

## ВЛИЯНИЕ МЕХАНОАКТИВАЦИИ НА СОСТАВ, СТРУКТУРУ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРЕАТИНА И КРЕАТИНИНА

<sup>1</sup>АКСЕНОВА В. В., <sup>1</sup>КАНУННИКОВА О. М., <sup>2</sup>КАРБАНЬ О. В., <sup>1</sup>СУСЛОВ А. А.,  
<sup>1</sup>ЛАДЬЯНОВ В. И., <sup>3</sup>ТУКМАЧЕВА К. А., <sup>3</sup>ЧУЧКОВА Н. Н., <sup>3</sup>СМЕТАНИНА М. В.

<sup>1</sup>Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, 426034, г. Ижевск, ул. Т. Барамзиной, 34

<sup>2</sup>Ижевская государственная сельскохозяйственная академия, 426069, г. Ижевск, ул. Студенческая, 11

<sup>3</sup>Ижевская государственная медицинская академия, 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

**АННОТАЦИЯ.** Исследовано влияние механоактивации в шаровой планетарной мельнице на структуру, физико-химические свойства и биологическую активность креатина и креатинина. В результате механоактивации наблюдается диспергирование, и размеры частиц порошков уменьшаются до нескольких сотен нанометров. При этом тип кристаллической решетки креатина и креатинина не изменяется. Наблюдаются изменения параметров решетки. При малых временах механоактивации размеры кристаллитов уменьшаются, а при увеличении длительности механоактивации – возрастают. Анализ рентгеноэлектронных и NEXAFS спектров позволяет предположить, что механоактивация приводит к циклизации креатина в поверхностных слоях частиц порошка с образованием креатинина. Поэтому величины рН, электропроводности, коэффициента преломления и термических коэффициентов объемного расширения водных растворов механоактивированного креатина отличаются от таковых для растворов исходного креатина. При механоактивации креатинина происходит таутомерное превращение – атом водорода NH-группы кольца переходит к атому кислорода С=О группы с образованием гидроксильной группы. Формируется двойная связь N=C, что приводит к росту коэффициента преломления водных растворов. Изменение зарядовых состояний атомов азота и кислорода приводит к изменению электропроводности водных растворов. Изменяется гидрофобность молекулы креатинина, проявляющаяся в изменении термического коэффициента объемного расширения. Отмечается, что активность клеток крови и эпителиоцитов в растворах механоактивированных креатина и креатинина выше, чем в растворах исходных веществ. Причиной изменения биологических свойств креатина является изменение природы функциональных азот- и кислородсодержащих групп креатинина. Повышение активности креатина после механоактивации связано со стерическими изменениями в структуре молекулы, которые сохраняются в водном растворе, а также с частичной циклизацией креатина и образованием креатинина.

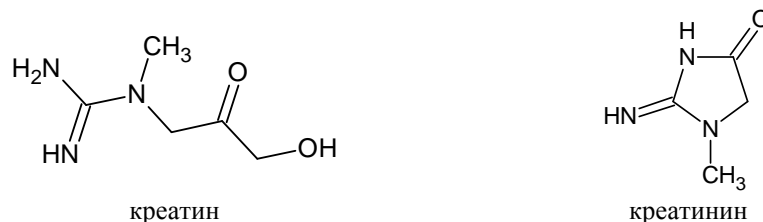
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** креатин, креатинин, механоактивация, структура, водные растворы.

## ВВЕДЕНИЕ

Идея о наличии связи между химической структурой органических соединений и биологической активностью была впервые высказана еще в 1869 г. [1]. Однако, несмотря на большое число исследований в этой области, выявленные закономерности не позволяют заранее прогнозировать взаимосвязь между фармакологической активностью и стереохимией молекул органических соединений. Данная работа является частью наших исследований по изучению влияния деформационных воздействий на структурное состояние азотсодержащих гетероциклических соединений и выявлению связи между их структурным состоянием и биологическими свойствами.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись креатин и его циклическое производное – креатинин:



Механоактивация проводилась в шаровой планетарной мельнице АГО-2С (600 об/мин) в среде аргона в течение 10 мин.

Элементный анализ полученных образцов проводился методом эмиссионной спектроскопии с атомизацией в плазме аргона на спектрометре Spectroflame.

Размеры и форма частиц порошков исследованы методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на микроскопе ИНТЕГРА-ПРИМА (ЗАО ИТ-МДТ, Зеленоград).

Инфракрасные (ИК) спектры получены на ИК Фурье спектрометре ФСМ 1202.

Исследования методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе Diamond DSC (PerkinElmer) в корундовых тиглях со скоростью 10 К/мин в проточной атмосфере аргона.

Рентгенофазовый анализ (РФА) порошков проводился на дифрактометре Bruker D8 Advance с использованием монокроматизированного  $\text{CuK}\alpha$ -излучения. Обработка дифракционных данных и уточнение структуры методом Ритвельда проведены с использованием программного комплекса TOPAS 4.2 в варианте WPPF (whole-powder pattern fitting). Инструментальный вклад в профиль дифракционных линий учитывали с использованием эталона  $\text{MgO}$ .

NEXAFS спектры получены с использованием оборудования Российско-Германского канала Берлинского центра синхротронного излучения BESSY II (Берлин, Германия).

NEXAFS К-края углерода и азота получены в режиме регистрации полного электронного выхода внешнего рентгеновского фотоэффекта. В процессе измерения образец располагался под углом  $\sim 55^\circ$  к падающему пучку монокроматического излучения. Размер фокусного пятна составлял примерно  $0,2 \times 0,1$  мм. Энергетическое разрешение монохроматора в области К-края поглощения углерода ( $\sim 285$  эВ) и азота ( $\sim 400$  эВ) составляло  $\sim 70$  мэВ. Для калибровки использовался К-край углерода высокоориентированного пиролитического графита ( $E = 285,35$  эВ).

Константы гидрофобности креатина и креатинина рассчитывались по методу Ханша [2].

Истинную плотность порошков креатина и креатинина определяли пикнометрическим методом. В качестве вспомогательной жидкости использовали н-гептан. Капиллярную вязкость водных растворов измеряли с использованием вискозиметров ВПЖ-2 ( $d = 0,34$  мм).

