все три соответствующие траектории присутствуют на развертке диаграммы, поэтому знаки всех трех характеристических корней, характеризующих поведение траекторий в окрестности бинарного азеотропа в пространстве тетраэдра, могут быть определены уже по развертке, обуславливая однозначность перехода (8). Аналогично обстоит дело с вершинами тетраэдра – особыми точками, соответствующими чистым компонентам. В качестве координатных осей здесь можно рассматривать три сходящихся в данной точке ребра тетраэдра, которые в полном составе присутствуют на развертке.

Таким образом, тип особой точки, соответствующей тройному азеотропу, не может быть однозначно определен исходя из развертки; более того, одной развертке в общем случае может соответствовать несколько диа-

грамм, отличающихся типом и знаком своего тройного азеотропа (или азеотропов).

С помощью ЭВМ ранее нами было подсчитано общее число возможных разверток диаграмм четырехкомпонентных систем. Оно составляет 69848. Поэтому проследим лишь общие закономерности построения диаграммы на основе ее развертки.

Рассмотрим для начала системы без тройных и четырехкомпонентных азеотропов. Так как максимальное число особых точек при этом может быть равно 10, в соответствии с уравнением (2) имеем:

$$(N_2^+ + C_2^+) + N_1^+ = (N_2^- + C_2^-) + N_1^-. \quad (10)$$

Т.е. число точек с положительным знаком индекса, определенным относительно тетраэдра, в данном случае должно быть равно числу точек с отрицательным индексом. В зависимости от числа особых точек все возможные диаграммы можно разбить на 5 групп (табл. 1). При этом по-прежнему не принимаются в расчет седлоузловые точки CN_2 и CN_1 .

В качестве примера на рис. 2 проиллюстрировано построение одной из подобных диаграмм.

Таблица 1. Распределение особых точек в соответствии со знаком индекса на поверхности диаграммы дистилляционных линий четырехкомпонентной системы и в ее объеме в случае отсутствия тройных и четырехкомпонентных азеотропов.

№ п.п.	Развертка диаграммы		Полная диаграмма	
	Точки с положительным индексом	Точки с отрицательным индексом	Точки с положительным индексом	Точки с отрицательным индексом
1	2	0	1	1
2	3	1	2	2
3	4	2	3	3
4	5	3	4	4
5	6	4	5	5

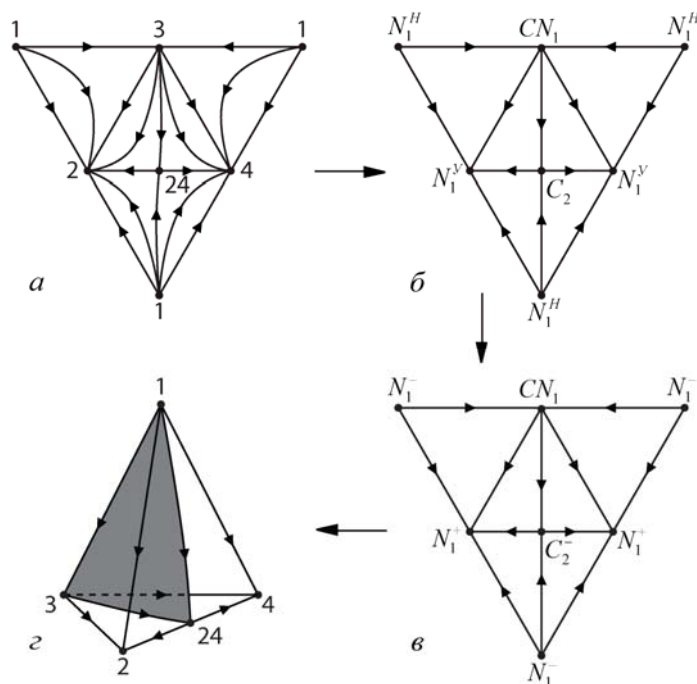


Рис. 2. Построение диаграммы четырехкомпонентной системы на основе ее развертки в случае отсутствия тройных и четырехкомпонентного азеотропов: а – развертка диаграммы дистилляционных линий; б – граф развертки с определенными относительно двумерного пространства типами особых точек; в – граф развертки с определенными относительно трехмерного пространства типами и знаками особых точек; г – диаграмма дистилляционных линий.

На рис. 2а представлена исходная развертка диаграммы класса 4.1.0. На рис. 2б представлен граф развертки (граф, кстати говоря, должен быть полным в терминах работы [8]); типы особых точек определены здесь относительно поверхности. На рис. 2в типы точек определены уже относительно трехмерного пространства тетраэдра, но сделано это без построения полной диаграммы на основании одной лишь развертки (или же схемы (8)). В соответствии с уравнениями (1) и (2) имеем:

$$N_1^Y = 2; N_1^H = 1; C_2 = 1; \quad 2 + 1 - 1 = 2;$$

$$N_1^+ = 2; N_1^- = 1; C_2^- = 1; \quad 2 - 1 - 1 = 0,$$

что соответствует одному из представленных в таблице случаев. Полная диаграмма изображена на рис. 2г.

Перейдем к следующей группе диаграмм, которую отличает от только что рассмотренной

наличие четырехкомпонентного азеотропа. По подсчетам Жарова [9] общее число таких диаграмм составляет шестьдесят.

Уравнение (2) в этом случае приобретает вид:

$$2(N_4^+ + C_4^+) + (N_2^+ + C_2^+) + N_1^+ = \\ = 2(N_4^- + C_4^-) + (N_2^- + C_2^-) + N_1^-$$

причем ввиду моноазеотропии

$$M_4 = (N_4^+ + C_4^+) + (N_4^- + C_4^-) = 1.$$

Все неустойчивые узлы по-прежнему меняют знак своего индекса на отрицательный при переходе от развертки к тетраэдру. Однако в отличие от диаграмм первой группы в зависимости от знака индекса особой точки, соответствующей четырехкомпонентному азеотропу, положительных граничных точек оказывается на две больше или же меньше, нежели отрицательных (табл. 2).

Таблица 2. Распределение особых точек в соответствии со знаком индекса на поверхности диаграммы дистилляционных линий четырехкомпонентной системы и в ее объеме в случае отсутствия тройных азеотропов при имеющемся четырехкомпонентном азеотропе.

№ п.п.	Развертка диаграммы		Полная диаграмма		Знак M_4
	Точки с положительным индексом	Точки с отрицательным индексом	Граничные точки с положительным индексом	Граничные точки с отрицательным индексом	
1	2	0	2	0	–
2	3	1	0	2	+
3	4	2	3	1	–
4	5	3	1	3	+
5	6	4	4	2	–
			2	4	+
			5	3	–
			3	5	+
			6	4	–
			4	6	+

Пример построения диаграммы данной группы представлен на рис. 3.

Распределение особых точек на границе по типам и знакам индекса позволяет записать:

$$N_2^H = 2; N_1^Y = 2; C_2 = 2; \quad 2 + 2 - 2 = 2;$$

$$N_1^+ = 2; N_2^- = 2; C_2^- = 2; \quad 2 - 2 - 2 = -2.$$

Как видно, баланс индексов в соответствии с уравнением (2) не сходится, поэтому необходимым является наличие в данной системе четырехкомпонентного азеотропа. Вообще же, обобщая оба рассмотренных случая, нетрудно заметить, что в четырехкомпонентных системах,

имеющих бинарные, но не имеющих тройных азеотропов, легко предсказуемо наличие или отсутствие четырехкомпонентного азеотропа. Если при переходе от развертки к тетраэдру число граничных особых точек с положительным индексом оказывается равным числу особых точек с отрицательным индексом (табл. 1), четырехкомпонентный азеотроп отсутствует. Если же эти числа не равны (табл. 2), в частности одно из них больше на 2, в системе должен быть четырехкомпонентный азеотроп, причем баланс индексов определяет знак индекса этой точки.

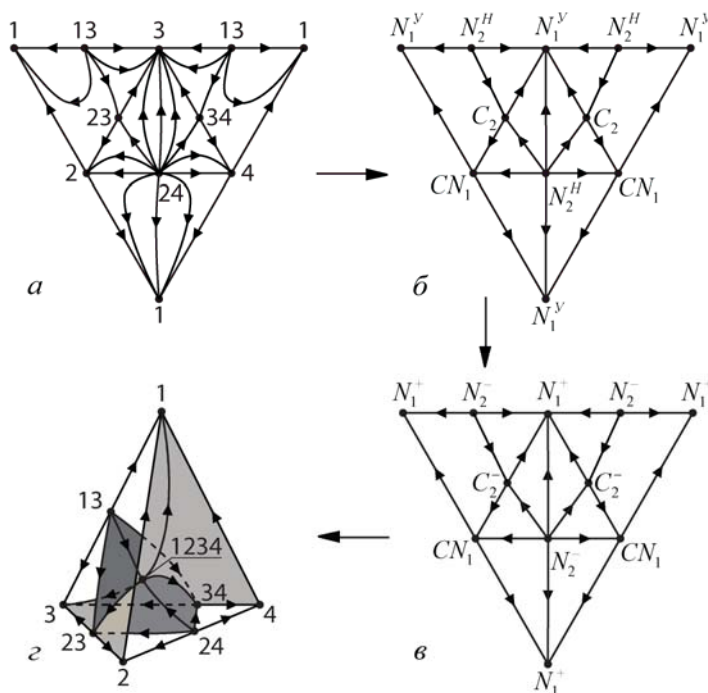


Рис. 3. Построение диаграммы четырехкомпонентной системы на основе ее развертки в случае отсутствия тройных, азеотропов, но наличия четырехкомпонентного: а – развертка диаграммы дистилляционных линий; б – граф развертки с определенными относительно двумерного пространства типами особых точек; в – граф развертки с определенными относительно трехмерного пространства типами и знаками особых точек; г – диаграмма дистилляционных линий.

Наконец, рассмотрим диаграммы систем, имеющих в своем составе тройные азеотропы. Максимальное число граничных точек здесь равно 14. Рассматриваемые диаграммы по-прежнему могут включать в себя особые точки с нулевым индексом (седлоузлы); неустойчивые узлы при переходе от развертки к тетраэдру, как и прежде, меняют свой знак на отрицательный. Однако на основе любой развертки, имеющей по меньшей мере один тройной азеотроп, в соответствии со схемой (8) можно построить диаграмму-тетраэдр как с четырехкомпонентным азеотропом, так и без него.

В зависимости от наличия четырехкомпонентного азеотропа или его отсутствия уравнение (2) может принимать здесь различный вид:

1) четырехкомпонентный азеотроп является отрицательным узлом или седлом:

$$\begin{aligned} & (N_3^+ + C_3^+) + (N_2^+ + C_2^+) + N_1^+ = \\ & = 2 + (N_3^- + C_3^-) + (N_2^- + C_2^-) + N_1^-; \end{aligned}$$

2) четырехкомпонентный азеотроп является положительным узлом или седлом:

$$\begin{aligned} & 2 + (N_3^+ + C_3^+) + (N_2^+ + C_2^+) + N_1^+ = \\ & = (N_3^- + C_3^-) + (N_2^- + C_2^-) + N_1^-; \end{aligned}$$

3) четырехкомпонентного азеотропа нет:

$$\begin{aligned} & (N_3^+ + C_3^+) + (N_2^+ + C_2^+) + N_1^+ = \\ & = (N_3^- + C_3^-) + (N_2^- + C_2^-) + N_1^-. \end{aligned}$$

Как видно, в первом случае число граничных особых точек с положительным индексом на 2 больше, во втором – на 2 меньше числа граничных особых точек с отрицательным индексом, в третьем же случае эти числа совпадают. Все возможные здесь группы диаграмм сведены в табл. 3.

Таблица 3. Распределение особых точек в соответствии со знаком индекса на поверхности диаграммы дистиляционных линий четырехкомпонентной системы и в ее объеме в случае наличия тройных азеотропов.

№ п.п.	Развертка диаграммы		Полная диаграмма		Знак M_4
	Точки с положительным индексом	Точки с отрицательным индексом	Граничные точки с положительным индексом	Граничные точки с отрицательным индексом	
1	2	0	2	0	–
			0	2	+
			1	1	0
			3	1	–
2	3	1	1	3	+
			2	2	0
			4	2	–
			2	4	+
3	4	2	3	3	0
			5	3	–
			3	5	+
			4	4	0
4	5	3	6	4	–
			4	6	+
			5	5	0
			7	5	–
5	6	4	5	7	+
			6	6	0
			8	6	–
			6	8	+
6	7	5	7	7	0
			7	7	0

Разберем в качестве примера систему, развертка диаграммы которой представлена на рис. 4а.

На поверхности тетраэдра имеются следующие граничные точки:

$$N_3^Y = 1; N_1^Y = 1; N_1^H = 1; C_2 = 1; 1 + 1 + 1 - 1 = 2.$$

Следовательно, система принадлежит группе 2 табл. 3. Однако при определении знаков индексов в трехмерном пространстве возможны два варианта диаграммы (рис. 4в и 4г):

$$N_3^+ = 1; C_2^+ = 1; N_1^+ = 1; N_1^- = 1; 1 + 1 + 1 - 1 = 2;$$

$$C_2^+ = 1; N_1^+ = 1; C_3^- = 1; N_1^- = 1; 1 + 1 - 1 - 1 = 0.$$

Так как в первом случае не сходится баланс индексов, в системе должен присутствовать четырехкомпонентный азеотроп с отрицательным знаком индекса. Таким образом, переход от развертки рис. 4г к развертке рис. 4в неизбежно связан с появлением внутренней азеотропной точки.

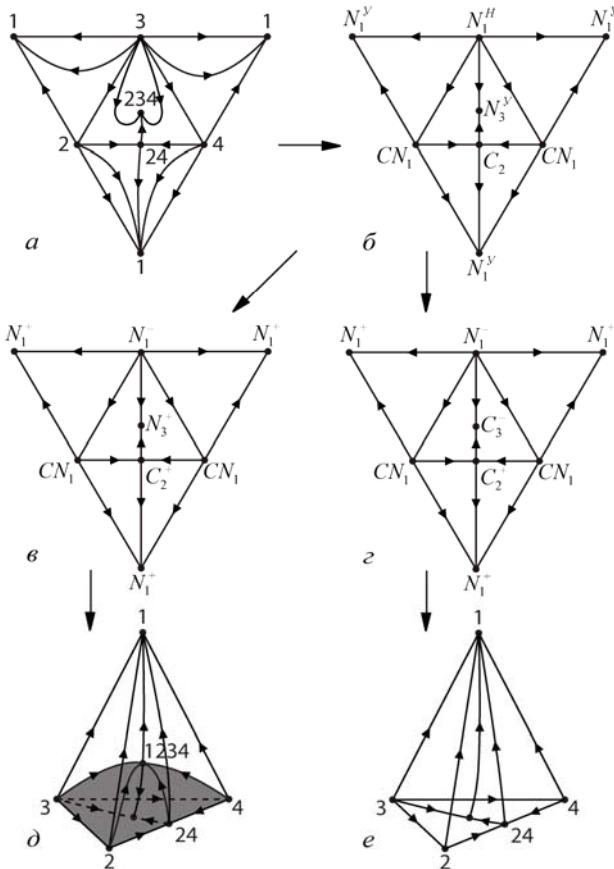


Рис. 4. Построение диаграммы четырехкомпонентной системы на основе ее развертки в случае наличия тройного азеотропа: *a* – развертка диаграммы дистилляционных линий; *б* – граф развертки с определенными относительно двумерного пространства типами особых точек; *в, з* – граф развертки с определенными относительно трехмерного пространства типами и знаками особых точек; *д, е* – диаграммы дистилляционных линий.

Рассмотрим также случай, когда число тройных азеотропов в системе превышает единицу. Пример развертки такой диаграммы представлен на рис. 5*a*.

