

На правах рукописи

Попов Александр Юриевич

**«СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НАНОПОРИСТОГО
СВЕРХСШИТОГО ПОЛИСТИРОЛА ДЛЯ ТВЁРДОФАЗНОЙ
ЭКСТРАКЦИИ БИОМАРКЕРОВ»**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в

Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН) в лаборатории стереохимии сорбционных процессов.

Научный руководитель доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории стереохимии сорбционных процессов **Цюрупа Мария Петровна.**

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1. Обзор литературы.....	10
1.1 Проблемы анализа биологических матриц	10
1.2 Основы твёрдофазной экстракции	14
1.3 Классические материалы ограниченного доступа (RAM).....	23
1.4 Сверхсшитый полистирол.....	28
1.5 Структура и основные свойства сверхсшитого полистирола	36
1.6 ТФЭ в анализе биологической матрицы	52
2. Экспериментальная часть	66
2.1 Реактивы и материалы.....	66
2.2 Оборудование	67
2.3 Синтез гелевого сополимера стирола с дивинилбензолом.....	67
2.4 Синтез монохлордиметилового эфира.....	68
2.5 Сшивание сополимеров стирола с дивинилбензолом.....	69
2.6 Измерение кажущейся удельной поверхности	70
2.7 ИК спектроскопия.....	70
2.8 Измерение кажущейся плотности полимера.....	71
2.9 Измерение объёмного набухания.....	71
2.10 Измерение весового набухания	72
2.11 Измерение адсорбции в статических условиях.	72
2.12 Измерение экстракции ДГБК в статических условиях	73
2.13 Измерение сорбции смеси ФКК в статических условиях.....	74
2.14 Измерение кривых проскока.....	74

2.15	Измерение десорбции кислот и альбумина в динамическом режиме	76
2.16	ТФЭ-ВЭЖХ анализ ФКК в модельном белковом растворе	77
2.17	Определение фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови	78
3.	Результаты и их обсуждение	79
3.1	Синтез гелевых сополимеров стирола с дивинилбензолом	79
3.2	Оптимизация условий синтеза сверхсшитого полистирола.....	81
3.3	Исследование структуры сорбентов с помощью ИК-спектроскопии	88
3.4	Изучение пористости полученных сорбентов	90
3.5	Закономерности набухания полученных сорбентов	97
3.6	Исследование сорбционных свойств в статических условиях.....	99
3.7	Изучение сорбции ФКК в статических условиях	103
3.8	Изучение сорбции ФКК в динамических условиях	108
3.9	ВЭЖХ анализ раствора смеси фенилкарбоновых кислот	115
3.10	Определение фенилкарбоновых кислот в крови человека	117
4.	Заключение.....	123
5.	Список сокращений и условных обозначений.....	125
6.	Список литературы	127
7.	Список публикаций по теме диссертации.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Полный профиль низкомолекулярных органических веществ (молекулярная масса <1500 г/моль), присутствующих в организме, называется метаболом. Определение метаболомного профиля или отдельных маркёров в различных физиологических жидкостях, включающих кровь, мочу, лимфу, слюну и др., является актуальной проблемой в биологии, спорте, криминалистике и особенно в медицине. Однако на данный момент нет универсального метода анализа метаболомного профиля. Для решения этой проблемы необходима пробоподготовка, устраняющая мешающее влияние компонентов пробы, главным образом белков и других макромолекул, и повышающая концентрацию необходимых аналитов.

Универсальным и перспективным методом пробоподготовки является твёрдофазная экстракция (ТФЭ), с использованием специального сорбента, способного обратимо сорбировать вещества метаболома, но не удерживающего высокомолекулярные матричные компоненты биологической жидкости. Такие сорбенты называют материалами ограниченного доступа (*Restricted access materials*, RAM) и их обычно получают с помощью сложной многостадийной модификации поверхности силикагелей или молекулярно отпечатанных полимеров. Воспроизводимый синтез таких материалов очень сложен, а сами сорбенты не обладают универсальной сорбционной способностью по отношению к разнообразным метаболитам, поэтому не подходят для анализа метаболомного профиля.