Оценка биологической активности водных растворов механоактивированных креатина и креатинина проведена методом микроэлектрофореза на приборе ЦитоЭксперт.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Креатин.** Камневидные частицы исходного порошка креатина имеют микронные размеры. После 1 ч механоактивации порошок креатина состоит из агрегатов частиц размером от 300 до 2 мкм. Размеры агрегатов 1 – 5 мкм. Средний размер частиц составляет 1,1 мкм. Агрегаты слабо связаны и разрушаются под воздействием иглы кантилевера при сканировании. Средний размер частиц 330 нм. Частицы шарообразные, размером порядка 25 нм (рис. 1). При увеличении времени механоактивации до 6 ч начинаются процессы агрегирования, приводящие к уплотнению агрегатов.

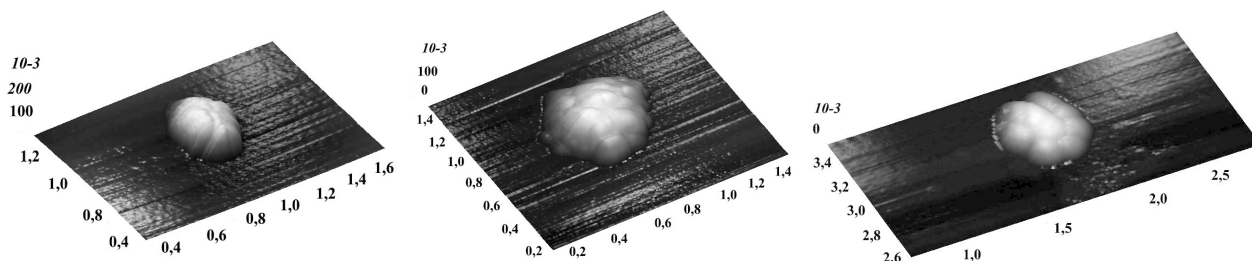


Рис. 1. АСМ изображения частиц исходного и механоактивированного креатина

Дифрактограммы, полученные в данной работе, приведены на рис. 2. Видно, что тип кристаллической структуры креатина после механоактивации не изменяется, однако меняются основные параметры элементарной ячейки (о чем свидетельствует смещение дифракционных пиков). Уширение дифракционных пиков и снижение их интенсивности свидетельствуют об уменьшении размеров кристаллитов и росте уровня микроискажений решетки.

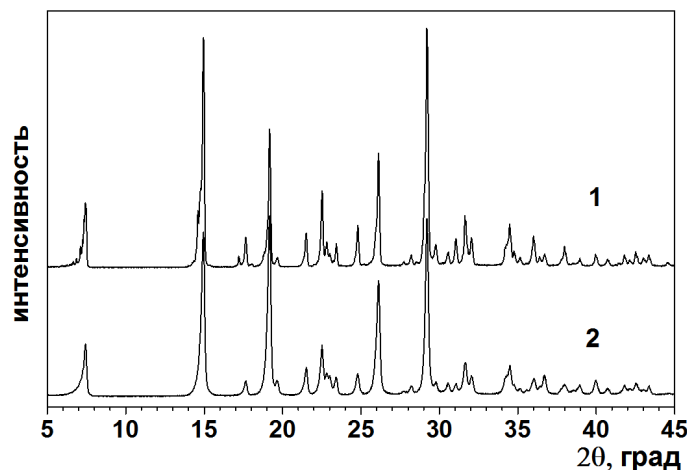


Рис. 2. Рентгеновские дифрактограммы креатина в исходном состоянии (1) и после механоактивации 6 ч (2)

Дифрактограммы свидетельствуют о том, что в исходном состоянии и после деформационных воздействий исследованные образцы представляли собой моногидрат креатина. Пространственная группа симметрии не изменяется в результате воздействий. После механоактивации 1 – 6 ч размер кристаллитов существенно снижается, а после 12 ч механоактивации наблюдается увеличение размеров кристаллитов. Уровень микронапряжений через 1 ч механоактивации увеличился почти в 1,5 раза по сравнению с исходным состоянием. При этом параметр решетки  $a$  уменьшился, параметр  $b$  увеличился (табл. 1). Увеличение времени механоактивации до 6 ч не привело к заметным изменениям параметров решетки и уровня микроискажений. Через 12 ч механоактивации уровень микроискажений увеличился более чем в 2 раза по сравнению с исходным образцом, угол  $\beta$  вырос. При этом существенно увеличились параметры решетки  $a$ ,  $b$ ,  $c$ .

Таблица 1

Параметры структуры исходного и механоактивированного креатина

Образец креатина	Размер кристаллитов, нм	Уровень микроискажений, $\langle \varepsilon^2 \rangle^{1/2}$ , %	Параметры решетки	Истинная плотность порошков, $\pm 0,002$ г/см <sup>3</sup>
Исходный	$452,0 \pm 50,1$	$0,32 \pm 0,01$	$a = 12,5132 \pm 0,0012 \text{ \AA}$ $b = 5,0483 \pm 0,0005 \text{ \AA}$ $c = 12,1694 \pm 0,0007 \text{ \AA}$ $\beta = 108,8764 \pm 0,0064^\circ$	1,398
МА 1 ч	$160,1 \pm 5$	$0,49 \pm 0,01$	$a = 12,5122 \pm 0,0010 \text{ \AA}$ $b = 5,0497 \pm 0,0004 \text{ \AA}$ $c = 12,1691 \pm 0,0008 \text{ \AA}$ $\beta = 108,8771 \pm 0,0058^\circ$	1,424
МА 6 ч	$106,2 \pm 2,8$	$0,43 \pm 0,01$	$a = 12,5116 \pm 0,0011 \text{ \AA}$ $b = 5,0482 \pm 0,0004 \text{ \AA}$ $c = 12,1659 \pm 0,0009 \text{ \AA}$ $\beta = 108,8798 \pm 0,0063^\circ$	1,423
МА 12 ч	$175,2 \pm 8,1$	$0,74 \pm 0,01$	$a = 12,5388 \pm 0,0014 \text{ \AA}$ $b = 5,0599 \pm 0,0005 \text{ \AA}$ $c = 12,1980 \pm 0,0010 \text{ \AA}$ $\beta = 108,8688 \pm 0,0074^\circ$	1,423

Истинная плотность механоактивированных порошков выше плотности исходного порошка (на  $\sim 2\%$ ), но не зависит от времени механоактивации и изменений параметров решетки механоактивированных порошков. Изменение размеров микрокристаллитов и уровня микроискажений не оказали влияния на истинную плотность порошков механоактивированного креатина: истинная плотность порошков после механоактивации увеличилась примерно на  $2\%$  после механоактивации в течение 1 ч и с дальнейшим увеличением длительности механоактивации не изменилась (см. далее табл. 2).