Как видно, здесь на поверхности тетраэдра имеются две особые точки, соответствующие

трехкомпонентным азеотропам, – устойчивый узел и неустойчивый узел. Баланс индексов развертки дает:

$$N_3^V = 1; N_3^H = 1; N_1^V = 1; N_1^H = 1; C_2 = 2;$$

$$1 + 1 + 1 + 1 - 2 = 2.$$

При переходе к полной трехмерной диаграмме возможны четыре различных случая, отличающиеся друг от друга знаком индекса и типом тройных азеотропов:

$$N_3^+ = 1; C_2^+ = 1; N_1^+ = 1; N_3^- = 1; C_2^- = 1; N_1^- = 1;$$

$$1 + 1 + 1 - 1 - 1 - 1 = 0;$$

$$C_3^+ = 1; C_2^+ = 1; N_1^+ = 1; C_3^- = 1; C_2^- = 1; N_1^- = 1;$$

$$1 + 1 + 1 - 1 - 1 - 1 = 0;$$

$$N_3^+ = 1; C_3^+ = 1; C_2^+ = 1; N_1^+ = 1; C_2^- = 1; N_1^- = 1;$$

$$1 + 1 + 1 + 1 - 1 - 1 = 2;$$

$$C_2^+ = 1; N_1^+ = 1; N_3^- = 1; C_3^- = 1; C_2^- = 1; N_1^- = 1;$$

$$1 + 1 - 1 - 1 - 1 - 1 = -2.$$

Первые два отличает также отсутствие четырехкомпонентного азеотропа, так как баланс индексов в полном соответствии с уравнением (2) здесь оказывается нулевым. Две последние диаграммы, напротив, должны включать в себя четырехкомпонентный азеотроп: в третьем случае с отрицательным знаком индекса, в четвертом – с положительным.

Таким образом, наличие на развертке более чем одного тройного азеотропа приводит к заметному увеличению числа соответствующих ей различных вариантов диаграммы-тетраэдра. Что касается четырехкомпонентного азеотропа, то в любой из рассмотренных нами групп диаграмм изменение баланса знаков индексов при переходе от развертки к полному концентрационному пространству позволяет определить лишь знак этой особой точки, но не тип. Определение ее типа невозможно без анализа геометрической структуры разделяющих многообразий, в том числе сепаратрис и добавленных ребер. При этом оказывается эффективным использование матрицы смежностей, соответствующей данной структуре.

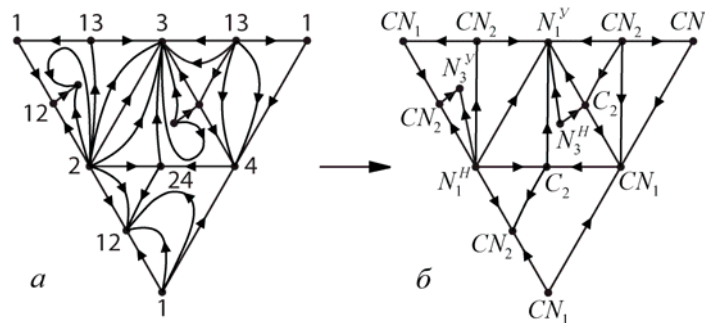


Рис. 5. Развертка диаграммы четырехкомпонентной системы с двумя тройными азеотропами: *a* – развертка диаграммы дистилляционных линий; *б* – граф развертки с определенными относительно двумерного пространства типами особых точек.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Серафимов Л.А. Теоретические принципы построения технологических схем ректификации неидеальных многокомпонентных смесей: дис. ... д-ра техн. наук. – М., 1968. 373 с.
2. Жаров В.Т. Физико-химические основы дистилляции и ректификации. – Л.: Химия, 1975. 240 с.
3. Серафимов Л.А., Бабич С.В. Новые формы правил азеотропии // Теорет. основы хим. технологии. 1996. Т. 30. № 2. С. 140–150.
4. Серафимов Л.А. Правило азеотропии и классификация многокомпонентных смесей. III. Распределение особых точек на диаграммах фазового равновесия четырехкомпонентных смесей // Журн. физ. химии. 1968. Т. 42. № 1. С. 252–256.
5. Красносельский М.А., Забрейко П.П. Геометрические методы нелинейного анализа // М.: Наука, 1975. 512 с.
6. Серафимов Л.А., Тациевская Г.И., Медведев Д.В. О различных формах правила азеотропии // Теорет. основы хим. технологии. 2010. Т. 44. № 2. С. 174–180.
7. Кондаков Н.И. Логический словарь-справочник. – М.: Наука, 1975. 219 с.
8. Серафимов Л.А., Фролкова А.К. Структурные оргграфы и матрицы фазовых портретов трехкомпонентных смесей. – М.: ИПЦ МИТХТ, 1998. 60 с.
9. Жаров В.Т. Азеотропные свойства многокомпонентных смесей / Сб. «Вопросы термодинамики гетерогенных систем и теории поверхностных явлений». – Л.: ЛГУ, 1971. С. 70–124.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 544.361 + 537.563.7

ПОВЕРХНОСТНАЯ ИОНИЗАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
АЗОТА, СЕРЫ, ФОСФОРА И МЫШЬЯКА

С.А. Солнцев, аспирант, К.О. Нагорнов, аспирант, В.И. Капустин, профессор

Московский институт радиотехники, электроники и автоматики

(Технический университет)

e-mail: regular@list.ru

Разработана экспериментальная установка и методика определения основных параметров поверхностной ионизации органических соединений. Для ряда органических веществ на основе азота, серы, фосфора, мышьяка определены механизм и основные параметры поверхностной ионизации.

A research facility and a technique for measuring the basic parameters of surface ionization of organic compounds were developed. For a series of organic compounds of nitrogen, sulfur, phosphorus, and arsenic the key parameters of surface ionization were determined.

Ключевые слова: поверхностная ионизация, сплав молибдена, соединения азота, соединения серы, соединения фосфора, соединения мышьяка.

Key words: surface ionization, molybdenum alloy, nitrogen compounds, sulfur compounds, phosphorus compounds, arsenic compounds.

Введение

Детектирование малых и сверхмалых количеств органических соединений на основе азота, серы, фосфора и мышьяка является важной задачей в области биофизики, физической и аналитической химии, экологического мониторинга окружающей среды. Для решения данной задачи применяют методы масс-спектрометрии, газовой и жидкостной хроматографии, ИК-спектроскопии, кулонометрии, ионометрии [1 – 2]. В хроматографии в качестве регистрирующих устройств применяют пламенно-ионизационные, аргоновые, электронно-захватные, хемилюминесцентные детекторы [3]. В последние годы большое развитие получили дрейф-спектрометрические методы идентификации органических соединений, в которых для ионизации органических соединений используют радиоизотопные источники, коронный разряд, лазерное излучение [4]. Дрейф-спектрометры характеризуются быстротой проведения единичного анализа, в качестве газа-носителя допускают применение воздуха атмосферного давления. Сравнительно недавно был сформулирован новый подход к дрейф-спектрометрии [5], в котором для селективной ионизации органических соединений азота использованы термоэммитеры ионов на основе микролегированных сплавов молибдена. Такие же термоэммитеры могут быть использованы в качестве детекторов и в методах хроматографии.

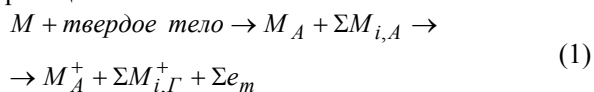
Целью данной работы является исследование поверхностной ионизации органических соединений азота, серы, фосфора и мышьяка и определение основных параметров поверхностной ионизации данных типов органических соединений – энергии активации поверхностной ионизации и эффективности поверхностной ионизации.

Физико-химические модели поверхностной ионизации

Модель, основанная на уравнениях Саха-Ленгмюра

Явление поверхностной ионизации атомов и

молекул часто рассматривают в рамках равновесного термодинамического подхода с использованием уравнений Саха-Ленгмюра [6–9]. При поверхностной ионизации органических соединений получаемые экспериментальные данные не всегда описываются уравнениями Саха-Ленгмюра, поэтому вводят поправочные множители [10–11] – коэффициенты трансформации ионов на поверхности ионизатора. При этом процесс образования ионов органических молекул представляют в виде квазихимических реакций:



где M , M_A – соответственно, исходная и адсорбированная на поверхности твердого тела органическая молекула, $M_{i,A}$ – фрагмент i -го типа исходной молекулы, e_m – электрон твердого тела, M_A^+ , $M_{i,\Gamma}^+$ – ион исходной молекулы и ион i -го типа, покидающие поверхность твердого тела.

Тогда величина тока ионов составит [7–8]:

$$I_i(T) = e \nu S \cdot \gamma_i(T, E) \cdot \beta_i(T, E), \quad (2)$$

где T – температура, E – величина напряженности электрического поля у поверхности твердого тела, $I_i(T)$ – величина тока ионов i -го типа с поверхности твердого тела, e – заряд электрона, ν – поток органических молекул на единицу площади поверхности твердого тела, S – площадь поверхности твердого тела, $\gamma_i(T, E)$ – коэффициент трансформации потока органических молекул в частицы i -го типа, $\beta_i(T, E)$ – коэффициент поверхностной ионизации частиц i -го типа, имеющий вид [12–14]:

$$\beta_i(T) = \frac{1}{1 + \frac{1}{A_i(T)} \exp \left(\frac{V_i - \phi - (eE)^{1/2}}{kT} \right)} \quad (3)$$

где V_i – адиабатический потенциал ионизации частиц i -го типа, $A_i(T)$ – отношение статистических сумм ионного и нейтрального сос-

тояния частиц i -го типа, φ – величина работы выхода твердого тела.

Для применимости уравнений Саха-Ленгмюра при рассмотрении поверхностной ионизации необходимо выполнение следующих условий:

1. Температура твердого тела достаточна для обеспечения обратимости реакции (1), то есть плотность тока термоэмиссии из твердого тела должна быть соизмерима с плотностью потока первичных атомов или молекул на поверхность твердого тела.

2. Время релаксации заряда в твердом теле мало по сравнению с временем прохождения атомами или молекулами приповерхностной области ионизации, то есть электропроводность твердого тела не должны быть слишком малой, а концентрация электронных ловушек на поверхности твердого тела не должна быть слишком большой.

3. При фрагментации первичных молекул на поверхности твердого тела процесс ионизации каждого фрагмента должен рассматриваться по отдельности.

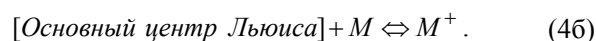
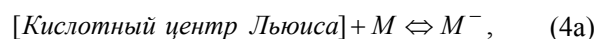
Данные условия выполняются при ионизации атомов щелочных, щелочноземельных, редкоземельных металлов, простых неорганических соединений (соли, оксиды металлов) на нагретой поверхности чистых металлов при высоких температурах в вакууме. Однако имеющиеся в литературе экспериментальные результаты по поверхностной ионизации органических молекул в условиях воздуха атмосферного давления [7–8] не могут быть интерпретированы в рамках уравнения (3). Это означает, что процесс образования ионов органических молекул должен рассматриваться в рамках других физических моделей.

Модель, основанная на представлениях о центрах Льюиса и Бренстеда

На рис. 1 приведена схема кислотно-основных центров Льюиса и Бренстеда [14], которые могут существовать на поверхности оксида молибдена в условиях воздуха.

Особенностью кислотных и основных центров Льюиса является возможность их участия в реакциях на поверхности оксида с обменом электронами с локализованных поверхностных состояний. Особенностью кислотных и основных центров Бренстеда является возможность их участия в реакциях на поверхности оксида с обменом протонами и гидроксил-ионами.

Основываясь на представлениях о центрах Льюиса и Бренстеда, реакции ионизации на поверхности оксида с участием центров Льюиса можно схематично представить в виде:



а реакции ионизации на поверхности оксида в условиях воздуха, содержащего молекулы воды,

можно представить в виде:

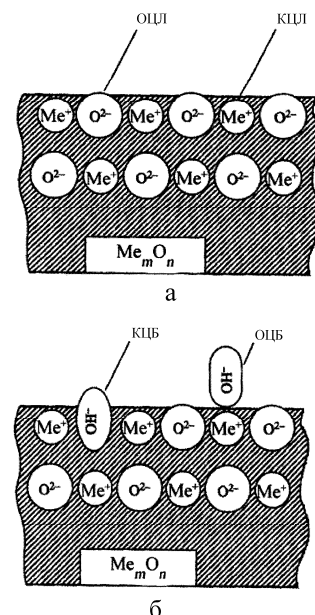
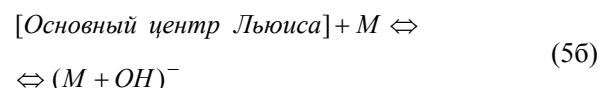
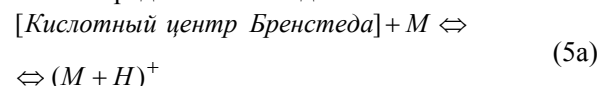
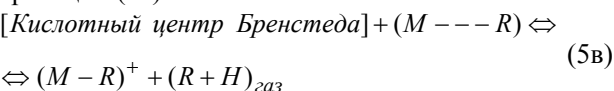


Рис. 1. Схема расположения кислотно-основных центров Льюиса (а) и Бренстеда (б) на поверхности оксида, соответственно, до и после ее гидратации.

Подчеркнем, что в реакциях (4) не принимают участие электроны из валентной зоны или зоны проводимости оксида, а в реакциях (5) принимают участие протоны и гидроксил-ионы, поэтому к описанию поверхностной ионизации по реакциям (4) и (5) неприменимы уравнения Саха-Ленгмюра.

Если исходный реагент M является сложной органической молекулой вида $(M \cdots R)$, то появляются дополнительная модификация реакции (5a):



причем данная реакция также не описывается уравнениями Саха-Ленгмюра.

Согласно теории абсолютных скоростей реакций [15], при малой степени заполнения центров Бренстеда адсорбированными органическими молекулами и при реакции ионизации первого порядка скорость десорбции ионов с поверхности оксида составит:

$$v_{\text{dec.}} = A \frac{P_{\text{газ}}^{1/2}}{(kT)^{5/2}} \exp\left(-\frac{\varepsilon}{kT}\right), \quad (6)$$

где A – константа, $P_{\text{газ}}$ – парциальное давление молекул органических соединений у поверхности термоэмиттера, ε – энергия активации десорбции. Если ионизация органических молекул протекает по реакции второго порядка, то

скорость десорбции ионов будет:

$$v_{\text{дес.}} = A \frac{P_{\text{эаэ}}^{1/2}}{(kT)^{5/4}} \exp\left(-\frac{\varepsilon}{kT}\right). \quad (7)$$

В ряде работ по масс-спектрометрии продуктов поверхностной ионизации органических соединений азота [6–9] действительно были обнаружены ионы, соответствующие протеканию реакций (4) и (5). Кроме того, в ряде ранних работ было установлено, что при определенных условиях на поверхности окисленного молибдена наблюдается ионизация органических соединений фосфора и мышьяка [7], однако подробно данное явление не исследовалось ввиду низкой стабильности поверхностно-ионизационных свойств чистого окисленного молибдена, использованного в качестве термоэммиттера ионов.

Методика экспериментальных исследований

Исследование поверхностной ионизации органических соединений в условиях атмосферного воздуха были проведены на установке, схема которой показана на рис. 2.

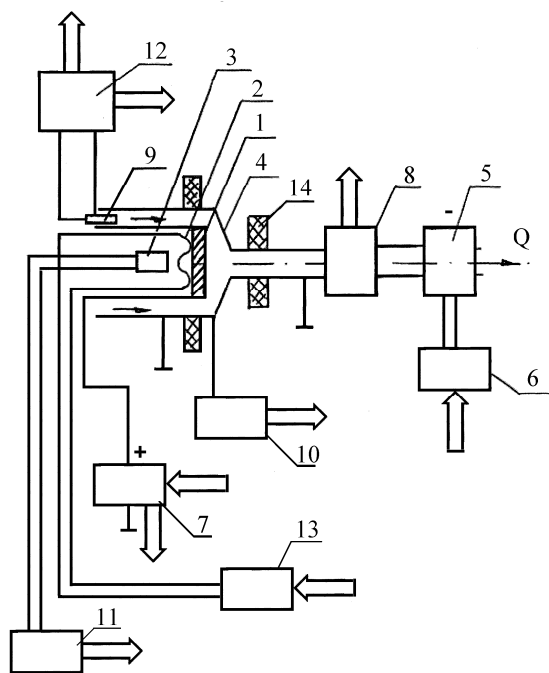


Рис. 2. Блок-схема установки для исследования поверхностно-эмиссионных свойств материалов.