Наиболее универсальным сорбентом для ТФЭ является сверхсшитый полистирол (ССП), который широко используется в анализе загрязнений объектов окружающей среды, качества пищевых продуктов, а также для определения фармпрепаратов в биологических жидкостях [1]. Сверхсшитый полистирол гемосовместим, т.е. не сорбирует форменные элементы крови и обладает тромборезистентностью. Однако на сегодняшний день не были проведены систематические исследования, направленные на оптимизацию условий синтеза

сверхсшитого полистирола для получения полимера с необходимой пористой структурой, которая эффективно сорбирует различные аналиты из сложных биологических матриц и вместе с тем не доступна для основных белков пробы. Кроме того, для использования в сорбционных патронах необходимо чтобы частицы сверхсшитого полистирола обеспечивали хорошую кинетику процесса, но не создавали значительного противодействия. Такому требованию соответствуют узкодисперстные сферические гранулы со средним диаметром от 30 до 80 мкм.

Убедительным подтверждением состоятельности нового подхода к синтезу RAM было бы решение прикладной задачи анализа биологических жидкостей с помощью экстракции аналита нанопористым сверхсшитым полистиролом. Подходящей актуальной проблемой является определение в крови пациентов фенолкарбоновых кислот (**ФКК**) – биомаркеров сепсиса [2]. Сепсис является ведущей причиной летальности в отделениях интенсивной терапии [3], при этом смертность в случае скрытого сепсиса оказывается выше, чем при выраженном заболевании. Содержание ФКК в сыворотке крови здорового человека порядка 10^{-4} - 10^{-5} г/л [4] и начинает меняться на ранних стадиях развития воспалительного процесса. Определяя уровень этих маркёров, можно своевременно диагностировать бессимптомный сепсис и назначить раннее лечение, предотвратив развитие тяжёлой стадии болезни.

Актуальность работы определяется необходимостью разработки универсальных и дешёвых сорбентов для селективной экстракции широкого круга метаболитов из сложных биологических матриц. Важными метаболитами являются сепсис-ассоциированные фенолкарбоновые кислоты, эффективная экстракция которых из биологических матриц является не решённой задачей.

Цель работы заключается в разработке новых сверхсшитых полистирольных RAM для эффективной экстракции фенолкарбоновых кислот различной гидрофобности из сыворотки крови.

Для достижения поставленной цели **решены следующие задачи:**

- Адаптирован метод суспензионной полимеризации стирола с дивинилбензолом (**ДВБ**) для получения исходного гелевого сополимера с диаметром частиц 60-80

мкм и пригодного для получения сверхсшитого РАМ. Содержание ДВБ в полимере принята за степень первичной сшивки.

- Оптимизированы условия дополнительной (вторичной) сшивки полученных сополимеров для получения высокопористого сорбента с удельной поверхностью около $1000\text{ м}^2/\text{г}$.
- Изучена зависимость физико-химических и сорбционных свойств сверхсшитого полистирола от соотношения первичной (содержание дивинилбензола) и вторичной (дополнительной) сшивки.
- Определены оптимальные параметры синтеза сверхсшитого полистирола как сорбента для твёрдофазной экстракции фенолкарбоновых кислот из сыворотки крови.
- Разработан новый метод определения ФКК в сыворотке крови.

Научная новизна работы. Впервые изучена зависимость сорбционной способности по отношению к белкам и различным низкомолекулярным соединениям от степени первичной и вторичной сшивки полимерного сорбента – сверхсшитого полистирола. Полученные закономерности позволили установить оптимальные условия синтеза, и впервые получить нанопористый гидрофобный сверхсшитый полистирольный материал ограниченного доступа, и изучить его сорбционные и физико-химические свойства.

Теоретическая значимость работы заключается в определении роли вторичной и первичной сшивки в селективности сорбции ароматических кислот на сверхсшитом полистироле. Анализ изотерм адсорбции азота с помощью модельно независимого модифицированного α_s – метода Синга надёжно показал, что с уменьшением степени первичной сшивки растёт размер пор сухого полимера, при этом степень вторичной сшивки оказывает незначительно влияние на размер пор ненабухшего сверхсшитого полимера.