ИК-спектр моногидрата креатина в таблетке с KBr представлен на рис. 3. Широкая и интенсивная полоса между  $3500$  и  $3000\text{ см}^{-1}$  относится к валентным колебаниям N-H и O-H связей, в том числе и кристаллогидратной воды [3]. Полосы в области  $2750 - 2950\text{ см}^{-1}$  относятся к валентным колебаниям C-H метильной и метиленовой групп, интенсивная полоса между  $1600$  и  $1700\text{ см}^{-1}$  – к валентным колебаниям C=O связи карбоксильной группы и деформационным колебаниям C-N и N-H связей. Полосы при  $\sim 600$  и  $\sim 640\text{ см}^{-1}$  приписываются к деформационным колебаниям C=O и C=O-N групп соответственно [3].

На рис. 3 представлены ИК-спектры исходного и механоактивированного креатина. Анализ спектров свидетельствует, что как исходный, так и механоактивированный порошки представляли собой моногидрат креатина.

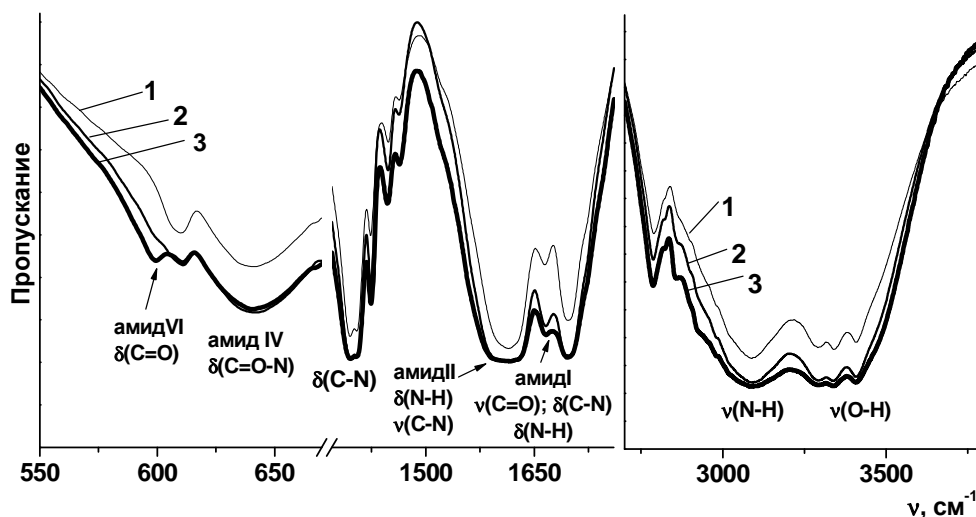


Рис. 3. ИК-спектры креатина: исходный (1), после 3 ч механоактивации (2) и после 6 ч механоактивации (3)

После механоактивации в течение 6 ч очевидны стерические изменения молекулярной структуры креатина, затрагивающие N-H и C-N группы. Наиболее чувствительны к ближайшему окружению группы в кристалле низкочастотные колебания, поэтому изменения углов и длин химических связей проявляются:  $\sim 600\text{ см}^{-1}$  в области веерных колебаний  $\delta(\text{N-H})$ ;  $\sim 1460\text{ см}^{-1}$  в области валентных колебаний  $\nu(\text{C-N})$  и  $1600 - 1700\text{ см}^{-1}$  в области деформационных колебаний  $\delta(\text{N-H})$ .

Стерические изменения структуры молекул креатина после механоактивации (1÷6 ч) приводят к изменению истинной плотности (повышение на  $\sim 2\%$ ), растворимости (повышение на  $\sim 5\%$ ) (табл. 2) и структурно-чувствительных характеристик свежеприготовленных водных растворов (относительной вязкости и термического коэффициента объемного расширения) (см. далее табл. 3, 4).

Анализ ИК-спектров позволяет предположить, что при механоактивации происходит изменение стерического положения азотсодержащей части молекулы. В результате молекула становится «более компактной» (уменьшается истинная плотность) и увеличивается площадь гидратации в водных растворах (растет вязкость и уменьшается коэффициент расширения).

На рис. 4 приведены NEXAFS спектры исходного и механоактивированного креатина. Для сравнения приведены NEXAFS спектры креатинина (рис. 5).