Установка включает: 1 – термоэммиттер ионов органических соединений на основе микролегированного сплава молибдена, стабильного в условиях воздуха; 2 – нагреватель; 3 – датчик температуры термоэммиттера; 4 – коллектор ионов; 5 – насос; 6 – блок питания насоса; 7 – источник питания; 8 – датчик расхода газа; 9 – датчик влажности и температуры воздуха; 10 – усилитель тока ионов; 11 – контроллер температуры; 12 –

контроллер влажности и температуры; 13 – блок нагрева; 14 – изоляторы.

Спиртовые или водные растворы органических соединений наносили на нихромовую спираль, спираль вводили во входной канал прибора, нагревали подачей импульса электрического тока и регистрировали импульс J ионного тока коллектора ионов. По площади под кривой импульса тока находили величину заряда Q , прошедшего в цепи коллектора. Эффективность поверхностной ионизации органического вещества Y определяли по соотношению:

$$Y = Q \cdot \frac{M}{m}, \quad (8)$$

где m – масса введенной дозы органического вещества, M – молекулярная масса органического вещества.

При определении энергии активации поверхностной ионизации обработку экспериментальных результатов проводили с использованием уравнения, вытекающего из теории абсолютных скоростей реакций [15]:

$$J_i(T) = A \frac{P}{T^{5/2}} \exp\left(-\frac{\Delta W - (eE)^{1/2}}{kT}\right), \quad (9)$$

где J – плотность потока ионов, A – константа; ΔW – энергия активации поверхностной ионизации.

Методика измерений, обработки результатов и нахождения величины энергии активации поверхностной ионизации состояла из трех этапов:

- регистрация вольт-амперных характеристик (зависимостей тока ионов от напряжения U «термоэммиттер-коллектор ионов») при нескольких значениях температуры термоэммиттера;
- построение зависимостей типа «прямых Шоттки» (в координатах $\ln J \div U^{1/2}$) и экстраполяция их к нулевому значению электрического поля у поверхности термоэммиттера;
- построение зависимостей типа «прямых Ричардсона» (в координатах $\lg J \cdot T^{5/2} \div 5040/T$) с использованием значений ионного тока при нулевом значении электрического поля. Величина тангенса угла наклона получающихся участков прямых численно равна значению энергии активации поверхностной ионизации, выраженной в эВ.

В качестве тестовых веществ был выбран модельный набор органических соединений, в которых азот, сера, фосфор и мышьяк связаны в органических молекулах различными типами химических связей.

Результаты и их обсуждение

Органические соединения азота

В интервале температур термоэммиттера 400 ÷ 520°C исследована поверхностная ионизация моно-, ди- и триэтанолamina. Пробы водных растворов соединений объемом 0.5 мкл содержали, соответственно, 6 мкг, 2 мкг, 9 мкг анализи-

руемых веществ. Исследованы также спиртовые растворы димедрола и бенкаина, пробы которых содержали по 40 нг веществ, и водные растворы пиридина (содержание в пробе 0.1 нг) и гептила

(содержание в пробе 130 нг). На рис. 3 в качестве примера приведены результаты измерений для димедрола и результаты их обработки по соотношению (9).

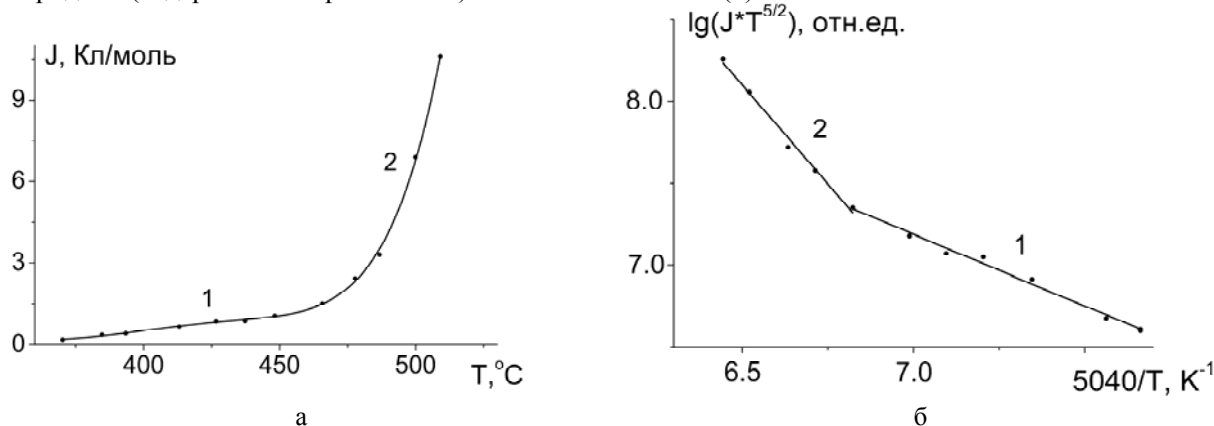


Рис. 3. Температурная зависимость эффективности ионизации (слева) и «прямая Ричардсона» (справа) для димедрола; (участок 1 – при $T < 467^\circ\text{C}$; участок 2 – при $T > 467^\circ\text{C}$).

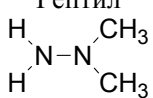
При температуре 467°C значения энергии активации ионизации всех исследованных аминов изменяются скачкообразно, что связано с фазовым переходом в триоксиде молибдена при

данной температуре. В табл. 1 приведены значения энергии активации ΔW ионизации органических соединений азота.

Таблица 1. Параметры поверхностной ионизации органических соединений азота.

Соединение азота	Тип соединения	Энергия активации ионизации ΔW , эВ		Эффективность ионизации ($T = 450^\circ\text{C}$), Кл/моль
		$T < 467^\circ\text{C}$	$T > 467^\circ\text{C}$	
Моноэтаноламин <chem>HOCH2CH2NH2</chem>	Первичный амин	0.67 ± 0.04	0.14 ± 0.02	6.5
Диэтаноламин <chem>HOCH2CH2N(CH2CH2OH)CH2CH2OH</chem>	Вторичный амин	3.04 ± 0.02	1.93 ± 0.08	1.0
Триэтаноламин <chem>HOCH2CH2N(CH2CH2OH)2</chem>	Третичный амин	3.32 ± 0.02	2.22 ± 0.10	0.5
Димедрол <chem>CCN(C)CCOC(c1ccccc1)c2ccccc2</chem>	Третичный амин	1.00 ± 0.04	2.42 ± 0.09	2.0
Бенкаин <chem>CCN(CC)CCOC(=O)c1ccccc1</chem>	Третичный амин	0.78 ± 0.04	2.27 ± 0.07	10

Продолжение табл. 1.

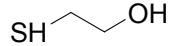
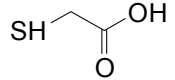
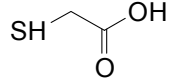
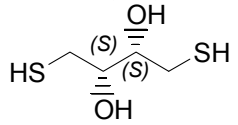
Пиридин 	Гетероциклический амин	1.24 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.15
Гептил 	Нитрозо-соединение	0.35 ± 0.06	0.94 ± 0.03	0.55

Органические соединения серы

В интервале температур термоэмиттера $400 \div 520^\circ\text{C}$ исследована поверхностная ионизация 2-меркаптоэтанола, тиогликолевой кислоты, 1,4 – дитиотрейтола и соединения $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$. Водные растворы соединений объемом 0.26 мкл содержали 32 мкг, 37 мкг, 0.3 мкг, 0.2 мкг анализируемых веществ, соответственно. Результаты измерений приведены в табл. 2.

При испарении проб тиогликолевой кислоты со спирали пики ионного тока имели два максимума, что свидетельствует о наличии в растворе двух компонентов (пики 1 и 2). Для одного из компонентов данного соединения при температуре менее 467°C величина ионного тока была меньше чувствительности прибора, что не позволило определить значение энергии активации поверхностной ионизации данного компонента во всем температурном интервале.

Таблица 2. Параметры поверхностной ионизации органических соединений серы.

Тип амина	Энергия активации ионизации ΔW , эВ		Эффективность ионизации ($T = 500^\circ\text{C}$), Кл/Моль
	$T < 467^\circ\text{C}$	$T > 467^\circ\text{C}$	
2-меркаптоэтанол ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) 	0.18 ± 0.05	0.81 ± 0.04	$0.69 \cdot 10^{-3}$
тиогликолевая кислота (HSCH_2COOH) - пик 1 	-	3.09 ± 0.07	$0.79 \cdot 10^{-2}$
тиогликолевая кислота (HSCH_2COOH) - пик 2 	1.54 ± 0.08	0.92 ± 0.04	$0.23 \cdot 10^{-1}$
1,4 – дитиотрейтол ($\text{HSCH}_2[\text{CH}(\text{OH})_2]\text{CH}_2\text{SH}$) 	1.49 ± 0.02	0.16 ± 0.06	$0.89 \cdot 10^{-3}$
$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$	1.23 ± 0.07	1.45 ± 0.03	1.43

Органические соединения фосфора

В интервале температур термоэмиттера $400 \div 520^\circ\text{C}$ исследована поверхностная ионизация трибутилфосфата и соединения $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{PH}_2\text{O}$. Водные растворы соединений объемом 0.26 мкл содержали, соответственно, 11 и 0.27 мкг анализируемых веществ. Результаты измерений приведены в табл. 3.

Органические соединения мышьяка

В интервале температур термоэмиттера $400 \div 520^\circ\text{C}$ исследована поверхностная ионизация органического соединения Арсеназо I и неорганических соединений мышьяка Na_2HAsO_3 и $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Содержание исследуемых веществ в пробе составляло 390 нг. Результаты измерения

приведены в табл. 4.

Величина тока ионизации неорганического соединения Na_2HAsO_3 была меньше чувствительности измерительного прибора, составляющей $1 \cdot 10^{-12}$ Ампер, а величина тока ионизации неорганического соединения $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ была на пределе чувствительности.

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных результатов для органических соединений азота позволил сделать следующие обобщения.

Поверхностная ионизация в ряду «первичный – вторичный – третичный амин» (моноэтаноламин – диэтаноламин – триэтаноламин) характеризуется ростом значений энергии активации ионизации,

что, на наш взгляд, отражает уменьшение вероятности захвата протона с поверхности оксида молекулой органического соединения при последовательной замене протонов, связанных в органической молекуле с азотом и имеющих малые ионные радиусы, на углеводородные радикалы. Поверхностная ионизация в ряду

третичных аминов (триэтаноламин – димедрол – бенкаин) сложным образом зависит от структуры органических молекул. Однако в ряду одноклассных органических соединений (димедрол – бенкаин) величина энергии активации ионизации уменьшается с уменьшением молекулярной массы соединения.

Таблица 3. Параметры поверхностной ионизации органических соединений фосфора.

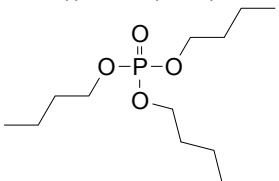
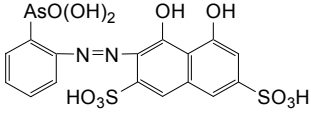
Тип соединения	Энергия активации ионизации ΔW , эВ		Эффективность Ионизации ($T = 500^\circ\text{C}$), Кл/Моль
	$T < 467^\circ\text{C}$	$T > 467^\circ\text{C}$	
Трибутилфосфат ($(\text{C}_4\text{H}_9\text{O})_3\text{PO}$)			
	0.99	1.48	$0.57 \cdot 10^{-1}$
Соединение (C_6H_5) ₃ PH ₂ O	1.25	1.07	19.44

Таблица 4. Параметры поверхностной ионизации соединений на основе мышьяка.

Тип соединения	Энергия активации ионизации ΔW , эВ		Эффективность ионизации ($T = 500^\circ\text{C}$), Кл/Моль
	$T < 467^\circ\text{C}$	$T > 467^\circ\text{C}$	
Арсеназо I $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{AsN}_2\text{O}_8\text{S}_2$			
	0.68	0.41	0.5
Na_2HAsO_3	-	-	-
$\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	-	-	Менее $1 \cdot 10^{-2}$

Поверхностная ионизация органических соединений из класса гетероциклических аминов по своему характеру похожа на ионизацию классических аминов, так как в обоих типах соединений атом азота соединен тремя связями с углеводородными радикалами. Заметно различающиеся значения энергии активации ионизации вторичных, третичных и гетероциклических аминов при температуре ниже 467°C могут служить их идентификационным параметром при детектировании органических соединений азота.

Поверхностная ионизация органических соединений, содержащих группы ($-\text{NH}_2$, первичный амин) и ($=\text{N}-\text{N}=$, нитрозосоединение), характеризуется очень низкими значениями энергии активации поверхностной ионизации. Видимо, это связано с легкостью захвата протонов с поверхности термоэмиттера указанными группами и, в свою очередь, обеспечивает высокую чувствительность при детектировании соединений такого типа.

Для параметров поверхностной ионизации органических соединений серы характерны две особенности. Во-первых, значения энергии активации, характеризующие энергетический

барьер для десорбции образовавшихся ионов с поверхности материала термоэмиттера, зависят от структуры органической молекулы, но лежат примерно в том же интервале значений, что и для органических соединений азота. Во-вторых, значения эффективности ионизации, характеризующие концентрацию активных центров ионизации на поверхности термоэмиттера ионов, на один – два порядка меньше, чем для ионизации органических соединений азота. Это свидетельствует о том, что природа активных центров, ответственных за поверхностную ионизацию органических соединений серы, отличается от природы активных центров поверхностной ионизации органических соединений азота. Поэтому для обеспечения высокой чувствительности метода при детектировании органических соединений серы необходимо проведение более детальных исследований центров поверхностной ионизации органических соединений серы и оптимизация состава и режима работы материала термоэмиттера ионов.

Значения энергии активации и эффективности поверхностной ионизации органических соединений фосфора и мышьяка лежат в тех же интервалах, что и значения соответствующих парамет-

ров для органических соединений азота. Это свидетельствует о единой природе активных центров ионизации при поверхностной ионизации органических соединений азота, фосфора и мышьяка.

Неорганические соединения азота, серы, фосфора и мышьяка практически не ионизируются на поверхности термоэмиттера ионов в исследованном интервале температур термоэмиттера. Это свидетельствует о том, что характер окружения атомов азота, серы, фосфора и мышьяка в молекулах существенно влияет на процесс их поверхностной ионизации.

Заключение

1. Проанализированы известные модели поверхностной ионизации и показано, что поверхностную ионизацию органических соединений азота, серы, фосфора и мышьяка в условиях воздуха атмосферного давления при не очень высоких температурах целесообразно рассматривать на основе представлений об активных центрах Бренстеда на поверхности окисленных микролегированных сплавов молибдена.

2. Разработана экспериментальная установка, методика проведения измерений и обработки экспериментальных результатов, позволяющие определять основные параметры поверхностной ионизации органических соединений – значения энергии активации и эффективности поверхностной ионизации.

3. Выбран модельный набор органических соединений на основе азота, серы, фосфора и мышьяка, отражающий основные типы валентных связей в органических соединениях, для которых экспериментально определены значения энергии активации ионизации и температурные зависимости эффективности поверхностной ионизации.

4. Установлено, что ионизация органических соединений азота, фосфора и мышьяка характеризуется высокими значениями эффективности поверхностной ионизации, причем значения энергии активации ионизации органических соединений азота, фосфора и мышьяка могут быть использованы в качестве их идентификационных параметров.

5. Показано, что природа активных центров, ответственных за поверхностную ионизацию органических соединений серы, отличается от природы активных центров поверхностной ионизации органических соединений азота, фосфора и мышьяка.