Практическая значимость работы. Предложен эффективный способ синтеза специфических сверхсшитых полистирольных сорбентов с различным размером пор и пригодных для определения фенолкарбоновых кислот в сыворотке крови человека в клинически важном диапазоне концентраций. Оптимизированы условия исчерпывающей ТФЭ ФКК из сыворотки крови. Подобраны параметры высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа экстракта.

Методология исследования заключалась в синтезе ряда сорбентов, отличающихся степенью первичной и вторичной сшивки. Последующий анализ полученных сорбентов **методами:** низкотемпературной адсорбции азота/аргона, денситометрии, ИК спектроскопии, весового и объёмного набухания в растворителях, сорбционных статических и динамических экспериментов позволил выявить влияние первичной и вторичной сшивки на структуру и свойства гидрофобного нанопористого сверхсшитого полистирола.

На защиту выносятся:

- Оптимизация условий синтеза гидрофобных нанопористых ССП для ТФЭ, являющихся сорбентами ограниченного доступа.
- Совокупность данных о структурных и физико-химических свойствах, синтезированных нанопористых сверхсшитых полистиролов.
- Определение сорбционных свойств полученных полимеров по отношению к некоторым витаминам, белкам, лекарственным препаратам и ФКК в статических условиях.
- Оптимизация процедуры твёрдофазной экстракции фенолкарбоновых кислот с помощью микропатронов.
- Методика количественного определения ФКК в сыворотке крови человека с помощью ТФЭ на синтезированных сорбентах.

Достоверность результатов исследования обеспечивалась тщательной экспериментальной и синтетической работой с контролем условий, использованием приборов и измерительных средств необходимой точности и воспроизведением (повторением) всех экспериментов. **Высокая степень достоверности** фундаментальных результатов была подтверждена практическим применением полученного сорбента для ТФЭ и последующего ВЭЖХ определения фенолкарбоновых кислот в сыворотке крови здорового донора.

Апробация работы. Основные результаты доложены на VII Всероссийской Каргинской конференции “Полимеры-2017” (Москва, 2017), VI Всероссийском симпозиуме и Школе-конференции молодых учёных “Кинетика и динамика обменных процессов” (Сочи, 2017), VII Всероссийском симпозиуме и Школе-

конференции молодых учёных “Кинетика и динамика обменных процессов” (Сочи, 2018).

Публикации. Основное содержание работы изложено в 4 статьях, включенных в перечень ВАК и в 3 тезисах докладов.

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе научной литературы, постановке задач исследования, планировании и выполнении экспериментов, обработке, анализе, структурировании и обобщении полученных результатов, написании статей, подготовки докладов и выступления на конференциях. В основу диссертации положены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором в период 2016-2019 гг.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и выводов, списка используемой литературы. Материал изложен на 149 страницах машинописного текста, содержит 36 Рисунков, 4 схемы и 17 таблиц, список цитируемой литературы включает 303 наименований.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблемы анализа биологических матриц

Профиль присутствующих в организме низкомолекулярных органических соединений – метаболом (молекулярная масса <1500 Да) состоит из чисто эндогенных веществ, детерминированных геномом, и из экзогенных веществ и их метаболитов. Молекулы составляющие метаболом очень разнообразны и многочисленны, по последним оценкам количество эндогенных метаболитов составляет 8500, а экзогенных метаболитов до 40000 [5]. Метаболом непосредственно отражает состояние организма в данный момент времени, поэтому его анализ в биологических жидкостях может быть мощным диагностическим и прогностическим инструментом. Такие биологические матрицы, как кровь, моча, слюна, спинномозговая жидкость, клеточные гомогенаты и др. являются водными коллоидными растворами, кроме метаболома, содержат в высоких концентрациях белки, липиды, неорганические соли и некоторые низкомолекулярные органические соединения (таблица 1). Концентрация большей части метаболома на порядки ниже концентрации основных компонентов, перечисленных выше. В качестве примера, в таблице 1 указана концентрация основных компонентов плазмы крови и некоторых клинически важных аналитов [6–9].