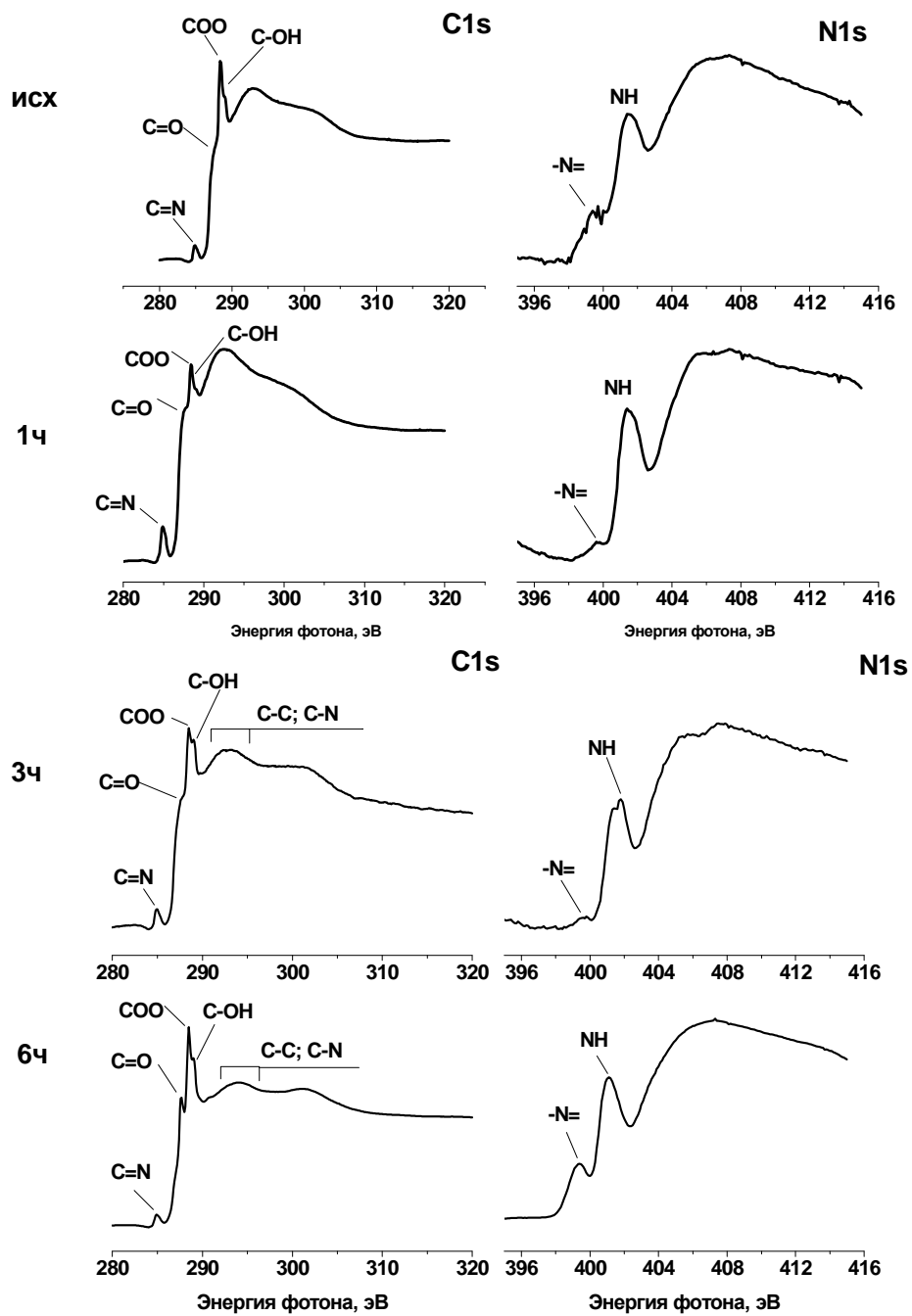


Рис. 4. NEXAFS спектры исходного и механоактивированного креатина

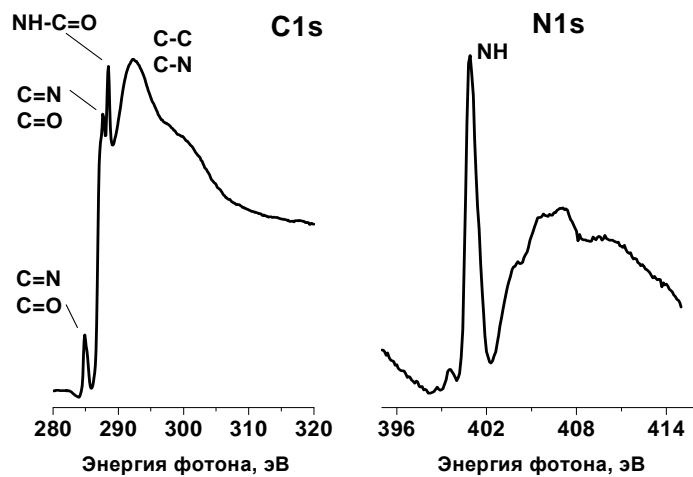


Рис. 5. NEXAFS спектры исходного креатинина

На начальных стадиях механоактивации происходят изменения углов и длин химических связей молекулы креатина. К 6 ч механоактивации происходит частичная циклизация креатина в креатинин с депротонированным азотом. Изменение структуры молекулы и электронной структуры атома азота приводит к изменению гидрофобности молекулы в целом. Гидрофобность исходной молекулы креатина равна

$$f(\text{CH}_2) + f(-\text{N}^{\leftarrow}) + f(\text{NH}) + f(\text{OH}) + f(\text{C}=\text{O}) + f(\text{NH}_2) + f(\text{CH}_3) = \\ = 0,66 + (-2,18) + (-2,15) + (-1,2) + (-2) + (-1,82) + 0,8 = (-7,89).$$

Гидрофобность депротонированной молекулы креатинина, рассчитанная аналогичным образом, равна (-6,21).

Растворимость механоактивированного креатина несколько увеличивается, при этом изменяются физико-химические свойства (рН, электропроводность и коэффициент преломления) водных растворов (табл. 2).

Таблица 2

**Растворимость порошков креатина и креатинина  
и физико-химические свойства водных растворов креатина**

Обработка креатин	Растворимость в дист. воде, г/100 г H <sub>2</sub> O (рН=6,2)	Водные растворы (1,3 вес.%)		
		рН	Электропроводность, См·м <sup>-1</sup>	Коэффициент преломления
Исходный	1,539	6,36	26,5	1,49
МА 1 ч	1,752	6,36	27,5	1,50
МА 3 ч	1,758	6,48	25,0	1,50
МА 6 ч	1,766	6,56	26,2	1,52
МА 12 ч	1,770	6,85	32,0	1,53
Креатинин исходный	9,150	7,75	121,0	1,53

Таблица 3

**Термический коэффициент объемного расширения  
водных растворов креатина ( $\beta \cdot 10^{-3}$ , 25-35 °С)**

Обработка креатина	Концентрация креатина в растворе, вес.%				
	0,05	0,2	0,4	0,8	1,3
Исходный	1,8	2,4	2,4	2,1	1,5
30 мин МА	2,7	2,7	2,7	3,3	2,7
1 ч МА	2,4	2,2	3,0	3,5	2,9
3 ч МА	2,5	2,1	3,0	3,9	1,5
6 ч МА	1,8	1,8	2,1	2,4	2,7