6. Установлено, что неорганические соединения азота, серы, фосфора и мышьяка практически не ионизируются на поверхности термоэмиттеров ионов на основе окисленных микролегированных сплавов молибдена в условиях воздуха атмосферного давления при умеренных значениях температуры термоэмиттера.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. – М.: Мир, 2003. 683 с.
2. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 493 с.
3. Руденко Б.А., Руденко Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы. Т. 1: Газовая хроматография. – М.: Наука. 2003. 425 с.
4. Buryakov I.A. Ion mobility increment spectrometer with radial symmetry // Int. J. Ion Mobility Spectr. 2003. V. 6. P. 121–126.
5. Банных О.А., Поварова К.Б., Капустин В.И. Новый подход к поверхностной ионизации и дрейф-спектрометрии органических соединений // Журн. техн. физики. 2002. Т. 72. Вып. 12. С. 88–93.
6. Назаров Э.Г., Русалев У.Х. Нестационарные процессы поверхностной ионизации. – Ташкент: Фан, 1991. 204 с.
7. Зандберг Э.А., Расулев У.Х. Поверхностная ионизация органических соединений // Успехи химии. 1982. Т. 51. № 9. С. 1425–1446.
8. Зандберг Э.А., Ионов Н.И. Поверхностная ионизация. – М.: Наука, 1969. 432 с.
9. Khasanov U., Rasulev U.Kh., Usmanov D.T., Iskhakova C.C., Nabiev U.O. Application of surface ionization methods for highly sensitive and selective analysis of benzodiazepine derivatives // J. Pharm. Biomed. Analysis. 2005. V. 37. P. 1125–1133.
10. Блащенко Н.М., Лаврентьев Г.Я. Расчет параметров поверхностных многомолекулярных комплексов, предшествующих образованию ассоциатов // Письма в Журн. техн. физики. 2005. Т. 31. № 16. С. 1–7.
11. Лаврентьев Г.Я. Расчет параметров многомолекулярного комплекса при неравновесной поверхностной ионизации его фрагментов // Журн. техн. физики. 2009. Т. 79. № 1. С. 112–117.
12. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. Статистическая физика. – М.: Наука, 1976. Т. 5. Ч. 1. 584 с.
13. Лаврентьев Г.Я. Кинетика мономолекулярных реакций на поверхности // Письма в Журн. техн. физики. 2001. Т. 27. № 10. С. 52–56.
14. Моррисон С. Химическая физика поверхности твердого тела. – М.: Мир, 1980. 488 с.
15. Глессон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. – М.: Иностранная литература, 1948. 583 с.

СВОЙСТВА МАТРИЦЫ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЛЕТУЧЕСТЕЙ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЗЕОТРОПНЫХ И АЗЕОТРОПНЫХ СМЕСЕЙ

К.Ю. Тархов, аспирант, Л.А. Серафимов, профессор

кафедра Химии и технологии основного органического синтеза МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: kirill-tarkhov@yandex.ru

С привлечением понятий, определений и математического аппарата линейной алгебры рассмотрены основные свойства, в том числе условие азеотропии для матрицы относительных летучестей многокомпонентных смесей различной физико-химической природы.

Using definitions, concepts and the mathematical apparatus of linear algebra the basic regularities including the condition of azeotropy for the matrix of relative volatilities are considered in the paper.

Ключевые слова: коэффициент распределения, матрица, кратность, размерность, минор, порядок, единичное α -многообразие, зеотропные и азеотропные смеси.

Key words: distribution coefficient, matrix, dimensionality, minor, determinant, α -1-manifold, zeotropic and azeotropic mixtures.

Как известно, относительной летучестью компонентов i и j называется отношение их коэффициентов распределения K_i и K_j между паровой и жидкой фазой, находящихся в равновесии, соответственно:

$$\alpha_{ij} = \frac{K_i}{K_j}. \quad (1)$$

$$\text{Учитывая, что при этом } K_i = \frac{y_i}{x_i}, \text{ а } K_j = \frac{y_j}{x_j}.$$

Таким образом, выражение (1) можно переписать в следующем виде:

$$\alpha_{ij} = \frac{y_i x_j}{x_i y_j}. \quad (1a)$$

Выражение для относительной летучести компонентов в неидеальных двухфазных системах жидкость–пар можно представить в виде:

$$\alpha_{ij} = \frac{P_i^0 \gamma_i}{P_j^0 \gamma_j}, \quad (2)$$

где P_i^0 – давление насыщенного пара i -го компонента при температуре кипения раствора; γ_i – коэффициент активности i -го компонента в жидкой фазе. Введение коэффициента активности учитывает отклонение от идеальности компонента в жидкой фазе при допущении об идеальности паровой фазы. При $\gamma_i=1$ выражение (2) переходит в выражение для относительной летучести компонентов в идеальных смесях.

Уравнение фазового равновесия, записанное через величины относительной летучести компонентов, имеет вид:

$$y_j = \frac{\alpha_{jk} x_j}{\sum_{i=1}^{n-1} (\alpha_{ik} - 1) x_i + 1}, \quad (3)$$

где индекс k может принадлежать любому компоненту и принимать значения $k=1, 2, 3, \dots, n$, причем величина k сохраняется для всех элементов суммы. Индекс i при закреплённом k в

свою очередь принимает значения $i=1, 2, 3, \dots, n; i \neq k$.

В случае бинарных смесей можно качественно судить о большой или малой величине относительной летучести по диаграмме фазового равновесия жидкость–пар [1].

При осуществлении процесса ректификации в любой двухсекционной колонне имеются ограничения, наличие которых приводит к тому, что не все составы являются достижимыми. Эти ограничения носят термодинамический характер и обусловлены топологическими и геометрическими особенностями структур диаграмм фазового равновесия жидкость–пар, на законах которого базируется процесс ректификации. Эти особенности довольно часто играют существенную роль в организации процесса ректификации (определяют область развития процесса и достижимость тех или иных конечных составов продуктов ректификационного разделения).

К таким особенностям фазовых диаграмм многокомпонентных зеотропных и азеотропных смесей относятся сепаратрические многообразия или разделяющие линии процесса ректификации [2], изотермо–изобарические многообразия, складки на поверхностях равновесных температур кипения двухфазных систем жидкость–пар [3, 4], единичные К-линии, единичные α -многообразия, псевдоидеальные многообразия [5] и многие другие [6]. Все перечисленные многообразия могут быть как граничными, так и внутренними, иметь прямолинейную или криволинейную форму.

Особый интерес представляют так называемые единичные α -многообразия, которые впервые были рассмотрены в работе [7], в которой был исследован ход единичных α -линий для различных типов диаграмм фазового равновесия двухфазных трехкомпонентных смесей, а также приведено следующее определение: единичным α -многообразием, вложенным в концентрационное пространство, соответствующее жид-

кой или паровой фазе, принято называть такое многообразие, для которого относительная летучесть определенной пары компонентов или некоторой совокупности пар компонентов равна единице.

В случаях, когда относительная летучесть одной или нескольких пар компонентов равна единице, в концентрационных симплексах наблюдается единичное α -многообразие, которое характеризуется тем, что вдоль него одна относительная летучесть или несколько относительных летучестей равны единице, т.е. выполняется следующее условие:

$$\alpha_{ij} = \frac{y_i x_j}{x_i y_j} = 1. \quad (4)$$

Каждое единичное α -многообразие имеет определенную кратность и размерность [8, 9]. Под кратностью ρ единичного α -многообразия понимается число относительных летучестей, величины которых равны единице или, другими словами, число пар компонентов, для которого выполняется равенство (4).

Равенство кратности нулю ($\rho=0$) означает отсутствие единичных α -многообразий в концентрационных симплексах. Наличие единичного α -многообразия, кратность которого равна $n-1$, соответствует n -компонентному азеотропу, т.е. азеотропной точке, находящейся внутри концентрационного симплекса.

Кратность единичного α -многообразия заключена в пределах:

$$1 \leq \rho \leq n-1. \quad (5)$$

Это означает, что минимальное значение кратности всегда равно 1 ($\rho_{\min}=1$), т.е. имеется лишь одна пара компонентов, величина относительной летучести которой равна единице. Максимальная кратность единичного α -многообразия на единицу меньше числа компонентов и равна $\rho_{\max}=n-1$.

Размерность единичного α -многообразия m_ρ в общем случае равна

$$m_\rho = n - \rho - 1, \quad (6)$$

где n – число компонентов.

Таким образом, единичное α -многообразие первой кратности имеет размерность $n-2$, т.е. меньше размерности концентрационного симплекса, равной $n-1$, на единицу. Нулевая размерность при любом числе компонентов n соответствует азеотропной точке. Из вышесказанного следует, что размерность единичного α -многообразия изменяется в интервале:

$$0 \leq m_\rho \leq n-2. \quad (7)$$

В табл. 1 представлены кратность и размерность единичных α -многообразий для смесей, число компонентов которых изменяется от двух до десяти.

Для любой многокомпонентной смеси может быть записана матрица относительных летучестей:

$$\begin{pmatrix} \alpha_{11} & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \dots & \alpha_{1n} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} & \alpha_{23} & \dots & \alpha_{2n} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & \alpha_{33} & \dots & \alpha_{3n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \alpha_{n1} & \alpha_{n2} & \alpha_{n3} & \dots & \alpha_{nn} \end{pmatrix}. \quad (8)$$

Таблица 1. Размерность единичных α -многообразий различной кратности для смесей с числом компонентов от 2 до 10.

n	Кратность единичного α -многообразия ρ								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0								
3	1	0							
4	2	1	0						
5	3	2	1	0					
6	4	3	2	1	0				
7	5	4	3	2	1	0			
8	6	5	4	3	2	1	0		
9	7	6	5	4	3	2	1	0	
10	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Матрица относительных летучестей является квадратной, т.к. в ней число строк совпадает с числом столбцов. Порядок α -матрицы (число столбцов и число строк) равен числу компонентов рассматриваемой смеси [10].

Для любой матрицы относительных летучестей справедливы следующие соотношения:

$$\alpha_{ii} = 1, \quad (9)$$

$$\alpha_{ij} \alpha_{ji} = 1, \quad (10)$$

$$\frac{\alpha_{ik}}{\alpha_{jk}} = \alpha_{ij}, \quad (11)$$

$$\frac{\alpha_{ki}}{\alpha_{kj}} = \alpha_{ji}. \quad (12)$$

Очевидно, что основой для вывода записанных выше соотношений (9)–(12) является выражение (1). В свою очередь, из соотношения (9) следует, что элементы на главной диагонали матрицы относительных летучестей всегда равны 1 и тогда матрица (8) принимает следующий вид:

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \dots & \alpha_{1n} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \dots & \alpha_{2n} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \dots & \alpha_{3n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \alpha_{n1} & \alpha_{n2} & \alpha_{n3} & \dots & 1 \end{pmatrix}. \quad (13)$$

Также из выражений (9)–(12) следует, что любая квадратная матрица относительных летучестей является сингулярной (вырожденной), т.к. ее определитель всегда равен нулю.

В общем случае число независимых относительных летучестей β на единицу меньше числа компонентов и равно

$$\beta = n - 1, \quad (14)$$

т.е. размерности концентрационного симплекса для рассматриваемой смеси. Это число намного меньше числа относительных летучестей, входящих в α -матрицу и равного n^2 .

Число независимых относительных летучестей, определяющее фазовое равновесие в любой точке концентрационного симплекса – это наименьшее число α_{ij} относительных летучестей, которые нельзя получить друг из друга, но из которых могут быть получены все остальные относительные летучести. Следует отметить, что для любой многокомпонентной смеси независимыми будут относительные летучести, образующие первую строку матрицы (13). Последнее можно проиллюстрировать на примере матрицы относительных летучестей для четырехкомпонентной смеси, которая имеет вид:

$$\begin{pmatrix} \alpha_{11} & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & \alpha_{33} & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & \alpha_{44} \end{pmatrix}.$$

Учитывая, что $\alpha_{11}=\alpha_{22}=\alpha_{33}=\alpha_{44}=1$, получим

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}.$$

Так как

$$\alpha_{21} = \frac{1}{\alpha_{12}}, \alpha_{31} = \frac{1}{\alpha_{13}}, \alpha_{41} = \frac{1}{\alpha_{14}},$$

$$\frac{\alpha_{13}}{\alpha_{12}} = \alpha_{23}, \frac{\alpha_{14}}{\alpha_{12}} = \alpha_{24}, \frac{\alpha_{14}}{\alpha_{13}} = \alpha_{34}$$

$$\frac{\alpha_{12}}{\alpha_{13}} = \alpha_{32}, \frac{\alpha_{12}}{\alpha_{14}} = \alpha_{42}, \frac{\alpha_{13}}{\alpha_{14}} = \alpha_{43}.$$

то матрица относительных летучестей для четырехкомпонентной смеси может быть записана в виде:

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \frac{1}{\alpha_{12}} & 1 & \frac{\alpha_{13}}{\alpha_{12}} & \frac{\alpha_{14}}{\alpha_{12}} \\ \frac{1}{\alpha_{13}} & \frac{\alpha_{12}}{\alpha_{13}} & 1 & \frac{\alpha_{14}}{\alpha_{13}} \\ \frac{1}{\alpha_{14}} & \frac{\alpha_{12}}{\alpha_{14}} & \frac{\alpha_{13}}{\alpha_{14}} & 1 \end{pmatrix}.$$

В табл. 2 приведены число независимых относительных летучестей (β), их общее число (n^2) для смесей, число компонентов (n) в которых меняется от двух до десяти.

Выделим в матрице относительных летучестей k произвольных строк и k произвольных столбцов. Тогда минором матрицы называется определитель k -го порядка, составленный из

элементов матрицы, расположенных на пересечении выделенных строк и столбцов [11]. Таким образом, минором первого порядка будет определитель, составленный путем пересечения одной строки и одного столбца, пересечение двух строк и двух столбцов даст минор второго порядка и т.д.

Таблица 2. Число независимых относительных летучестей в смесях с $n=2 \div 10$.

n	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n^2	4	9	16	25	36	49	64	81	100
β	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Минорами первого порядка будут сами элементы матрицы относительных летучестей. Например, в матрице относительных летучестей для четырехкомпонентной смеси выделим вторую строку и третий столбец, тогда получим минор первого порядка:

$$M_{23}^{(1)} = \begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix} \Rightarrow |\alpha_{23}|.$$

Если номера отмеченных строк совпадают с номерами отмеченных столбцов, то минор называется главным. Другими словами: главными минорами являются миноры, включающие элементы главной диагонали. Свойство матрицы относительных летучестей таково, что ее главные миноры первого порядка равны единице:

$$M_{ii}^{(1)} = 1. \quad (15)$$

Число главных миноров первого порядка матрицы относительных летучестей тогда будет равно числу компонентов рассматриваемой смеси или, соответственно, порядку этой матрицы:

$$N_{M_{ii}^{(1)}} = n. \quad (16)$$

Например, в матрице относительных летучестей для четырехкомпонентной смеси, выделяя вторую строку и второй столбец (их номера совпадают), получим главный минор первого порядка, равный единице:

$$M_{22}^{(1)} = \begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix} \Rightarrow |\alpha_{22}| = 1.$$

Минор любого порядка, выше первого и включающий в себя элементы главной диагонали матрицы относительных летучестей, равен нулю. Проиллюстрируем данное утверждение на примере вычисления миноров, включающих элементы главной диагонали, для матриц относительных летучестей трех- и четырехкомпонентных смесей.

Для матрицы относительных летучестей тройной смеси найдем минор второго порядка, полученный выделением 1 и 2 столбца и 2 и 3 строки и содержащий один элемент, равный единице, главной диагонали. После чего вычисляем полученный определитель стандартным методом, учитывая выражение (1):

$$M^{(2)} = \begin{vmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \alpha_{21} & 1 \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} \end{vmatrix} =$$

$$= \alpha_{21} \cdot \alpha_{32} - 1 \cdot \alpha_{31} = \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{K_3}{K_2} - \alpha_{31} =$$

$$= \frac{K_3}{K_1} - \alpha_{31} = \alpha_{31} - \alpha_{31} = 0$$

Для матрицы относительных летучестей четырехкомпонентной смеси:

$$M^{(3)} = \begin{vmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \end{vmatrix} = \alpha_{12} \begin{vmatrix} \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ 1 & \alpha_{34} \end{vmatrix} - \alpha_{13} \begin{vmatrix} 1 & \alpha_{24} \\ \alpha_{32} & \alpha_{34} \end{vmatrix} + \alpha_{14} \begin{vmatrix} 1 & \alpha_{23} \\ \alpha_{32} & 1 \end{vmatrix} =$$

$$= \alpha_{12}(\alpha_{23} \cdot \alpha_{34} - 1 \cdot \alpha_{24}) - \alpha_{13}(1 \cdot \alpha_{34} - \alpha_{24} \cdot \alpha_{32}) + \alpha_{14}(1 - \alpha_{23} \cdot \alpha_{32}) = \alpha_{12} \left(\frac{K_2}{K_3} \cdot \frac{K_3}{K_4} - \alpha_{24} \right) -$$

$$- \alpha_{13} \left(\alpha_{34} - \frac{K_2}{K_4} \cdot \frac{K_3}{K_2} \right) + \alpha_{14} \left(1 - \frac{K_2}{K_3} \cdot \frac{K_3}{K_2} \right) = \alpha_{12} \left(\frac{K_2}{K_4} - \alpha_{24} \right) - \alpha_{13} \left(\alpha_{34} - \frac{K_3}{K_4} \right) + \alpha_{14}(1 - 1) =$$

$$= \alpha_{12}(\alpha_{24} - \alpha_{24}) - \alpha_{13}(\alpha_{34} - \alpha_{34}) + \alpha_{14}(1 - 1) = 0$$

Количество миноров (C) определенного порядка k для матрицы размерности $A \times B$ вычисляется по формуле:

$$C_{A \times B}^{(k)} = \frac{A!B!}{(k!)^2(A-k)!(B-k)!}. \quad (17)$$

а) выделяя 2 и 3 столбцы, 1 и 2 строки, получим минор второго порядка, включающий единичный элемент главной диагонали:

$$M^{(2)} = \begin{vmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \alpha_{12} & \alpha_{13} \\ 1 & \alpha_{23} \end{vmatrix} =$$

$$\alpha_{12} \cdot \alpha_{23} - 1 \cdot \alpha_{13} = \frac{K_1}{K_2} \cdot \frac{K_2}{K_3} - \alpha_{13} =$$

$$\frac{K_1}{K_3} - \alpha_{13} = \alpha_{13} - \alpha_{13} = 0.$$

б) минор третьего порядка, содержащий уже два единичных элемента главной диагонали, получим, выделяя 1, 2, 3 строку и 2, 3, 4. Далее, учитывая соотношение (1), применяем разложение по 1 строке полученного определителя:

В табл. 3 приведено количество миноров разных порядков, вычисленных по формуле (17) для квадратной ($A=B$) матрицы относительных летучестей различной размерности, соответствующей смесям, содержащим от двух до десяти компонентов.