Несмотря на значительный прогресс в инструментальной области аналитической химии, нет простого и универсального метода для точного определения концентрации аналитов в биологической жидкости без дополнительной пробоподготовки [10–12]. В настоящее время для анализа основных компонентов метаболомного профиля используются метод ЯМР [13], обладающий недостаточной чувствительностью [14], а также методы газовой хроматографии (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖЭХ), эти два метода в связке с масс-спектрометрическим (МС) детектором способны одновременно определить большое количество веществ в очень низкой концентрации [15].

Таблица 1. Основные компоненты плазмы крови человека.

Основные компоненты	Концентрация в плазме, мг/мл	Некоторые важные анализы	Концентрация в плазме, мг/мл
Вода	930-950	Белки	
Белки	60-83	Пресепсин	$1.2-2.9 \times 10^{-7}$
Альбумин	35-50	С-реактивный б.	$0.5 - 10 \times 10^{-3}$
Антитела	6.4-28	Инсулин	$2.0-8.4 \times 10^{-7}$
LgG	5.0-9	Цитокин IL-6	$0.6 - 3 \times 10^{-9}$
Трансферрин	2.2-4	Прокальцитонин	$0-4.6 \times 10^{-8}$
Фибриноген	2.0-4	Гормоны	
Метаболом		Эстроген (М)	$4-12 \times 10^{-8}$
Аминокислоты	0.3-0.44	Эстроген (Ж)	$1-44 \times 10^{-8}$
Глутамин	$4.7-10 \times 10^{-2}$	Тестостерон (М)	$2.8-8.9 \times 10^{-6}$
Аланин	$2.4-7.6 \times 10^{-2}$	Тестостерон (Ж)	$2.3-7.5 \times 10^{-7}$
...		Вазопрессин	$\sim 4.5 \times 10^{-10}$
Метионин	$1-15 \times 10^{-3}$	Инсулин	$2.8-8.4 \times 10^{-7}$
Углеводы		Витамины	
Глюкоза	0.7-1.1	В12	$1-10 \times 10^{-7}$
Глюкозамин	0.61-0.82	D3 (1,25 – ОН)	$2.5-4.5 \times 10^{-8}$
Полисахариды	0.73-1.3	ФКК	
Липиды	4-8.5	ДГБК	$\sim 3.5 \times 10^{-5}$
Триглицериды	2.5-30	ГБК	$\sim 3.4 \times 10^{-4}$
Лецитин	1-2.25	ФМК	$\sim 1.0 \times 10^{-4}$
Свобод. жирные к.	$8-25 \times 10^{-2}$	БК	$\sim 3.2 \times 10^{-5}$
Фосфолипиды	$5-12 \times 10^{-2}$	ФУК	$\sim 7.2 \times 10^{-5}$
Витамины		ФПК	$\sim 8.3 \times 10^{-5}$
Е	$12-20 \times 10^{-3}$		
А	$1-8 \times 10^{-4}$		
С	$4-15 \times 10^{-3}$		
В9	$1.6-2 \times 10^{-5}$		
Стероиды			
Холестерин	1.2-2		
Кортикостероиды	$1-4 \times 10^{-3}$		
Мочевина	0.15-0.47		
Холин	0.3-0.4		
Неорганические Соли	9-9.5		
Катионы			
Na	3-3.5		
К	0.15-0.21		
Анионы			
Cl	2.1-2.3		
HCO ₃	0.5-0.57		
РНК	$4-6 \times 10^{-2}$		
ДНК	$0-1.6 \times 10^{-2}$		

Однако основная проблема анализа биологических жидкостей указанными методами заключается не в низкой чувствительности приборов, а в матричном эффекте. Иными словами, чувствительности и точности определения аналитов в сложных матрицах ниже, чем в индивидуальных водных растворах [16]. При использовании МС детекторов этот эффект возникает из-за подавления ионизации аналитов матричными компонентами. В определении компонентов методом жидкостной хроматографии в сочетании масс-спектрометрическим детектором подавление ионизации является основной проблемой количественного анализа [17].