Таблица 4

**Относительная вязкость водных растворов креатина**

Температура, °С	Концентрация растворов, вес.%				
	0,05	0,1	0,4	0,8	1,3
	Исходный				
25	0,8811	0,8829	0,8875	0,9021	0,9174
35	0,7282	0,7284	0,7306	0,7502	0,7575
	30 мин МА				
25	0,8802	0,9114	0,9129	0,9145	0,9331
35	0,7158	0,7345	0,7391	0,7407	0,7500
	1 ч МА				
25	0,9056	0,9121	0,9128	0,9238	0,9352
35	0,7249	0,7277	0,7321	0,7355	0,7438
	3 ч МА				
25	0,9039	0,9055	0,9121	0,9296	0,9331
35	0,7176	0,7321	0,7356	0,7563	0,7578
	6 ч МА				
25	0,9021	0,9051	0,9145	0,9207	0,9238
35 °С	0,7096	0,7251	0,7282	0,7298	0,7438

Измерения рН, электропроводности и коэффициента преломления проводили на растворах, приготовленных непосредственно перед экспериментом, т.к. в водных растворах креатин нестабилен и превращается в креатинин [4].

Механоактивация в течение 3 ч приводит к повышению рН, коэффициента преломления и электропроводности растворов креатина. Этот эффект можно связать с циклизацией молекулы креатина и формированием креатинина.

Основной причиной превращений молекулы креатина при механоактивации, по-видимому, является нагрев образцов в процессе механоактивации. В [5] проведены исследования креатина методом ДСК и показано, что нагрев более 100 °С приводит к дегидратации молекулы креатина, а при более высоких температурах (более 200 °С) молекулы воды отщепляется от молекулы креатина с образованием молекулы креатинина.

**Креатинин.** Форма частиц механоактивированного креатинина похожа на частицы оротата магния [6]. После 1 ч механоактивации частицы креатинина уменьшились до 100 – 200 нм. Размеры кристаллитов в частицах составляют порядка 40 нм. Частицы формируют слабо связанные агрегаты размером до 5 мкм. После 3 ч механоактивации агрегаты приобретают слоистую структуру, с толщиной слоев порядка 70 – 180 нм. Средний размер частиц 160 нм. С увеличением времени механоактивации до 6 ч процесс агрегации частиц порошка доминирует над процессом диспергирования. Частицы размером от 300 до 1000 нм упакованы в плотные слоистые агрегаты размером порядка 1 – 2 мкм (рис. 6).

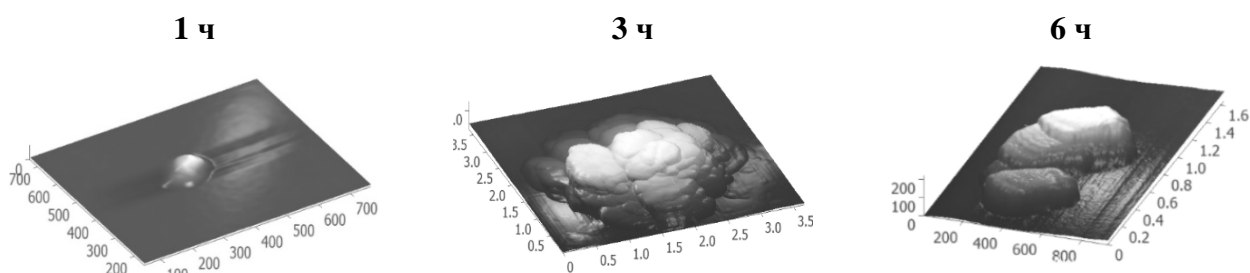


Рис. 6. АСМ-изображения частиц порошков механоактивированного креатинина: 1 ч, 3 ч, 6 ч

Тип кристаллической структуры креатинина после механоактивации не изменяется (рис. 7), однако, меняются основные параметры элементарной ячейки (табл. 5).

После механоактивации в течение 30 мин наблюдается увеличение размеров кристаллитов (~ в 2 раза) и рост уровня микроискажений. Истинная плотность порошков не изменяется. После 6 ч механоактивации размеры кристаллитов увеличиваются почти до размеров кристаллитов исходного образца, при этом уровень микроискажений становится ниже, чем в исходном образце. Эти изменения сопровождаются ростом истинной плотности порошков креатинина (табл. 5).

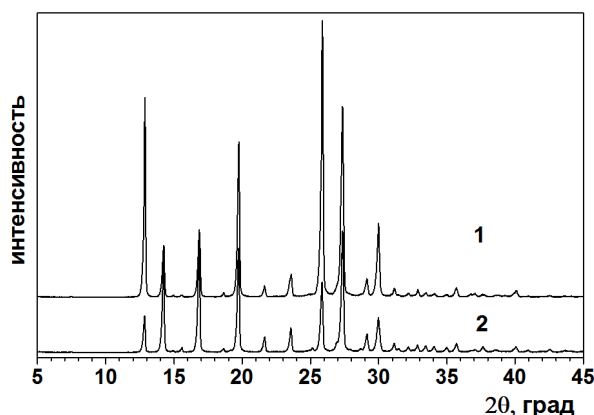


Рис. 7. Рентгеновские дифрактограммы креатинина в исходном состоянии (1) и после механоактивации (2)

Параметры структуры исходного и механоактивированного креатинина

Образец креатинина	Размер кристаллитов, нм	Уровень микроискажений $\langle \varepsilon^2 \rangle^{1/2}$ , %	Параметры решетки	Истинная плотность, г/см <sup>3</sup>
Исходный	320,8 ± 15,6	0,53 ± 0,01	a = 11,4402 ± 0,0013 Å b = 5,9529 ± 0,0005 Å c = 8,0458 ± 0,0007 Å β = 96,2183 ± 0,0050°	1,09
МА 30 мин	158,7 ± 9,0	0,60 ± 0,02	a = 11,4347 ± 0,0020 Å b = 5,9392 ± 0,0009 Å c = 8,0199 ± 0,0012 Å β = 96,5015 ± 0,0120°	1,09
МА 6 ч	298,9 ± 24,1	0,51 ± 0,02	a = 11,4325 ± 0,0018 Å b = 5,9409 ± 0,0008 Å c = 8,0233 ± 0,0012 Å β = 96,3928 ± 0,0106°	1,12

Гидрофобность протонированного и непротонированного креатинина близка: (-6,84) и (-6,21) соответственно.