Таблица 3. Количество миноров разных порядков для матрицы относительной летучести различной размерности.

n	Порядок минора k									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	4	1								
3	9	9	1							
4	16	36	16	1						
5	25	100	100	25	1					
6	36	225	400	225	36	1				
7	49	441	1225	1225	441	49	1			
8	64	784	3136	4900	3136	784	64	1		
9	81	1296	7056	15876	15876	7056	1296	81	1	
10	100	2025	14400	44100	63504	44100	14400	2025	100	1

Из анализа данных, представленных в табл. 3, следует, что для любой матрицы относительных летучестей существуют миноры, порядок k которых изменяется в пределах $1 \leq k \leq n$.

(18)

Таким образом, минимальный порядок минора равен 1 ($k_{min}=1$), а максимальный порядок соответствует числу компонентов ($k_{max}=n$).

Также из табл. 3 видно, что для любой матрицы относительных летучестей количество ми-

норов первого (минимального) порядка вычисляется по простой формуле:

$$C^{(1)} = n^2. \quad (19)$$

а количество миноров максимального порядка всегда равно единице:

$$C^{(n)} = 1. \quad (20)$$

Рассмотрим для бинарной смеси матрицу относительных летучестей, которая с учетом допущений (9) и (10) имеет вид: $\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} \\ \alpha_{21} & 1 \end{pmatrix}$. В

случае наличия азеотропа, очевидно, что $\alpha_{12}=1$ (в силу соотношения (10) $\alpha_{21}=1$), тогда матрица относительных летучестей для азеотропной

бинарной смеси запишется в виде: $\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$, т.е. все ее элементы будут равны 1.

Таблица 4. Матрица относительных летучестей для трехкомпонентных смесей с одним бинарным азеотропом.

Компоненты, образующие азеотроп	Условие азеотропии	Вид матрицы относительных летучестей
1 и 2	$\alpha_{12}=\alpha_{21}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & 1 & \alpha_{13} \\ 1 & 1 & \alpha_{23} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 \end{pmatrix}$
1 и 3	$\alpha_{13}=\alpha_{31}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & 1 \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} \\ 1 & \alpha_{32} & 1 \end{pmatrix}$
2 и 3	$\alpha_{23}=\alpha_{32}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} \\ \alpha_{21} & 1 & 1 \\ \alpha_{31} & 1 & 1 \end{pmatrix}$

Если в трехкомпонентной смеси наблюдается тройной азеотроп, то $\alpha_{12}=\alpha_{13}=1$ (α -многообразие второй кратности), $\frac{\alpha_{13}}{\alpha_{12}} = \alpha_{23} = 1$ (из

соотношения (10) в свою очередь следует $\alpha_{12}=\alpha_{21}=1$, $\alpha_{13}=\alpha_{31}=1$ и $\alpha_{23}=\alpha_{32}=1$), тогда все элементы матрицы относительных летучестей

будут равны единице: $\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$.

Перейдем к рассмотрению трехкомпонентной смеси, для которой, учитывая соотношения (9), матрица относительных летучестей имеет

вид: $\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 \end{pmatrix}$. В табл. 4 представлен

вид матрицы относительных летучестей в зависимости от наличия азеотропа между тем или иным компонентом в тройной смеси. Как видно из табл. 4, возможны три случая единичных α -многообразий первой кратности, в каждом из которых появляются миноры второго

порядка вида $\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$. Назовем единичным минором k -го порядка минор, все элементы которого равны единице.

В четырехкомпонентных смесях уже возможно шесть случаев (по числу возможных бинарных азеотропов, образованных разными компонентами и порождаемых α -многообразиями первой кратности), когда в матрице относительных летучестей можно выделить

миноры второго порядка вида $\begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$.

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ 1 & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{12}=\alpha_{21}=1$$

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & 1 & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ 1 & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{13}=\alpha_{31}=1$$

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & 1 \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ 1 & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{14}=\alpha_{41}=1$$

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & 1 \\ \alpha_{21} & 1 & 1 & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & 1 & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{23}=\alpha_{32}=1$$

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & 1 \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & 1 & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{24}=\alpha_{42}=1$$

$$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & 1 \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & 1 \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

$$\alpha_{34}=\alpha_{43}=1$$

В случае единичных α -многообразий второй кратности в четырехкомпонентных смесях наблюдается тройной азеотроп, а в матрице

относительных летучестей можно выделить миноры третьего порядка вида $\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$ (табл. 5).

Таблица 5. Матрица относительных летучестей для четырехкомпонентных смесей с тройным азеотропом.

Компоненты, образующие азеотроп	Соотношения азеотропии	Вид матрицы относительных летучестей
1, 2, 3	$\alpha_{12}=\alpha_{21}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & \alpha_{14} \\ 1 & 1 & 1 & \alpha_{24} \\ 1 & 1 & 1 & \alpha_{34} \\ \alpha_{41} & \alpha_{42} & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$
	$\alpha_{13}=\alpha_{31}=1$	
	$\alpha_{23}=\alpha_{32}=1$	
1, 2, 4	$\alpha_{12}=\alpha_{21}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & 1 & \alpha_{13} & 1 \\ 1 & 1 & \alpha_{23} & 1 \\ \alpha_{31} & \alpha_{32} & 1 & \alpha_{34} \\ 1 & 1 & \alpha_{43} & 1 \end{pmatrix}$
	$\alpha_{14}=\alpha_{41}=1$	
	$\alpha_{24}=\alpha_{42}=1$	
1, 3, 4	$\alpha_{13}=\alpha_{31}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & 1 & 1 \\ \alpha_{21} & 1 & \alpha_{23} & \alpha_{24} \\ 1 & \alpha_{32} & 1 & 1 \\ 1 & \alpha_{42} & 1 & 1 \end{pmatrix}$
	$\alpha_{14}=\alpha_{41}=1$	
	$\alpha_{34}=\alpha_{43}=1$	
2, 3, 4	$\alpha_{23}=\alpha_{32}=1$	$\begin{pmatrix} 1 & \alpha_{12} & \alpha_{13} & \alpha_{14} \\ \alpha_{21} & 1 & 1 & 1 \\ \alpha_{31} & 1 & 1 & 1 \\ \alpha_{41} & 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$
	$\alpha_{24}=\alpha_{42}=1$	
	$\alpha_{34}=\alpha_{43}=1$	

Проведем краткий анализ и обобщим полученные результаты.

Любая многокомпонентная смесь может быть охарактеризована квадратной сингулярной матрицей относительных летучестей, для которой выполняются соотношения (9–12), при этом число независимых относительных летучестей на единицу меньше числа компонентов, составляющих ту или иную смесь.

Для любой матрицы относительных летучестей по формуле (17) может быть рассчитано количество миноров определенного порядка, причем главные миноры первого порядка равны единице, а их количество соответствует числу компонентов. Следует отметить, что минимальный порядок минора равен единице, а максимальный – количеству компонентов рассматриваемой смеси. Для матрицы относительных летучестей всегда существует лишь один минор максимального порядка.

В n -компонентной смеси могут присутствовать бинарные, тройные, четверные и другие азеотропы, т.е. азеотропы, содержащие разное число компонентов и порождающие α -многообразия различной кратности и размерности.

Бинарные азеотропы дают начало α -многообразиям первой кратности и размерности $n-2$, тройные – второй кратности (размерность $n-3$), четверные – третьей кратности с размерностью $n-4$. n -компонентный азеотроп будет соответствовать α -многообразию $(n-1)$ кратности и нулевой размерности.

Если в n -компонентной смеси присутствует бинарный азеотроп, то в матрице относительных летучестей для такой смеси появляются единичные миноры второго порядка, тройной азеотроп приводит к наличию миноров третьего порядка в матрице относительных летучестей и т.д. Обобщая, получим следующее правило: в n -компонентной смеси в случае наличия азеотропа, содержащего n компонентов, матрица относительных летучестей становится единичной, т.е. каждый ее элемент равен 1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №10-08-00785-а).

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

C – количество миноров; K – коэффициент равновесного распределения компонента между паром и жидкостью; M – минор; N – количество главных миноров первого порядка; P – парциальное давление компонента; P^0 – давление насыщенного пара компонента при температуре кипения раствора; T – температура кипения компонента; k – порядок минора; m – размерность единичного α -многообразия; n – число компонентов; x – концентрация компонента в жидкости; y – концентрация компонента в паре; α – относительная летучесть компонентов; ρ – кратность единичного α -многообразия; β – число независимых относительных летучестей.

СПИСОК ИНДЕКСОВ

1, 2, 3, i, j, n – номер компонента, номер строки/столбца

ЛИТЕРАТУРА:

1. Львов С.В. Некоторые вопросы ректификации бинарных и многокомпонентных смесей. – М.: Изд-во АН СССР, 1960. 168 с.
2. Жаров В.Т., Серафимов Л.А. Физико-химические основы дистилляции и ректификации. – М.: Химия, 1975. 240 с.
3. Бушина Д.И., Серафимов Л.А., Степанов В.Н. Складки на поверхности равновесных температур конденсации двухфазных многокомпонентных смесей, относящейся к паровой фазе // Вестник МИТХТ. 2008. Т. 3. № 2. С. 46–51.
4. Серафимов Л.А., Бушина Д.И. Складки на температурных поверхностях многокомпонентных гетерогенных систем жидкость–пар // Теорет. основы хим. технологии. 2008. Т. 32. № 3. С. 290–302.
5. Серафимов Л.А., Писаренко Ю.А., Усольцева О.О. О проявлении идеальности в неидеальных тройных смесях // Теорет. основы хим. технологии. 2009. Т. 43. № 4. С. 429–435.
6. Серафимов Л.А. Закономерности равновесия жидкость–пар в многокомпонентных двухфазных системах различной природы // Журн. физ. химии. 2010. Т. 84. № 10. С. 1–12.
7. Серафимов Л.А., Гольберг Ю.Е., Кива В.Н., Витман Т.А. Основные свойства единичных α -многообразий и их расположение в концентрационных пространствах // Сб. научных трудов Ивановского энергетического ин-та. Иваново–Владимир, 1972. Вып. 14. С. 166–179.
8. Писаренко Ю.А., Серафимов Л.А. Некоторые свойства векторных полей над жидкость–пар диаграмм многокомпонентных смесей // Ученые записки МИТХТ. 2003. № 8. С. 13–18.
9. Серафимов Л.А., Писаренко Ю.А. Единичные α -многообразия двухфазных многокомпонентных смесей // Теорет. основы хим. технологии. 2004. Т. 38. № 3. С. 261–267.
10. Кушнер Т.М., Тациевская Г.И., Серафимов Л.А. О взаимном расположении единичных K - и α -линий в тройных системах, содержащих один нелетучий компонент // Изв. ВУЗов. Химия и хим. технология. 1985. Т. 18. № 4. С. 583–586.
11. Апатенок Р.Ф., Маркина А.М., Попова Н.В., Хейнман В.Б. Элементы линейной алгебры. – Минск: Вышэйшая школа, 1977. 256 с.

ИЗОМНОГООБРАЗИЯ МИНИМАЛЬНОГО ФЛЕГМОВОГО ЧИСЛА ДЛЯ СЛУЧАЯ РЕКТИФИКАЦИИ СМЕСИ ХЛОРОФОРМ–БЕНЗОЛ–ТОЛУОЛ В РЕЖИМЕ ПЕРВОГО КЛАССА ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

К.Ю. Тархов, аспирант, Л.А. Серафимов, профессор,

А.М. Андреева, студент

кафедра Химии и технологии основного органического синтеза МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: kirill-tarkhov@yandex.ru

С использованием современных методов математического моделирования рассчитаны значения минимального флегмового числа для достаточно широкого диапазона исходных составов трехкомпонентной зеотропной смеси хлороформ–бензол–толуол, в которой отсутствуют единичные α -многообразия, для случая ректификации в режиме первого класса фракционирования. Получена диаграмма, на которой представлены вид, ход и положение изолиний минимального флегмового числа для выбранной смеси в указанных условиях. В ходе работы и проведенных расчетов были выявлены некоторые аналитические и геометрические особенности и закономерности.

Using modern methods of mathematical modeling the minimum reflux ratio values were calculated for the wide range of initial compositions for the zeotropic chloroform-benzene-toluene mixture in the absence of $\alpha=1$ manifolds and for the case of rectification in the mode of the first class fractionalization. The form, shape and location of minimum reflux ration lines are represented on the diagram for the considered mixture and conditions. Some analytical and graphical peculiarities and regularities were revealed in the course of the calculation.

Ключевые слова: компонент, концентрация, парожидкостное равновесие, секущая, коэффициенты Антуана, уравнение NRTL, параметры бинарного взаимодействия.

Key words: component, concentration, vapor-liquid equilibrium, secant, coefficients of Antoine's equation, NRTL equation, binary interaction parameters.

Одним из основных процессов разделения в промышленности основного органического и нефтехимического синтеза является ректификация, которая относится к группе методов, основанных на фазовых переходах первого рода. Использование методов этой группы чаще всего определяется фазовым состоянием разделяемых веществ. По классификации, предложенной В.С. Хайловым и Б.Б. Брандтом для методов этой группы, ректификация и ее различные виды применяются в случае разделения смесей жидких продуктов, а также газовых и парогазовых смесей. При этом следует отметить, что методы, основанные на фазовых переходах, можно разделить на два класса. К первому классу относятся методы, с помощью которых можно непосредственно разделять исходную смесь.

Ко второму классу относятся методы, для осуществления которых необходимо вводить в исходную смесь новые вещества, которые растворимы в смеси, подвергаемой разделению (экстрактивная или азеотропная ректификация), или образуют новую фазу (гетероазеотропная ректификация) [1].

Как и все методы разделения, ректификация основывается на определенных термодинамических свойствах компонентов и их смесей. Важную роль в данном случае играют законы о фазовом равновесии различного типа. Ректификация базируется на законах о фазовом равновесии системы жидкость–пар.

В табл. 1 представлены различные режимы, используемые для исследования процесса ректификации [2].

Таблица 1. Режимы обычной ректификации.

№	Число тарелок (высота колонны Н)	Флегмовое число R	Название режима
1	конечно	конечно	рабочий
2	∞	конечно ($R=R_{\text{MIN}}$)	минимального орошения
3	∞	конечно ($R>R_{\text{MIN}}$)	четкая ректификация
4	конечно	∞	полное орошение
5	∞	∞	четкое разделение

Рабочий режим – это реальная непрерывная ректификация, осуществляемая в промышленности в ректификационных установках определенной высоты при выбранном конечном значении флегмового числа.