Вторая проблема в анализе биологических жидкостей с помощью хроматографических методов — это осаждение в узлах прибора матричных компонентов, таких как белки, липиды и поверхностно-активные вещества, что ухудшает характеристики и срок эксплуатации аналитического инструмента. Особенно ярко это проблема проявляется при ВЭХЖ анализе биологических жидкостей, где осаждение белков на классических поверхностно-модифицированных силикагелях катастрофически снижает характеристики и ресурс хроматографических колонок [18; 19].

Для обеспечения необходимой чувствительности, селективности, воспроизводимости, точности, скорости и цены анализа низкомолекулярных веществ в биологических жидкостях необходимо снизить матричный эффект и повысить концентрацию аналитов выше чувствительность прибора. Эту задачу решают с помощью различных методов пробоподготовки [20]. В современной аналитической химии пробоподготовка и отбор проб занимают примерно 80% времени анализа [21], и ответственны за большую часть ошибок [22].

Среди методов пробоподготовки выделяют *предварительную обработку* образца и *экстракцию* [10]. Предварительная обработка заключается в удалении или уменьшении концентрации белков и других компонентов, так или иначе мешающих анализу. Чаще всего для этой цели используют простое разбавление образца, осаждение белков, химическое разложение липидов [23], или селективную сорбцию загрязнителей. Для осаждения белков существует множество методов [24;

25], наиболее распространёнными являются высаливание, подкисление, термическая денатурация, добавление поверхностно-активного вещества или органического растворителя. Такие операции не всегда обеспечивают полное удаление белков, а некоторые аналиты могут соосаждаться с белками [18; 19; 26], к тому же не исключено загрязнение образца.

Многие мешающие компоненты не удаляются при предварительной обработке образца, поэтому после неё зачастую применяют один, реже несколько, экстракционных методов. Методы экстракции принято разделять на жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) и твердофазную экстракцию (ТФЭ). Простой и распространённый метод жидкостной экстракции заключается в интенсивном перемешивании биопробы с 1 - 3 объёмами несмешивающегося с водой органического растворителя, последующей декантации и упаривании органического растворителя. К сожалению, такой подход может сопровождаться образованием устойчивой эмульсии растворителя с водной пробой, помимо этого, возможна потеря летучих соединений при упаривании. Плохая степень очистки экстракта, большая длительность процедуры экстракции, возможное загрязнение пробы, большой расход органических растворителей и наконец, невозможность автоматизации резко снижают полезность метода ЖЖЭ. Эти недостатки ЖЖЭ, привели к тому, что начиная с 1980х годов широкое распространение получили методы ТФЭ. Особое место среди сорбентов занимают “*Restricted Access Materials*” (RAM) – материалы ограниченного доступа т.к. они не сорбируют белки, но сорбируют низкомолекулярные метаболиты. Поэтому далее мы будем обсуждать преимущественно такие сорбенты.

Необходимо отметить, что в 2000-2010 годах, благодаря развитию аналитических приборов, были созданы методы жидкостной микроэкстракции: однокапельная микроэкстракция (*Single-drop microextraction*), дисперсная жидкость-жидкостная микроэкстракция (*Dispersive liquid-liquid microextraction*), полволоконная жидкостная микроэкстракция (*Hollow-fiber Liquid-phase microextraction*), эти методы лишены многих недостатков классической ЖЖЭ [21; 27]. В настоящее время в нецелевой метаболомике преобладает применение ЖЖЭ

[28], а в целевом определении на перёд заданных аналитов часто применяют ТФЭ [27; 29].

1.2 Основы твёрдофазной экстракции

ТФЭ включает 2 основных этапа: сорбцию аналитов твёрдой фазой сорбента из жидкой биологической пробы и последующую десорбцию аналитов подходящим растворителем. Условия ТФЭ подбирают так, чтобы максимально полно извлечь аналит с минимальным извлечением мешающих матричных компонентов. При этом с помощью ТФЭ можно добиться значительного повышения концентрации аналитов в результирующем растворе [30; 31].