На кривых ДСК исходного и механоактивированного креатинина не наблюдается тепловых эффектов вплоть до температуры плавления (260 °C) (рис. 8).

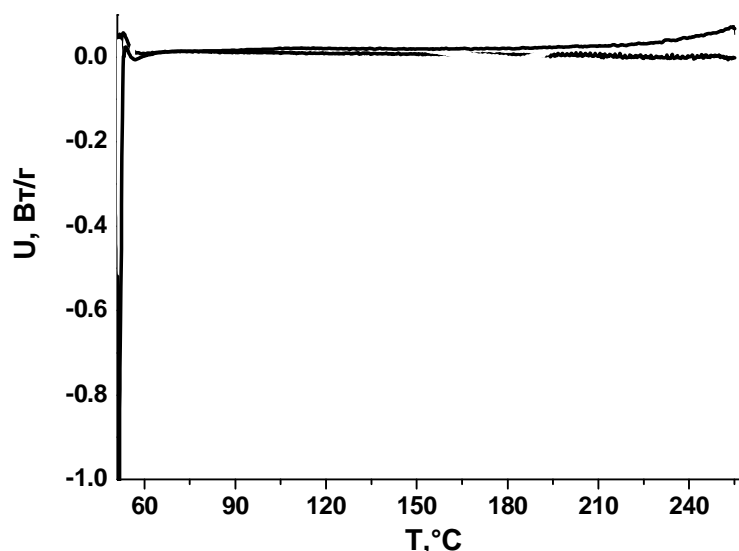


Рис. 8. ДСК кривые исходного и механоактивированного креатинина

Механоактивация креатинина приводит к заметным структурным изменениям самой молекулы, что отражается в характеристических полосах поглощения в ИК-спектре (рис. 9) после 6 ч механоактивации. Изменения наблюдаются в области веерных колебаний  $\delta(\text{N-H})$  (600 – 800 см<sup>-1</sup>), валентных колебаний  $\nu(\text{C=N})$  и  $\nu(\text{C=O})$  (~1690 см<sup>-1</sup>). Увеличивается интенсивность поглощения в области валентных колебаний  $\nu(\text{-C-OH-})$  (~1106 и ~1213 см<sup>-1</sup>) и появляется полоса ассоциированных групп ОН в области валентных колебаний  $\nu(\text{N-H})$  и  $\nu(\text{O-H})$  (3000-3200 см<sup>-1</sup>) [3]. На основании полученных данных можно полагать, что после 6 ч механоактивации происходят таутомерные превращения креатинина.

Анализ рентгенофотоэлектронных спектров свидетельствует, что в результате механоактивации происходит таутомерное превращение: в спектре N1s уменьшается интенсивность компоненты от протонированного азота, повышается интенсивность компоненты от третичного азота; в O1s спектре уменьшается интенсивность компоненты C=O и повышается интенсивность ОН-компоненты.



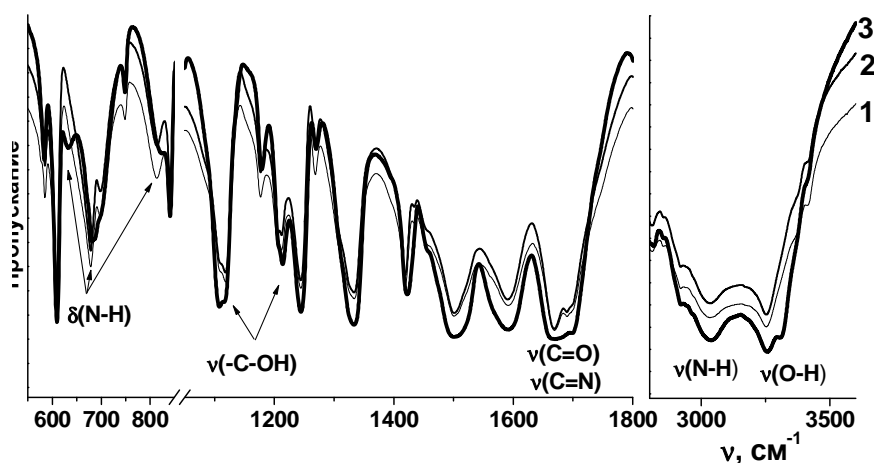


Рис. 9. ИК спектры креатинина исходного (1), и после механоактивации 3 ч (2) и 6 ч (3)

Растворимость порошков креатинина после механоактивации изменяется незначительно. Коэффициенты преломления растворов механоактивированного креатинина незначительно повышаются вследствие образования двойной связи N=C в результате депротонирования NH-группы. Уменьшение электропроводности можно связать с уменьшением заряда на атоме азота после депротонирования (табл. 6). Возможной причиной наблюдаемых эффектов является деструкция молекулы креатинина с образованием креатина. При этом уменьшается величина pH водных растворов (табл. 6).

Таблица 6

**Растворимость в воде и физико-химические свойства водных растворов креатинина**

Обработка креатинина	Растворимость в дист. воде, г/100 г H <sub>2</sub> O (pH=6,2)	Водные растворы 1,3 вес.%		
		pH	Электропроводность, См·м <sup>-1</sup>	Коэффициент преломления
Исходный	9,150	7,75	121,0	1,53
МА 30 мин.	9,155	6,17	100,9	1,55
МА 6 ч	9,222	5,05	88,5	1,55

Используя данные pH, были рассчитаны соотношения протонированной и непротонированной форм креатина в водных растворах исходного и механоактивированного (6 ч) креатинина по формуле  $W = \lg [P/N]$ , где P – протонированная форма креатинина, N – непротонированная форма креатинина [7]. Это соотношение составляет -1,49 для исходного креатинина, -2,17 и -4,67 для механоактивированного в течение 30 мин и 6 ч креатинина соответственно, т.е. после механоактивации доля молекул креатинина с протонированным атомом азота существенно уменьшается.