Из перечисленных режимов все режимы, где число тарелок (высота колонны) равно бес-

конечности не реализуемы на практике, но имеют принципиальное значение для понимания процесса ректификации.

Для исследования процесса ректификации используются различные режимы, для каждого из которых характерно свое математическое описание и свои особенности, касающиеся

физико-химических, статических, гидродинамических, конструктивных и других самых различных факторов и параметров.

Например, режимы *четкого разделения* (режим бесконечной разделительной способности) и *четкой ректификации* имеют принципиальное значение для определения предельно возможного разделения многокомпонентной смеси в ректификационном аппарате и достижимости получения тех или иных фракций определенного состава.

В свою очередь *режим полного орошения* или *режим полной флегмы* (режим ректификации при бесконечной флегме в конечной колонне) является одним из предельных режимов, наиболее приближенных к рабочим условиям. Именно в режиме полной флегмы определяется минимальное число ступеней разделения, необходимое для достижения заданного разделения и широко используемое в практике расчетов. Определение минимального числа ступеней разделения, которое приближенно характеризует требуемые размеры ректификационного оборудования, имеет принципиальное значение при проектировании ректификационных установок.

Как видно из табл. 1, один из режимов носит название *режима минимальной флегмы* или *режима минимального орошения* (режим ректификации в бесконечных адиабатических колоннах при конечной флегме) и используется для нахождения нижнего предела энергетических затрат на осуществление процесса ректификации. Режим минимальной флегмы представляет большой практический интерес, поскольку наиболее экономичные реальные режимы ректификации по своим параметрам близки к режиму минимальной флегмы.

Следует отметить, что для бинарных смесей методика расчета минимального флегмового числа разработана достаточно полно, но для многокомпонентных смесей ситуация с расчетом данной величины обстоит намного сложнее.

На исторически начальном этапе исследования режима минимального орошения многокомпонентной ректификации все работы были связаны с уже изученными законами этого режима для бинарных смесей. Естественно, что применение уравнений, основанных на наиболее частом и простом случае ректификации бинарных смесей, для сложного процесса многокомпонентной ректификации необоснованно.

Существующие на данный момент программы моделирования ректификационных колонн плохо применимы к определению минимальной флегмы ввиду особенностей алгоритмов их работы. Они предполагают совместное решение систем уравнений материальных и тепловых балансов для каждой из тарелок колонны. Это приводит к необходимости предварительного

задания фиксированных чисел тарелок по секциям колонн. Поскольку режим минимальной флегмы характеризуется бесконечным числом тарелок в каждой секции, то при моделировании режимов, близких к минимальной флегме, исследователям приходится задавать достаточно много тарелок по секциям колонн. Это количество очень сложно определить заранее, что связано с особенностями парожидкостного равновесия каждой конкретной разделяющей смеси. Кроме того, в случае моделирования ректификации очень сильно неидеальных, а особенно азеотропных смесей, возникают большие трудности со сходимостью вычислений. Для таких смесей необходимо задать начальный профиль концентраций компонентов по колонне, заранее определить который также не представляется возможным без знания характера расположения траекторий ректификации в концентрационном пространстве [3].

Поэтому при использовании моделирующих систем исследователи не имеют реальной возможности приблизиться к режиму минимальной флегмы достаточно близко. Это приводит к существенному завышению затрат на разделение.

В то же время режим минимальной флегмы для неидеальных и азеотропных смесей изучен еще очень мало. Вследствие этого практически отсутствуют методы проектного расчета минимального флегмового числа для неидеальных и азеотропных смесей. Необходимость же в таких методах очевидна. Исследование реальных смесей имеет практическое значение, поскольку только небольшой процент промышленных смесей можно рассматривать как идеальные.

В настоящей статье не рассматриваются вопросы, связанные с различными методами, способами, методиками и процедурами расчета минимального флегмового числа, их развитие и эволюция применительно к смесям различной физико-химической природы, т.к. авторы данной статьи полагают, что этой проблеме должна быть посвящена отдельная работа. Но следует отметить, что этим вопросам продолжает уделяться пристальное внимание со стороны как отечественных, так и зарубежных исследователей, публикующих огромное количество статей, монографий, справочных пособий, посвященных теории ректификации.

Таким образом, расчет минимального флегмового числа можно проводить разными способами, отличающимися, например, своей обоснованностью и степенью сложности. Безусловно, наиболее привлекательными в этом отношении были бы простые и удобные методы, не отличающиеся громоздкостью математических формул и содержащие состоятельные предпосылки и допущения.

Один из таких методов как раз и рассматривается в данной работе, посвященной расчету

и определению минимального флегмового числа в случае ректификации трехкомпонентной зеотропной смеси в режиме первого класса фракционирования, который является промежуточным между режимами обратимой и адиабатической ректификации и характеризуется наименьшими затратами энергии на осуществлении процесса разделения по сравнению с обычным режимом.

Режим первого класса фракционирования на данный момент является мало изученным. В связи с этим для специалистов в области химической технологии огромный интерес представляет выявление некоторых особенностей, а также изучение и установление различных закономерностей этого режима для решения актуальной задачи, связанной с разработкой (проектированием и анализом) энергосберегающих ректификационных установок.

Проводя анализ уравнений Андервуда [4–7], Ширас [8] указал на трудности, связанные с тем, что на начальной стадии расчета неизвестно распределение компонентов между продуктами при минимальном орошении. Автор предложил на первом шаге принимать, что все компоненты распределены. Дальнейший расчет позволит выявить, что некоторые концентрации в продуктах отрицательны, что означает отсутствие данного компонента в продукте. Расчет в этом случае необходимо повторить, уже зная некоторые нераспределенные компоненты. Метод Шираса в дальнейшем широко применялся для определения распределения компонентов в режиме минимального орошения.

В той же работе [8] впервые было введено понятие классов фракционирования. Ширас предложил для удобства расчетов классифицировать разделение при минимальной флегме по формальному признаку – распределению компонентов. Таким образом, случай распределения всех компонентов получил название первого класса фракционирования (1 КФ), случай наличия нераспределенных компонентов – название второго класса (2 КФ), т.е. Ширас назвал первым классом фракционирования такое разделение, при котором все компоненты исходной смеси присутствуют и в дистилляте, и в кубовом продукте (рис. 1).

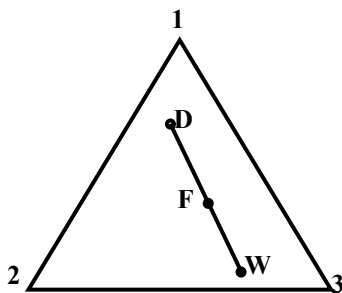


Рис. 1. Общий случай режима первого класса фракционирования.

При этом автором были сделаны следующие допущения, некоторые из которых являются новыми, а некоторые повторяют допущения, характерные для метода Андервуда (постоянство мольных потоков жидкости и пара в секциях колонны – *constant molar flows* – CMF).

В отличие от Андервуда, Ширас делает допущение об изменении (непостоянстве) относительных летучестей компонентов, которые могут принимать различные значения.

Как известно, при ректификации многокомпонентных смесей состав на тарелке питания, за исключением специальных случаев, никогда не равен составу исходной смеси [9]. Это связано с тем, что в общем случае траектория ректификации всегда расположена относительно прямой материального баланса по одну сторону от последней.

Из принятых Ширасом допущений также следует, что режим первого класса фракционирования является режимом ректификационного разделения, в котором состав на уровне питания всегда равен составу исходной смеси.

Так как режим первого класса фракционирования является еще мало изученным, то рассмотрим лишь некоторые аспекты и свойства данного режима.

Как известно, процесс ректификации является потенциально обратимым процессом. Это означает, что можно теоретически создать условия, в которых этот процесс будет обратимым.

В таком процессе на каждом уровне ректификационной колонны рабочая нода равна равновесной ноде и тепло, необходимое для организации такого процесса, подается дифференциально на каждый уровень исчерпывающей секции колонны и отбирается дифференциально на каждом уровне укрепляющей секции. Естественно, в этом случае количество тепла, необходимого для организации такого процесса, достигает минимума, а переход от каскада обратимого процесса к каскаду адиабатической ректификации с кипятильником и конденсатором приводит к возрастанию необходимого количества тепловой энергии даже при минимальном флегмовом числе.

Условие, приводящее к равенству состава исходной смеси составу на уровне питания, является необходимым условием обратимой ректификации. Подача на каждый уровень нижней (исчерпывающей) секции дифференциального количества тепла и отбор с каждого уровня в верхней (укрепляющей) секции также дифференциального количества тепла совместно с рассмотренным ранее условием создает необходимые и достаточные условия обратимой ректификации.

В случае первого класса фракционирования исключается достаточное условие дифференциального обмена энергией с окружающей

средой, но сохраняется необходимое условие, а именно: равенство вектора–ноды на уровне питания вектору–ноде, отвечающему исходной смеси. В силу этого набор переменных получает возможность соответствовать проектной задаче.

Как уже отмечалось выше, режим первого класса фракционирования является как бы промежуточным режимом при переходе от обратимой ректификации к адиабатической ректификации многокомпонентных смесей. При условии ректификации в адиабатической колонне непрерывного действия, работающей в стационарном режиме, режим первого класса фракционирования требует наименьших затрат энергии по сравнению с обычным режимом ректификации.

На данный момент известны три варианта расчета процесса непрерывной ректификации: проектный, проверочный и проектно-проверочный [10]. Каждому из вариантов присущ свой специфический набор независимых переменных, которые должны быть известны в начале расчета. В общем случае число независимых переменных определяется как разность между числом переменных и числом независимых уравнений, связывающих эти переменные. Необходимо отметить, что общее число независимых переменных остается постоянным при переходе от одного варианта расчета к другому.

Общее число независимых переменных (число степеней свободы φ) двухсекционной тарельчатой ректификационной колонны непрерывного действия было получено в работе [11] и определяется уравнением:

$$\varphi = n + 2N_1 + 2N_2 + 10, \quad (1)$$

где n – число компонентов исходной смеси; N_1 и N_2 – число ступеней разделения (тарелок) в укрепляющей и исчерпывающей секциях колонны, соответственно.

Уравнение (1) относится к процессу ректификации в отсутствие химических реакций, при условии полной конденсации паров в конденсаторе и дифференциальном испарении жидкости в кипятыльнике. Дистиллят, кубовый продукт и исходная смесь берутся при температуре кипения для данного давления. Исходная смесь подается в виде жидкости.

Для всех вариантов расчета независимыми переменными являются:

- состав исходной смеси, определяемый $(n-1)_F$ концентрацией компонентов;
- энергетическое состояние смеси, определяемое величиной энтальпии H^F ;
- общее количество исходной смеси F ;
- давление над ней P_F .

Таким образом, согласно работе [12], перед любым вариантом расчета необходимо задаться $(n-1+1+1+1)=(n+2)$ переменными, характеризующими только исходную смесь.

Кроме того должны быть известны сопротивления потоку паров на каждой тарелке, в кипятыльнике и в конденсаторе, что определяет давление на каждом уровне колонны. Если используется приближение, что на любом уровне давление одинаково и равно давлению над исходной смесью, то это равносильно заданию N_1+N_2+2 переменных, так же как и в случае различия давлений.

Также необходимо задаться потерями тепла в окружающую среду на уровне каждой ступени, в кипятыльнике и конденсаторе, что равносильно закреплению еще N_1+N_2+2 переменных. Это число остается неизменным, даже если потери в окружающую среду принимаются равными нулю, т.е. рассматривается адиабатический процесс.

В итоге перед расчетом должны быть известны $n+2N_1+2N_2+6$ переменных. При сравнении полученного результата с уравнением (1), нетрудно установить, что число оставшихся переменных равно четырем. Здесь как раз и различают три вышеупомянутых типа расчета: проектный, проверочный и проектно-проверочный.

В проектном варианте расчета должны быть заданы еще четыре переменные, а именно: концентрации одного компонента на трех уровнях (в дистилляте x_i^D , в кубовом продукте x_i^W и на тарелке питания x_i^{TP}) и коэффициент избытка флегмы σ . Задание концентрации компонента в дистилляте и в кубе определяет требования к качеству получаемых продуктов, при этом переменной в этом варианте расчета является концентрация компонента на тарелке питания. Проектная постановка задачи предусматривает определение минимального флегмового числа R_{min} . Учитывая, что $R=\sigma R_{min}$, таким образом, задается флегмовое число, величина которого будет не меньше минимального. После задания дополнительных четырех переменных число независимых параметров оказывается исчерпанным.

Проектный вариант расчета непрерывной ректификации бинарных смесей в отличие от многокомпонентных смесей не встречает особых затруднений, так как задание одной концентрации в материальном потоке полностью определяет состав на любом уровне колонны и именно поэтому расчет может быть начат с любого уровня колонны. Некоторая корректировка необходима для тарельчатой колоны только в силу дискретности задачи. Если же рассматривается насадочная колонна с дифференциальным изменением фаз по высоте, то корректировка не требуется. Здесь имеются те же четыре переменные, которые приведены выше.

Таким образом, проектная постановка зада-

чи решается без затруднений только для бинарных смесей. Вместе с тем на сегодня нет пока надежного и точного метода расчета минимального флегмового числа для многокомпонентных смесей, которое можно в принципе определить только итерационным методом. Дело в том, что для многокомпонентных смесей, начиная с трехкомпонентных, составы дистиллята и составы на уровне питания в ректификационной колонне неизвестны. Основная трудность, помимо бесконечной эффективности колонны, заключается в том, что в общем случае в колонне, даже при минимальном флегмовом числе, нет ни одного состава равного составу исходной смеси.

В связи с этим в случае многокомпонентных смесей проектный вариант расчета на практике не используется, а применяется **поверочный вариант**. Здесь также задаются вначале $2N_1+2N_2+4$ переменных, связанных с сопротивлениями вдоль колонны, потерями тепла (холода) в окружающую среду и $n+2$ переменных, определяющих состояние исходной смеси и ее количество. В этом случае после задания рабочего флегмового числа из трех оставшихся переменных обычно задают общее число ступеней разделения (общее число тарелок в колонне) – одна переменная, уровень поступления в колонну исходной смеси (номер тарелки питания) – одна переменная и соотношение количеств дистиллята и кубового продукта (или величину одного из отборов: количества дистиллята или кубового продукта). Здесь также общее число переменных оказывается исчерпанным и требуется итерационная процедура для расчета.

Таким образом, в случае поверочного расчета задаются конструктивные переменные: число ступеней, организация движения потоков и др., а составы дистиллята и кубового продукта после задания их общих потоков и флегмового числа рассчитываются.

Необходимо отметить, что поверочный вариант расчета соответствует пуску и функционированию реальной лабораторной или промышленной ректификационной колонны. Последнее понятно, т.к. результат разделения в этом случае определяется параметрами, которые являются независимыми переменными этого варианта расчета.

Для многокомпонентных смесей весьма перспективным является **проектно-поверочный расчет**, в котором заданными считаются суммарные примеси тяжелолетучих компонентов в дистилляте и легколетучих в кубе и флегмовое число. Определяется необходимое число тарелок при оптимальном положении тарелки питания. Проектно-поверочный вариант предусматривает определение части параметров ректификации по заданным требованиям к про-

дуктам разделения, другая часть представлена параметрами поверочного расчета. В этом случае входная информация включает число ступеней разделения по секциям и флегмовое число, а также некоторые требования к конечным продуктам разделения.

Таким образом, в случае проектно-поверочного расчета часть переменных закрепляется как в проектном (задание концентраций), отражая требования к конечным продуктам ректификации, а часть переменных как в поверочном расчете (задание флегмового числа). Однако в этом случае расчет часто не сходится. Одна из причин несходимости – задание флегмового числа меньше минимального, необходимого для достижения сечения концентрационного симплекса, соответствующего заданной концентрации одного из компонентов.

Для бинарных смесей проектно-поверочный вариант теряет смысл и, как правило, не используется.

В случае, когда рассматривается первый класс фракционирования, число независимых переменных остается таким же, что и для нормального адиабатического режима ректификации. Действительно состав исходной смеси определяется $n-1$ концентрацией, которому соответствует вполне определенный вектор-нода. Последний легко определяется, так как состояние исходной смеси позволяет рассчитать состав паровой фазы.