Несмотря на то что существует огромное разнообразие методов аналитической ТФЭ, всех их можно разделить 2 типа в зависимости от характера массообмена между сорбентом и пробой. Эти типы часто называют как “статическая” и “динамическая” ТФЭ, или как предлагает IUPAC “*batch*” и “*flow-through*” соответственно [21]. Такое разделение позволяет в рамках всего двух моделей описывать всё разнообразие методов ТФЭ.

В статическом варианте сорбент погружается в водный раствор биологической пробы, или в его насыщенные пары и выдерживается до наступления сорбционного равновесия, поэтому сорбция в этом варианте неполная и определяется константой равновесного распределения сорбент – проба. Десорбцию проводят органическим растворителем или термически. На Рисунке 1А схематически изображена статическая ТФЭ, стрелками изображён массообмен аналита, C_1 и C_1^* – концентрация аналита в разных частях пробы, C_2 и C_2^* – в разных частях сорбента. Как можно видеть из рисунка, в статической экстракции есть свободный массообмен между разными частями пробы особенно при перемешивании, поэтому концентрация аналита одинакова во всем объёме фазы.

В динамическом варианте через цилиндрический патрон, упакованный сорбентом, пропускают пробу. В этом случае устанавливается т.н. динамическое равновесие, а концентрация аналита в пробе падает по мере прохождения пробы через сорбент, что позволяет полностью извлечь аналит (Рисунок 1Б).

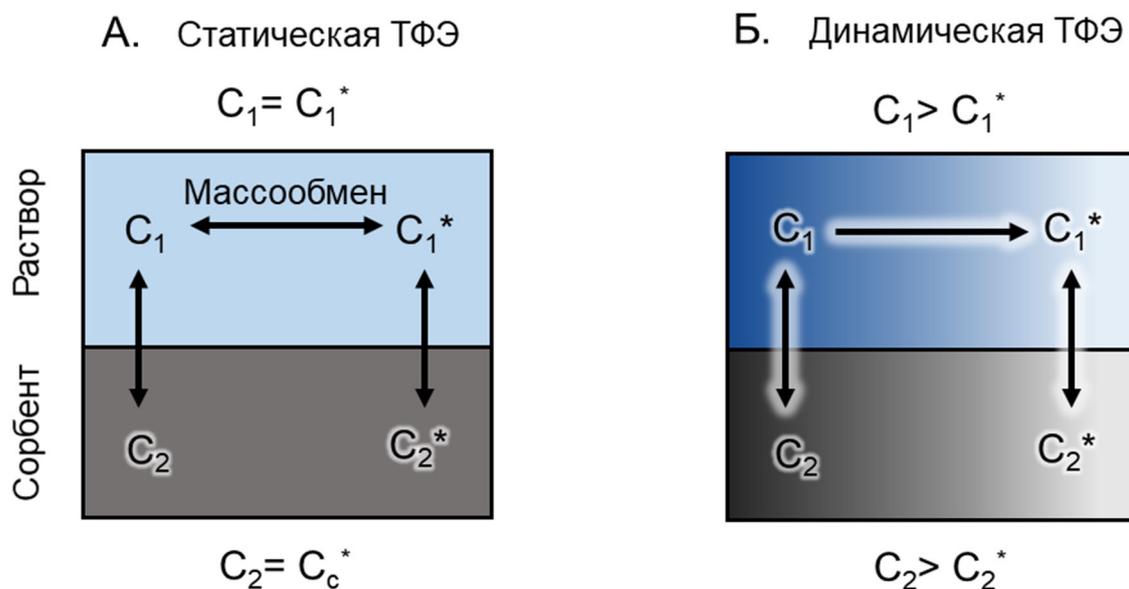


Рисунок 1. Принципиальная схема статической и динамической ТФЭ. Стрелками обозначены потоки вещества, C и C^* – концентрация аналита в разных частях фазы раствора (C_1) и сорбента (C_2).