Таблица 7

**Термический коэффициент объемного расширения водных растворов креатинина ( $\beta \cdot 10^{-3}$ , 25-35 °C)**

Обработка	Концентрация креатинина в растворе, вес.%				
	0,05	0,2	0,4	0,8	1,3
Исходный	2,0	2,0	2,0	1,8	1,8
30 мин МА	2,0	2,0	2,0	1,9	1,8
6 ч МА	1,9	2,2	2,2	2,0	2,0

Поскольку гидрофобность протонированных и непротонированных молекул креатинина различается незначительно, то и коэффициенты объемного расширения в диапазоне 25 – 35 °C близки.

Биологические свойства растворов исходных и механоактивированных креатина и креатинина были исследованы методом микроэлектрофореза на эритроцитах и эпителиоцитах. Было установлено, что количество активных красных клеток крови в растворах механоактивированных и исходных порошков креатинина практически не отличается, однако с увеличением времени механоактивации повышается амплитуда колебаний эритроцитов в 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ), что может быть обусловлено активностью транспортных процессов, идущих через эритроцитарную мембрану. Количество эпителиоцитов, совершающих активные поступательные движения, в растворах механоактивированных препаратов повышается в среднем на 28 – 30 % и не коррелирует с длительностью механоактивации. В растворах механоактивированных креатина и креатинина препаратов резко возрастает (в 2,3 раза,  $p \leq 0,05$ ) активность колебательных движений ядра, повышается амплитуда движения цитолеммы (на 24 %,  $p \leq 0,05$ ). Видно, что активность клеток в растворах механоактивированного креатинина выше, чем в растворе исходного креатинина. Причем активирующее действие креатинина повышается с увеличением времени механоактивации.

Таким образом, появление функциональных групп  $-N=$  и  $OH-$  вместо  $-NH$  и  $C=O$  приводит к повышению биологической активности механоактивированного креатинина по отношению к эпителиоцитам и эритроцитам. Повышение активности креатина после механоактивации связано со стерическими изменениями в структуре молекулы, которые сохраняются в водном растворе, а также с циклизацией креатина и образованием креатинина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Размеры частиц порошков креатина и креатинина уменьшаются с нескольких микрон до нескольких сотен нанометров и объединяются в агрегаты микронных размеров. Тип кристаллической решетки креатина и креатинина в результате механоактивации не изменяется.

При малых временах механоактивации размеры кристаллитов уменьшаются, а при увеличении длительности механоактивации (до 6 ч для креатина и до 12 ч для креатинина) возрастают. Уровень микроискажений и параметры решетки изменяются немонотонно с ростом времени механоактивации. Не выявлено корреляций между изменением размеров кристаллитов и уровня микроискажений с ростом истинной плотности механоактивированных порошков креатина и креатинина. Анализ рентгеноэлектронных и NEXAFS спектров позволяет предположить, что механоактивация приводит к циклизации креатина в поверхностных слоях частиц порошка с образованием креатинина (эффект замечен после 6 ч механоактивации) и таутомерным превращениям молекулы креатинина: атом водорода  $NH$ -группы кольца креатинина переходит к атому кислорода с образованием  $OH$ -группы. Эти изменения химической структуры креатина и креатинина сохраняются в водных растворах и обуславливают различие величины  $pH$ , структурно-чувствительных свойств (вязкости, плотности, коэффициента объемного расширения), электропроводности и коэффициентов преломления водных растворов механоактивированных и исходных креатина и креатинина.

Впервые получены ДСК кривые креатинина: вплоть до температуры плавления ( $260\text{ }^{\circ}C$ ) не наблюдается тепловых эффектов, свидетельствующих об изменении состава или структуры креатинина.

Отмечается, что активность клеток крови и эпителиоцитов в растворах механоактивированных креатина и креатинина выше, чем в растворах исходных веществ. Повышение активности креатина после механоактивации связано со стерическими изменениями в структуре молекулы, которые сохраняются в водном растворе, а также с частичной циклизацией креатина и образованием креатинина.

Авторы выражают благодарность Мухгалину В.В. за проведение рентгенофазового анализа, к.ф.-м.н. Стерховой И.В. за проведение термического анализа, к.м.н. Соловьеву А.А. за проведение микроэлектрофоретической активности эритроцитов и эпителиоцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зефирова О. Н., Палюлин В. А. История QSAR. Ранние исследования количественной связи между структурой и биологической активностью органических соединений // В кн.: История химии: область науки и учебная дисциплина / под ред. В.В. Лунина и В.М. Орла. М.: Изд-во МГУ, 2001. С. 60-81.
2. Hansch C., Leo A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. New York: Wiley, 1979. 339 p.
3. Mayo D. W., Miller F. A., Hannah R. W. Course Notes of the Interpretation of Infrared and Raman spectra. Hoboken Willey: John Wiley & Sons, 2003. 567 p.
4. Ganguly S., Jayappa S., and Dash A. K. Evaluation of the stability of creatine in solution prepared from effervescent creatine formulations // AAPS PharmSciTech, 2003, vol. 4, no. 2, pp. 119-128.
5. Arlin J.-B., Bhardwaj R. M., Johnston A., Miller G. J., Bardin J., MacDougall F., Fernandes P., Shankland K., David W. I. F., and Florence A. J. Structure and stability of two polymorphs of creatine and its monohydrate // CrystEngComm, 2014, vol. 16, no. 35, pp. 8197-8204.
6. Kanunnikova O. M., Aksenova V. V., Karban O. V., Mughalin V. V., Senkovski B. V., Ladjanov V. I. Mechanical activation effect on structure, physicochemical, and biological properties of potassium orotate/magnesium orotates // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2017, vol. 283, p. 012004(1-14).
7. Федорова Н. С. Продукты сложной конденсации азотсодержащих соединений с альдегидами – летучие ингибиторы атмосферной коррозии черных и цветных металлов: дисс... канд. хим. наук. СПб., 2011. 213 с.

---

## EFFECT OF MECHANOACTIVATION ON COMPOSITION, STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CREATININE AND CREATINE

<sup>1</sup>Aksenova V. V., <sup>1</sup>Kanunnikova O. M., <sup>2</sup>Karban O. V., <sup>1</sup>Suslov A. N., <sup>1</sup>Ladyanov V. I., <sup>3</sup>Tukmacheva K. A., <sup>3</sup>Chuchkova N. N., <sup>3</sup>Smetanina M. V.