В общем случае вектор-нода уровня питания не равен вектору-ноде исходной смеси, поступающей на разделение. Этот вектор-ноду можно рассматривать как одну переменную. Если этот вектор-нода приравнивается к вектору-ноде исходной смеси, то, очевидно, что на единицу увеличивается число переменных и число уравнений, характеризующих коллинеарность рассматриваемых векторов. Следовательно, число независимых переменных остается неизменным.

Вместе с тем в случае первого класса фракционирования для любой многокомпонентной смеси решается задача в проектной постановке.

Как было сказано выше, впервые понятие классов фракционирования было введено Ширасом, который в одной из своих работ назвал первым классом фракционирования такое разделение, при котором все компоненты исходной смеси присутствуют и в дистилляте, и в кубовом продукте (рис. 1). Необходимо отметить, что использование концепции четкого разделения при бесконечном числе тарелок позволяет расширить теоретические возможности режима первого класса фракционирования, для которого в этом случае остается одно условие: вектор-нода, соответствующая исходной смеси, является направляющим вектором линии материального баланса.

В режиме первого класса фракционирования возможны три предельных случая: первый соответствует отсутствию в дистилляте тяжелолетучего компонента (рис. 2, линия I), второй – отсутствию в кубовом продукте легколетучего компонента (рис. 2, линия II), а третий объединяет в себе два вышеперечисленных условия (рис. 2, линия III).

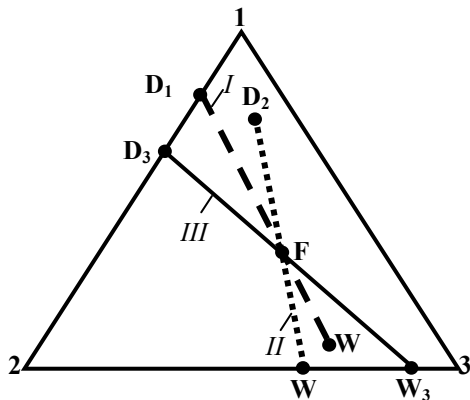


Рис. 2. Предельные случаи режима первого класса фракционирования для трехкомпонентной зеотропной смеси, в которой отсутствуют единичные α -многообразия.

(линия I – отсутствие в дистилляте тяжелолетучего компонента $x_3^D = 0$; линия II – отсутствие в кубовом продукте легколетучего компонента $x_1^W = 0$; линия III – объединенный случай $x_3^D = 0$ и $x_1^W = 0$)

Также для вышеупомянутых предельных случаев первого класса фракционирования, если состав исходной смеси не лежит на единичном α -многообразии, возможно использование следующих терминов и понятий, которые были введены для обычного процесса ректификации.

Случай, соответствующий линии III на рис. 2, можно назвать четким разделением – разделением, в котором в дистилляте отсутствует самый тяжелолетучий компонент, а в кубовом продукте – самый легколетучий. По обоим конечным продуктам это предельно возможные случаи режима первого класса фракционирования.

Если в дистилляте присутствуют все компоненты, а кубовый продукт содержит $(n-1)$ компонент, то такой режим будет получетким относительно дистиллята (рис. 2, линия II). Если же дистиллят содержит $(n-1)$ компонентов, а в кубовом продукте присутствуют все компоненты, то такой режим, в свою очередь, будет получетким относительно кубового продукта (рис. 2, линия I).

Таким образом, если состав исходной смеси не находится на единичном α -многообразии, в первом классе фракционирования возможны одно четкое и два получетких разделения.

Понятие первого класса фракционирования тесно связано с расчетом минимального флегмового числа, которое в общем случае опре-

деляется по формуле:

$$R_{MIN}^I = \frac{x_i^K - y_i^{TP}}{y_i^{TP} - x_i^{TP}}, \quad (2)$$

которая с учетом допущения о равенстве состава на тарелке питания составу исходной смеси принимает следующий вид:

$$R_{MIN}^I = \frac{x_i^K - y_i^F}{y_i^F - x_i^F}. \quad (3)$$

В свою очередь для рассматриваемой в данной работе трехкомпонентной зеотропной смеси использовалась следующая формула:

$$R_{min} = \frac{x_1^D - y_1^F}{y_1^F - x_1^F} = \frac{x_2^D - y_2^F}{y_2^F - x_2^F} = \frac{x_3^D - y_3^F}{y_3^F - x_3^F}. \quad (4)$$

Поэтому целью данной работы является расчет и построение изомногообразий минимального флегмового числа при ректификации смеси хлороформ–бензол–толуол в режиме первого класса фракционирования.

Из формулы (4) видно, что определение минимального флегмового числа можно проводить по любому компоненту. В данной работе все необходимые расчеты велись по первому компоненту (хлороформу).

Также из формулы (4) следует, что для расчета минимального флегмового числа в первом классе фракционирования должны быть известны значения трех величин, а именно: x_i^K – концентрация компонента в конечном продукте (например, дистилляте); x_i^F и y_i^F – концентрация того же компонента в исходной смеси в жидкой и паровой фазах, соответственно.

Таким образом, характерной особенностью расчета режима ректификации любой многокомпонентной смеси в режиме первого класса фракционирования является проектная постановка задачи.

Для определения концентрации первого компонента (хлороформа) исходной смеси в жидкой фазе использовался метод секущих и сечений. Следует отметить, что сечение проходит параллельно стороне концентрационного симплекса, не содержащей компонента i , а секущая – отрезок, который начинается в вершине концентрационного симплекса и оканчивается на противоположной по отношению к этой вершине стороне.

Для исследования было выбрано ЧЕТЫРЕ секущих с соответствующими отношениями концентраций компонентов 2 (бензола) и 3 (толуола):

$$\text{I секущая} - \frac{X_{\text{БЕНЗОЛ}}}{X_{\text{ТОЛУОЛ}}} = \frac{80}{20};$$

$$\text{II секущая} - \frac{X_{\text{БЕНЗОЛ}}}{X_{\text{ТОЛУОЛ}}} = \frac{60}{40};$$

$$\text{III секущая} - \frac{X_{\text{БЕНЗОЛ}}}{X_{\text{ТОЛУОЛ}}} = \frac{40}{60};$$

$$IV \text{ секущая} - \frac{X_{\text{БЕНЗОЛ}}}{X_{\text{ТОЛУОЛ}}} = \frac{20}{80},$$

а также ШЕСТЬ сечений, соответствующих концентрации первого компонента (хлороформа) в тройной смеси: 5%, 10%, 20%; 40%, 60%, 80%.

В результате было получено 24 точки составов исходной смеси, которые представлены в табл. 2, содержащей номер секущей, количество точек, находящихся на этой секущей, и полный состав исходной смеси (концентрации всех трех компонентов исходной смеси в жидкой фазе).

Следует отметить, что концентрация третьего компонента может быть найдена как из соответствующих пропорций, так и по условию нормировки:

$$\sum_{i=1}^3 x_i^F = 1$$

$$x_3^F = 1 - \sum_{i=1}^2 x_i^F \quad (5)$$

$$x_3^F = 1 - x_1^F - x_2^F.$$

Таблица 2. Концентрации компонентов исходной смеси в жидкой фазе.

Секущая	Точка	Состав исходной смеси, мол. %			Секущая	Точка	Состав исходной смеси, мол. %		
		x_1^F	x_2^F	x_3^F			x_1^F	x_2^F	x_3^F
I	1	5	76	19	III	3	5	38	57
	5	10	72	18		7	10	36	54
	9	20	64	16		11	20	32	48
	13	40	48	12		15	40	24	36
	17	60	32	8		19	60	16	24
	21	80	16	4		23	80	8	12
II	2	5	57	38	IV	4	5	19	76
	6	10	54	36		8	10	18	72
	10	20	48	32		12	20	16	64
	14	40	36	24		16	40	12	48
	18	60	24	16		20	60	8	32
	22	80	12	8		24	80	4	16

Следующим шагом был расчет содержания двух компонентов исходной смеси в паровой фазе по приведенным формулам:

$$y_1^F = \frac{x_1^F P_1^0 \gamma_1}{P_{\text{ОБЩ}}} \quad (6)$$

$$y_2^F = \frac{x_2^F P_2^0 \gamma_2}{P_{\text{ОБЩ}}} \quad (7)$$

Для нахождения концентрации какого-либо из компонентов исходной смеси в паровой фазе необходимо знать значения четырех величин: содержания этого компонента в жидкой фазе x_i^F , его давление насыщенного пара P_i^0 , коэффициент активности γ_i и общее давление $P_{\text{ОБЩ}}$. Концентрация третьего компонента, как и

в случае расчета для жидкой фазы, может быть найдена по условию нормировки.

Концентрации компонентов исходной смеси в жидкой фазе были определены на предыдущем этапе и приведены в таблице 2.

Процесс ректификации в основном проводится при постоянном общем, как правило атмосферном, давлении, поэтому принимается $P_{\text{ОБЩ}} = 760$ мм.рт.ст.

Для расчета давлений насыщенного пара компонентов использовалось уравнение Антуана [13, 14]. В табл. 3 приведены физико-химические свойства компонентов исходной смеси (название компонента, его брутто-формула, температура кипения в °C), а также коэффициенты уравнения Антуана.

Таблица 3. Физико-химические свойства компонентов исходной смеси.

Компонент	Брутто-формула	$T_{\text{кип}}, ^\circ\text{C}$	Коэффициенты уравнения Антуана		
			A	B	C
Хлороформ	CHCl_3	61.1	15.9732	2696.79	-46.16
Бензол	C_6H_6	80.1	15.9008	2788.51	-52.36
Толуол	C_7H_8	110.6	16.0137	3096.52	-53.67

Расчет коэффициентов активности компонентов проводился по уравнению NRTL, которое относится к группе моделей локального состава.

В табл. 4 приведены параметры уравнения NRTL для трех бинарных составляющих: хлороформ-бензол, бензол-толуол и хлороформ-толуол.

Таблица 4. Параметры уравнения NRTL для бинарных составляющих исходной тройной смеси.

Бинарная составляющая		Параметры уравнения NRTL		
i	j	B_{ij}	B_{ji}	α_{ij}
X	Б	-43.3286	-114.416	0.3062
Б	T	-226.405	308.991	0.3243
X	T	316.637	-293.688	0.2974

Таким образом, математическое моделирование парожидкостного равновесия в тройной системе хлороформ–бензол–толуол проводилось с учетом допущения об идеальности паровой фазы и неидеальности жидкой фазы, которая учитывалась с помощью введения коэффициентов активности, рассчитанных по уравнению NRTL.

В табл. 5 представлен полный состав исходной смеси (содержание трех компонентов в жидкой и паровой фазах) для всех первоначально выбранных по методу секущих и сечений точек составов рассматриваемой исходной смеси.

Последней неизвестной величиной в формуле (4) является содержание компонента в дистилляте, для определения которого были построены равновесные ноды жидкость–пар, число которых равно количеству первоначально выбранных по методу секущих и сечений точек исходных составов. Для построения использовались представленные в табл. 5 значения концентраций первого компонента в жидкой и паровой фазах.

В процессе ректификации в режиме первого класса фракционирования равновесные ноды жидкость–пар, соответствующие исходной смеси, являются направляющими векторами линий материального баланса, которые определяют составы конечных продуктов ректификации (дистиллята и кубового продукта) [15].

В общем случае в многокомпонентной зеотропной смеси продолжение любой ноды всегда пересекает грани, соответствующие бинарным составляющим, одна из которых примыкает к легколетучему компоненту и в ней отсутствует тяжелокопирующий компонент, а другая примыкает к тяжелолетучему компоненту и в ней отсутствует легкокопирующий компонент. Таким образом, линия материального баланса не пересекает ни одной вершины концентрационного треугольника, соответствующей чистому компоненту [16].

При ректификации в первом классе фракционирования невозможно получить чистые компоненты, при этом предельными составами дистиллята и кубового продукта являются составы, в которых концентрация самого тяжелолетучего компонента в дистилляте равна нулю, а в кубовом продукте равна нулю концентрация самого легколетучего компонента.

При увеличении концентрации первого компонента в смеси равновесные ноды жидкость–пар «поворачиваются», становясь параллельными стороне 1-3 (хлороформ–толуол). Общая закономерность расположения равновесных нод

распространяется на все ноды, в том числе на те, которые лежат в окрестности ребер концентрационного треугольника. В свою очередь, Сторонкиным для случая зеотропных трехкомпонентных смесей было показано, что в окрестности ребер концентрационного треугольника все ноды направлены параллельно этому ребру, находясь на бесконечно малом расстоянии от ребра (в этом случае линия материального баланса будет пересекать рассматриваемую сторону в точке, находящейся на бесконечно малом расстоянии от вершины).

Таблица 5. Концентрации компонентов исходной смеси в жидкой и паровой фазе.

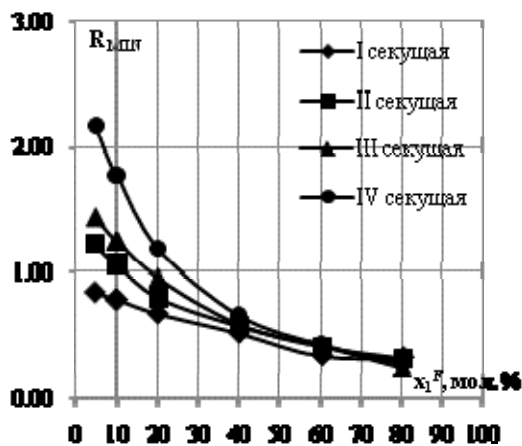
Секущая	Точка	Состав исходной смеси, мол. %					
		Жидкая фаза			Паровая фаза		
		x_1^F	x_2^F	x_3^F	y_1^F	y_2^F	y_3^F
I	1	5	76	19	7.9	83.6	8.5
	5	10	72	18	15.6	76.6	7.8
	9	20	64	16	30.4	63.2	6.4
	13	40	48	12	56.4	39.6	4.0
	17	60	32	8	76.3	21.4	2.3
	21	80	16	4	90.5	8.6	0.9
II	2	5	57	38	9.0	71.6	19.4
	6	10	54	36	17.7	64.7	17.6
	10	20	48	32	33.8	52.0	14.2
	14	40	36	24	60.2	31.2	8.6
	18	60	24	16	79.0	16.4	4.6
	22	80	12	8	91.7	6.5	1.8
III	3	5	38	57	10.7	55.7	33.6
	7	10	36	54	20.6	49.4	30.0
	11	20	32	48	38.1	38.4	23.5
	15	40	24	36	64.5	21.8	13.7
	19	60	16	24	81.8	11.1	7.1
	23	80	8	12	92.9	4.3	2.8
IV	4	5	19	76	13.2	33.4	53.4
	8	10	18	72	24.7	28.9	46.4
	12	20	16	64	43.7	21.4	34.9
	16	40	12	48	69.4	11.5	19.1
	20	60	8	32	84.7	5.6	9.7
	24	80	4	16	94.1	2.2	3.7

В табл. 6, помимо известной информации о полном составе исходной смеси (концентрации компонентов в жидкой и паровой фазах) содержатся сведения о составе дистиллята, определенном посредством построения равновесных нод жидкость–пар, а также рассчитанные по формуле (4) значения минимального флегмового числа для всех выбранных первоначально по методу секущих и сечений точек исходных составов.

Таблица 6. Значения минимального флегмового числа для различных составов исходной смеси.