Ключевое влияние на эффективность экстракции оказывают сорбционные свойства используемого сорбента [31]. Для описания способности сорбента поглощать определённый аналит зачастую измеряют максимальную сорбцию, т.н. предельную сорбционную ёмкость [32]. Предельная сорбционная ёмкость для большинства известных сорбентов зависит от химической структуры аналита, и коррелирует с такими стандартными характеристиками сорбента как удельная поверхность, удельный объём пор, удельное количество центров сорбции, удельная ионообменная ёмкость [33; 34].

Стоит отметить, что в аналитической ТФЭ сорбция аналита далека от максимальной. В этом случае сорбция зависит не только от ёмкости сорбента, но и от силы взаимодействия аналита с сорбентом, и его концентрации. При низких степенях заполнения сорбента, в “первом приближении” можно записать следующее выражение для удельной сорбции [35]:

$$A_{A \rightarrow 0} \approx A_{max} \times K \times C' \quad (1)$$

$$K \approx \exp\left(\frac{-\Delta H + T\Delta S}{RT}\right) \quad (2)$$

где A_{max} – предельная сорбционная ёмкость, K – коэффициент распределения аналита между сорбентом и раствором, C' – равновесная концентрация аналита, ΔH – удельная энтальпия сорбции, ΔS удельная энтропия сорбции, R – универсальная газовая постоянная, T абсолютная температура.

Выражение (1) и (2) справедливы как для сорбции, так и для десорбции. Они наглядно демонстрируют, что эффективность ТФЭ зависит от морфологии сорбента, описываемой членом A_{max} , от свободной энергии переноса аналита из фазы растворителя на сорбент, описываемой членом K , и от концентрации аналита. Иными словами, сорбция и десорбция зависят от химической природы аналита, структуры сорбента и состава растворителя.

Главным параметром для описания эффективности экстракции при определённых условиях служит степень извлечения (степень экстракции) аналита (*recovery*, **R**). Степенью извлечения называют долю аналита, которую удалось перенести из пробы в финальный экстракт. Степень извлечения является произведением степени сорбции и десорбции, и обычно выражается в %. Определённая таким образом степень извлечения называется *абсолютной*, но её сложно достоверно определить для произвольной биологической пробы. Во-первых, на практике мы не знаем реальную концентрацию аналита в пробе, во-вторых, для биологической пробы не всегда соотношение между сигналом детектора аналитического прибора и концентрацией аналита равняется соотношению, определённому для чистого раствора. Иными словами, мы достоверно не знаем ни изначального количества аналита в реальной биологической пробе, ни количества аналита в экстракте.

Поэтому часто, особенно при применении статической экстракции, степенью извлечения называют отношение сигнала, извлечённого аналита из биологической пробы к сигналу аналита, извлечённого из эталонной пробы при одинаковой добавленной концентрации аналита. Измеренную таким образом степень извлечения иногда называют *относительной*, а IUPAC рекомендует термин кажущаяся (apparent) степень извлечения [36]. При 100% кажущейся степени извлечения абсолютное извлечение может быть небольшим, т.к. 100%

относительная степень извлечения означает лишь равенство абсолютных извлечений из образца и контрольного раствора. Хотя абсолютная и относительная степень извлечения могут значительно отличаться, далеко не всегда из текста статьи ясно какую степень извлечения приводят авторы.

Ещё один важный параметр ТФЭ это степень концентрирования аналита – отношение концентрации аналита в экстракте, к концентрации аналита в пробе. При 100% извлечении, степень концентрирования равняется отношению объёма пробы к объёму десорбирующего растворителя. Степень концентрирования значительно влияет на чувствительность всего метода анализа. Для численного описания чувствительности анализа используют две величины, предел детектирования (*limit of detection, LOD*) – минимальная детектируемая концентрация аналита, и предел количественного определения (*limit of quantification, LOQ*) [37]. Часто под LOD подразумевают такую концентрацию аналита, аналитический сигнал которой в 3 раза интенсивнее шума (т.е. три стандартные ошибки измерений), а под LOQ в 10 раз интенсивнее шума (т.е. десять стандартных ошибок измерений), более грамотный подход заключается в определении LOD и LOQ из дисперсии значений сигнала и наклона калибровочной кривой [37]. Стоит отметить, что LOD и LOQ являются совокупной характеристикой выбранного метода пробоподготовки и использованного аналитического прибора.