<sup>1</sup> Udmurt Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia

<sup>2</sup> Izhevsk State Agricultural Academy, Izhevsk, Russia

<sup>3</sup> Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

**SUMMARY.** The influence of ball milling on the structure, physical and chemical properties and biological activity of creatine and creatinine has been studied. As a result of ball milling dispersion is observed and particle sizes of powders are reduced to several hundred nanometers. The type of crystal lattice of creatine and creatinine does not change. Changes of lattice parameters (a, b, c,  $\beta$ -angles) are observed. At small times of ballmilling the size of the crystallites decrease, and with increasing duration of ball milling on the increase. Analysis of X-ray photoelectron and NEXAFS spectra suggests that mechanoactivation leads to the cyclization of creatine in the surface layers of powder particles with the formation of creatinine (the effect is noticeable after 6 hours of mechanoactivation). Therefore, the pH, electrical conductivity, refractive index, and thermal volumetric expansion coefficients of aqueous solutions of mechanoactivated creatine are different from those of the original creatine solutions. During the ball milling of creatinine, a tautomeric transformation occurs: the hydrogen atom of the NH group of the ring passes to the oxygen atom C=O group with the formation of a hydroxyl group. In this case, a double bond N=C is formed, which leads to an increase in the refractive index of aqueous solutions. Changes in the charges of nitrogen and oxygen atoms lead to changes in the electrical conductivity of aqueous solutions. The hydrophobicity of the creatinine molecule also changes, which is manifested in a change in the thermal coefficient of volumetric expansion. It is noted that the activity of blood cells and epithelial cells in solutions of mechanoactivated creatine and creatinine is higher than in solutions of initial substances. The reason for changing the biological properties of creatine is a change in the nature of functional nitrogen and oxygen - containing groups of creatinine. The increase in creatine activity after ball milling on is associated with steric changes in the molecule structure, which persist in aqueous solution, as well as with partial cyclization of creatine and creatinine formation.

**KEYWORDS:** creatine, creatinine, ball milling, structure, aqueous solutions.

## REFERENCES

1. Zefirova O. N., Palyulin V. A. Istoriya QSAR. Rannie issledovaniya kolichestvennoi svyazi mejdu strukturoi i biologicheskoi aktivnostyu organicheskikh soedinenii [QSAR history. Early studies of the quantitative relationship between the structure and biological activity of organic compounds]. V kn. *Istoriya himii: oblast nauki i uchebnaya*

*disciplina* [In the book *History of Chemistry: field of science and academic discipline*]. Pod red. V.V. Lunina i V.M. Orla. Moscow: MGU Publ., 2001, pp. 60-81.

2. Hansch C., Leo A. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. New York: Wiley, 1979. 339 p.

3. Mayo D. W., Miller F. A., Hannah R. W. *Course Notes of the Interpretation of Infrared and Raman spectra*. Hoboken Wiley: John Wiley & Sons, 2003. 567 p.

4. Ganguly S., Jayappa S., and Dash A. K. Evaluation of the stability of creatine in solution prepared from effervescent creatine formulations. *AAPS PharmSciTech*, 2003, vol. 4, no. 2, pp. 119-128. <https://doi.org/10.1208/pt040225>

5. Arlin J.-B., Bhardwaj R. M., Johnston A., Miller G. J., Bardin J., MacDougall F., Fernandes P., Shankland K., David W. I. F., and Florence A. J. Structure and stability of two polymorphs of creatine and its monohydrate. *CrystEngComm*, 2014, vol. 16, no. 35, pp. 8197-8204. <https://doi.org/10.1039/c4ce00508b>

6. Kanunnikova O. M., Aksenova V. V., Karban O. V., Muhgalin V. V., Senkovski B. V., Ladjanov V. I. Mechanical activation effect on structure, physicochemical, and biological properties of potassium orotate/magnesium orotates. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2017, vol. 283, p. 012004(1-14). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/283/1/012004>

7. Fedorova N. S. *Producty slozhnoi condensacii azotsoderzhaschih soedineni s aldegidami – letuchie inhibitory atmosferynoy korrozii chernyh i cvetnyh metallov*: diss... kand. him. nauk. St. Petersburg, 2011, 213 p.

---

Аксенова Валерия Викторовна, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник,  
НЦ МФМ УдмФИЦ УрО РАН тел. +7(3412)21-65-77, e-mail: [vava777@yandex.ru](mailto:vava777@yandex.ru)

Канунникова Ольга Михайловна, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник,  
НЦ МФМ УдмФИЦ УрО РАН, тел. +7(3412)21-65-77, e-mail: [olam313597@gmail.com](mailto:olam313597@gmail.com)

Карбань Оксана Владиславовна, доктор физико-математических наук, профессор, и.о. заведующего кафедрой  
физики ИжГСХА, тел. +7(3412)59-24-23. e-mail: [ocsa123@yahoo.com](mailto:ocsa123@yahoo.com)

Суслов Алексей Александрович, младший научный сотрудник, НЦ МФМ УдмФИЦ УрО РАН,  
тел. +7(3412)21-65-77, e-mail: [alalsuslov@mail.ru](mailto:alalsuslov@mail.ru)

Ладьянов Владимир Иванович, доктор физико-математических наук, руководитель Научного центра  
металлургической физики и материаловедения УдмФИЦ УрО РАН,  
тел. +7(3412)21-65-77, e-mail: [las@ftiudm.ru](mailto:las@ftiudm.ru)

Тукмачева Ксения Андреевна, аспирант ИГМА, тел. +7(3412)91-82-87, e-mail: [mig05@inbox.ru](mailto:mig05@inbox.ru)

Чучкова Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской  
биологии ИГМА, тел. +7(3412)91-82-87, e-mail: [mig05@inbox.ru](mailto:mig05@inbox.ru)

Сметанина Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры медицинской биологии  
ИГМА, +7(3412)91-82-87, e-mail: [mig05@inbox.ru](mailto:mig05@inbox.ru)