Секущая	Точка	Состав исходной смеси, мол. %						Состав дистиллята,		R _{MIN}
		Жидкая фаза			Паровая фаза			мол. %		
		x_1^F	x_2^F	x_3^F	y_1^F	y_2^F	y_3^F	x_1^D	x_2^D	
I	1	5	76	19	7.9	83.6	8.5	10.0	90.0	0.85
	5	10	72	18	15.6	76.6	7.8	20.0	80.0	0.79
	9	20	64	16	30.4	63.2	6.4	37.5	62.5	0.68
	13	40	48	12	56.4	39.6	4.0	65.0	35.0	0.53
	17	60	32	8	76.3	21.4	2.3	82.0	18.0	0.35
	21	80	16	4	90.5	8.6	0.9	94.0	6.0	0.33
II	2	5	57	38	9.0	71.6	19.4	14.0	86.0	1.23
	6	10	54	36	17.7	64.7	17.6	26.0	74.0	1.07
	10	20	48	32	33.8	52.0	14.2	45.0	55.0	0.81
	14	40	36	24	60.2	31.2	8.6	72.0	28.0	0.58
	18	60	24	16	79.0	16.4	4.6	87.0	13.0	0.42
	22	80	12	8	91.7	6.5	1.8	95.5	4.5	0.33
III	3	5	38	57	10.7	55.7	33.6	19.0	81.0	1.45
	7	10	36	54	20.6	49.4	30.0	34.0	66.0	1.26
	11	20	32	48	38.1	38.4	23.5	55.5	44.5	0.96
	15	40	24	36	64.5	21.8	13.7	79.0	21.0	0.59
	19	60	16	24	81.8	11.1	7.1	91.0	9.0	0.42
	23	80	8	12	92.9	4.3	2.8	96.0	4.0	0.24
IV	4	5	19	76	13.2	33.4	53.4	31.0	69.0	2.19
	8	10	18	72	24.7	28.9	46.4	51.0	49.0	1.79
	12	20	16	64	43.7	21.4	34.9	72.0	28.0	1.20
	16	40	12	48	69.4	11.5	19.1	89.0	11.0	0.67
	20	60	8	32	84.7	5.6	9.7	95.5	4.5	0.44
	24	80	4	16	94.1	2.2	3.7	98.0	2.0	0.28

По результатам табл. 6 был построен график изменения значений минимального флегмового числа по секущим (рис. 3). По оси ординат откладывались полученные значения минимального флегмового числа, а по оси абсцисс – концентрация первого компонента (хлороформа) в исходной смеси, равная соответственно 5, 10, 20, 40, 60 и 80%.

Рис. 3. Графики изменения значений минимального флегмового числа $R_{\min}$ по секущим.

Для исследования хода изомногообразий минимального флегмового числа были также проведены расчеты данной величины в трех би-

нарных системах (хлороформ–бензол, хлороформ–толуол, бензол–толуол), составляющих исходную тройную смесь, по следующей формуле:

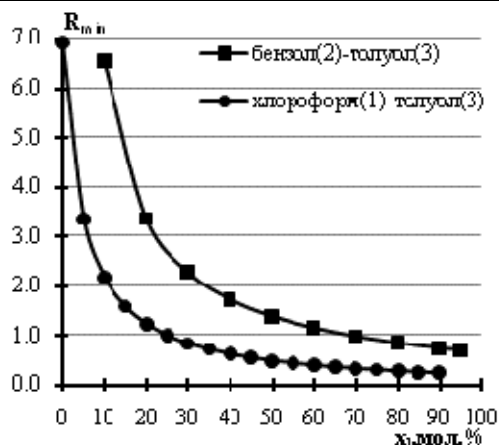
$$R_{\min} = \frac{x_1^D - y_1^F}{y_1^F - x_1^F}, \quad (6)$$

При этом индекс «1» относится к легколетучему компоненту в той или иной бинарной смеси. Для бинарных смесей хлороформ–толуол и бензол–толуол расчет по формуле (6) проводился с учетом допущения о равенстве единице состава дистиллята $x_1^D = 1$, которое обусловлено характерными геометрическими особенностями, рассмотренными ранее при построении равновесных нод жидкость–пар исходной смеси. Результаты расчетов представлены в табл. 7.

По табл. 7 были построены графики изменения значений рассчитанного по формуле (6) минимального флегмового числа в бинарных смесях хлороформ–толуол и бензол–толуол (рис. 4), при этом по оси ординат откладывались полученные значения минимального флегмового числа, а по оси абсцисс – концентрация соответствующего первого компонента (хлороформа или бензола) в исходной смеси.

Таблица 7. Расчет минимального флегмового числа в бинарных смесях хлороформ–толуол и бензол–толуол.

№	ХЛОРОФОРМ–ТОЛУОЛ			БЕНЗОЛ–ТОЛУОЛ		
	x_1^F , м.д.	y_1^F , м.д.	R_{MIN}	x_1^F , м.д.	y_1^F , м.д.	R_{MIN}
1	0.050	0.170	6.93	0.10	0.219	6.54
2	0.100	0.306	3.36	0.20	0.384	3.34
3	0.150	0.417	2.18	0.30	0.514	2.26
4	0.200	0.509	1.59	0.40	0.621	1.71
5	0.250	0.585	1.24	0.50	0.711	1.37
6	0.300	0.648	1.01	0.60	0.787	1.14
7	0.350	0.702	0.85	0.70	0.853	0.97
8	0.400	0.748	0.72	0.80	0.909	0.83
9	0.450	0.787	0.63	0.90	0.958	0.73
10	0.500	0.821	0.56	0.95	0.980	0.68
11	0.550	0.851	0.50			
12	0.600	0.877	0.45			
13	0.650	0.899	0.40			
14	0.700	0.919	0.37			
15	0.750	0.937	0.34			
16	0.800	0.952	0.31			
17	0.850	0.966	0.29			
18	0.900	0.979	0.27			
19	0.950	0.990	0.25			

Рис. 4. Графики изменения значений минимального флегмового числа R_{MIN} в бинарных смесях хлороформ–толуол и бензол–толуол.

Процедура расчета минимального флегмового числа по формуле (8) в бинарной смеси хлороформ–бензол была несколько другой и для ее проведения использовалась табл. 8, полученная с помощью некоторых преобразований из табл. 6.

По табл. 8 были построены графики, по оси ординат которых откладывались значения содержания первого компонента (хлороформа) в исходной смеси в паровой фазе y_1^F или в дистилляте x_1^D при том или ином постоянном значении концентрации данного компонента в исходной тройной смеси, т.е. 5, 10, 20, 40, 60, 80%, а по оси абсцисс откладывалась концентрация третьего компонента (толуола), определяемая соответствующей секущей, т.е. 20, 40, 60, 80%.

Таблица 8. Изменение содержания хлороформа в дистилляте и в паровой фазе по сечениям.

Сечение (x_1^F , мол.%)	Точка	y_1^F , мол.%	x_1^D , мол.%	Сечение (x_1^F , мол.%)	Точка	y_1^F , мол.%	x_1^D , мол.%
5	1	7.9	10.0	40	13	56.4	65.0
	2	9.0	14.0		14	60.2	72.0
	3	10.7	19.0		15	64.5	79.0
	4	13.2	31.0		16	69.4	89.0
	5	15.6	20.0		17	76.3	82.0
10	6	17.7	26.0	60	18	79.0	87.0
	7	20.6	34.0		19	81.8	91.0
	8	24.7	51.0		20	84.7	95.5
	9	30.4	37.5		21	90.5	94.0
20	10	33.8	45.0	80	22	91.7	95.5
	11	38.1	55.5		23	92.9	96.0
	12	43.7	72.0		24	94.1	98.0

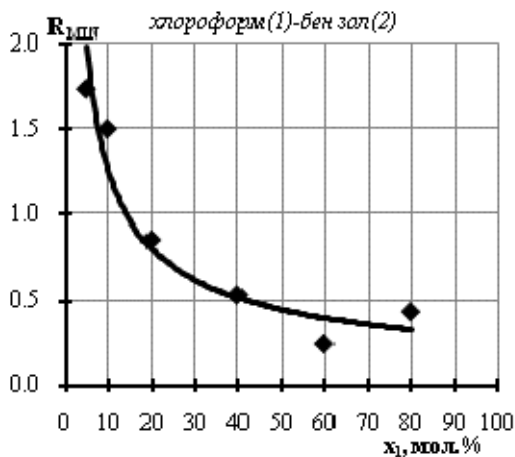
Далее была проведена аппроксимация полученных зависимостей с помощью полиномиальной линии тренда 2 степени, результаты ко-

торой, а также рассчитанные значения минимального флегмового числа в бинарной смеси хлороформ–бензол представлены в табл. 9.

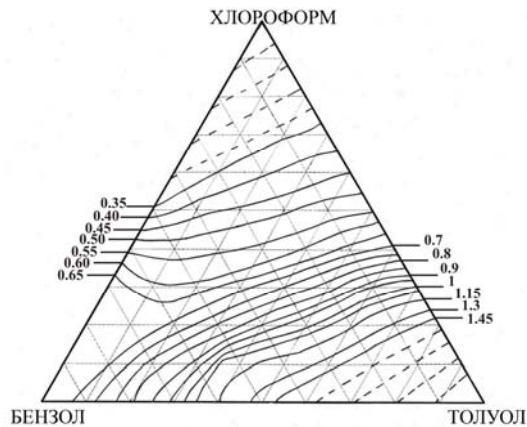
Таблица 9. Значения минимального флегмового числа в бинарной смеси хлороформ–бензол.

x_1^F , мол. %	y_1^F , мол. %	x_1^D , мол. %	$R_{\min}$
5	7.4	11.5	1.74
10	14.5	21.3	1.50
20	28.2	35.3	0.86
40	53.2	60.3	0.54
60	73.7	77.1	0.25
80	89.3	93.4	0.44

По табл. 9 был построен аппроксимированный график изменения значений рассчитанного по формуле (6) минимального флегмового числа в бинарной смеси хлороформ–бензол, при этом по оси ординат откладывались полученные значения минимального флегмового числа, а по оси абсцисс – концентрация хлороформа или бензола (рис. 5).

Рис. 5. График изменения значений минимального флегмового числа $R_{\min}$ в бинарной смеси хлороформ (1)–бензол (2).

В результате работы и проведенных расчетов была получена следующая диаграмма, на которой представлены вид, ход и положение изолиний минимального флегмового числа для диапазона значений 0.35–1.45 при ректификации трехкомпонентной азеотропной смеси хлороформ–бензол–толуол в режиме первого класса фракционирования (рис. 6).

Рис. 6. Диаграмма изомногообразий минимального флегмового числа $R_{\min}$ в первом классе фракционирования для смеси хлороформ–бензол–толуол.

Пунктирные линии на рис. 6 свидетельствуют о том, что никаких особенностей в ходе изолиний минимального флегмового числа в окрестности вершин, соответствующих чистым компонентам хлороформу и толуолу, выявлено не было. Также необходимо отметить следующее: ход изолиний минимального флегмового числа в окрестности вершины компонента 2 (бензола) позволяет утверждать, что точка, соответствующая чистому компоненту бензолу, является особой точкой типа «седло».

В данной работе рассмотрен случай, когда состав исходной азеотропной трехкомпонентной смеси не принадлежит единичному α -многообразию. Для дальнейших исследований особый интерес будут представлять случаи, когда исходный состав будет лежать на единичной α -линии. При этом следует отметить, что для трехкомпонентных азеотропных смесей, согласно данным работы [17], были выявлены и представлены 33 типа диаграмм единичных α -линий, отличающихся не только ходом этих многообразий, но и их числом, при этом на данный момент натурным экспериментом и моделированием фазового равновесия жидкость–пар с использованием уравнений локальных составов найдены и подтверждены 16 типов таких диаграмм [18].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №10-08-00785-а).

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

A, B, C – коэффициенты уравнения Антуана; D – дистиллят; F – исходная смесь; $P_{\text{общ}}$ – общее давление; P^0 – давление насыщенного пара компонента при температуре кипения раствора; N_1 и N_2 – число ступеней разделения (тарелок) в укрепляющей и исчерпывающей секциях колонны соответственно; R – флегмовое число; $R_{\min}$ – минимальное флегмовое число; W – кубовый продукт; n – число компонентов; x – концентрация компонента в жидкости; y – концентрация компонента в паре; φ – число степеней свободы.

СПИСОК ИНДЕКСОВ

D – дистиллят; F – исходная смесь; W – кубовый продукт; 1, 2, 3, i, j, n – номер компонента; K – конечный продукт; ТП – тарелка питания;

ЛИТЕРАТУРА:

1. Тимофеев В.С., Серафимов Л.А., Тимошенко А.В. Принципы технологии основного органического и нефтехимического синтеза. – М.: Высшая школа, 2010. 408 с.
2. Serafimov L.A., Timofeev V.S., Balashov M.I. Rectification of multicomponent mixtures. II. Local and general characteristics of the trajectories rectification processes at infinite reflux ratio // *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1973. V. 75. № 2. P. 193–211.
3. Данилов Р.Ю., Петлюк Ф.Б., Серафимов Л.А. Режим минимальной флегмы в простых ректификационных колоннах // *Теорет. основы хим. технологии*. 2007. Т. 41. № 4. С. 394–406.
4. Underwood A.J.V. Fractional distillation of ternary mixtures. Part I // *J. Inst. Petroleum*. 1945. V. 31. P. 111–118.
5. Underwood A.J.V. Fractional distillation of ternary mixtures. Part II // *J. Inst. Petroleum*. 1946. V. 32. P. 598–613.
6. Underwood A.J.V. Fractional distillation of ternary mixtures. Calculation of minimum reflux ratio // *J. Inst. Petroleum*. 1946. V. 32. P. 614–626.
7. Underwood A.J.V. Fractional distillation of multicomponent mixtures // *Chem. Eng. Prog.* 1948. V. 44. № 8. P. 603–614.
8. Shiras R.N., Hansen D.N., Gibson C.W. Calculation of minimum reflux in distillation columns // *Ind. Eng. Chem.* 1950. V. 42. № 5. P. 871–876.
9. Серафимов Л.А., Львов С.В. К вопросу о составе на тарелке питания при ректификации многокомпонентных смесей // *Химия и технол. топлив и масел*. 1961. № 11. С. 32–35.
10. Петлюк Ф.Б., Серафимов Л.А. Многокомпонентная ректификация: теория и расчет. – М.: Химия, 1983. 304 с.
11. Фролкова А.К., Хахин Л.А. К определению числа степеней свободы химико-технологических объектов (на примере ректификационной колонны) // *Хим. технология*. 2009. № 4. С. 237–245.
12. Фролкова А.К., Хахин Л.А. Энтропийная оценка ректификации бинарных смесей при различных вариантах расчета процесса // *Вестник МИТХТ*. 2008. Т. 3. № 2. С. 53–61.
13. Рид Р., Шервуд Т. Свойства газов и жидкостей: пер. с англ. – Л.: Химия, 1971. 704 с.
14. Морачевский А.Г., Смирнова Н.А., Пиотровская Е.М., Балашова И.М. Термодинамика равновесия жидкость–пар. – Л.: Химия, 1989. 344 с.
15. Писаренко Ю.А., Серафимов Л.А. Некоторые свойства векторных полей над жидкость–пар диаграмм многокомпонентных смесей // *Ученые записки МИТХТ*. 2003. № 8. С. 13–18.
16. Серафимов Л.А., Писаренко Ю.А. Единичные α -многообразия двухфазных многокомпонентных смесей // *Теорет. основы хим. технологии*. 2004. Т. 38. № 3. С. 261–267.
17. Жванецкий И.Б., Решетов С.А., Слученков В.Ю. Классификация областей К-упорядоченности на диаграмме дистилляционных линий тройной зеотропной системы // *Журн. физ. химии*. 1988. Т. 62. № 7. С. 1944–1947.
18. Решетов С.А., Кравченко С.В. Статистика диаграмм фазового равновесия жидкость–пар трехкомпонентных зеотропных смесей различных видов // *Теорет. основы хим. технологии*. 2007. Т. 41. № 4. С. 476–478.

Вестник МИТХТ

Журнал выходит один раз в два месяца и публикует обзоры и статьи по актуальным проблемам химической технологии и смежных наук. Журнал основан в 2006 году. Учредителем журнала является Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова (МИТХТ).

Журнал входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора (кандидата) наук.

• К публикации принимаются материалы, содержащие результаты оригинальных исследований, в виде полных статей, кратких сообщений, а также авторские обзоры и прогнозно-аналитические статьи по актуальным вопросам химической науки, в том числе по:

1. Теоретическим основам химической технологии
2. Химии и технологии органических веществ
3. Химии и технологии лекарственных препаратов и биологически активных соединений
4. Синтезу и переработке полимеров и композитов на их основе
5. Химии и технологии неорганических материалов
6. Химии и технологии редких и рассеянных элементов
7. Математическим методам и информационным технологиям в химии и химической технологии
8. Эколого-экономическим проблемам химических технологий.

- С правилами для авторов можно ознакомиться по адресу: www.mitht.ru
 - Электронная версия журнала выходит с февраля 2006 г.
 - Хорошо подготовленные статьи выходят в свет не более чем через 4 месяца после поступления в редакцию.
 - Плата за публикации, в том числе с аспирантов не взимается.
-

Журнал в розничную продажу не поступает. Он распространяется на территории Российской Федерации и стран СНГ по каталогу агентства «Роспечать», индекс **36924**. Подписка на журнал принимается в любом почтовом отделении.