Отметим, что любая аналитическая процедура не является точной, и имеет определённую случайную и систематическую погрешность. Для оценки случайной погрешности проводят несколько независимых анализов пробы, в подавляющем большинстве случаев хватает три независимых измерения. Оценить систематическую погрешность в общем случае невозможно. Однако можно заключить, что чем ниже матричный эффект экстракта и чем выше абсолютная степень извлечения, тем, вероятно, ниже систематическая ошибка и выше достоверность анализа.

Перед тем как мы сравним статическую и динамическую экстракцию, рассмотрим концепцию кривой проскока (*breakthrough curve*), которая требуется

для описания динамической экстракции. Кривой проскока называется зависимость относительной концентрации анализата на выходе из колонки (проскок) от объёма пропущенного раствора анализата (Рисунок 2). Объём раствора, из которого удаётся извлечь практически весь анализат называется объёмом проскока, V_B . Не существует единого определения объёма проскока, в литературе под V_B обычно подразумевают объём пропущенного раствора до достижения 1 - 10% уровня проскока (C_0/C') или объём раствора, из которого удаётся сорбировать 90 - 99% анализата. Часто выбранный уровень проскока обуславливается аппаратным оформлением, т.е. возможностью надёжно детектировать анализат на выходе из патрона. Объёмом удерживания, V_R , обычно называют объём раствора пропущенного до $C_0/C' = 0.5$ или до точки перегиба кривой проскока.

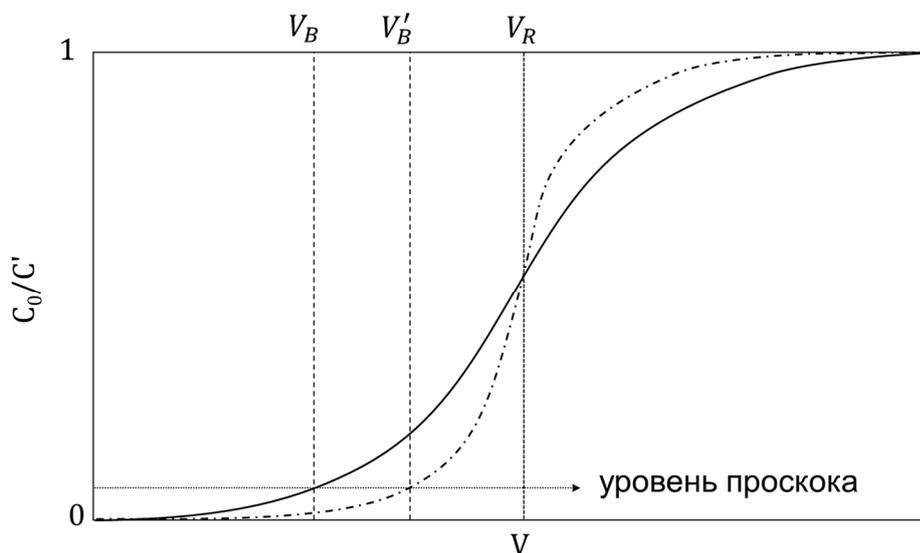


Рисунок 2. Кривая проскока. V_B — объём проскока, V_R — объём удерживания. Пунктирная кривая соответствует более качественному патрону с большим числом теоретических тарелок.

Объём проскока в отличие от V_R сильно зависит от геометрических размеров патрона, формы и размера частиц сорбента, качества упаковки картриджа, скорости потока и др. параметров. Чем выше качество упаковки патрона, меньше частицы сорбента и ниже скорость потока раствора тем более крутая кривая проскока, следовательно, выше объём проскока при той же ёмкости сорбента (см. V'_B в сравнении с V_B , Рисунок 2).

Для наглядного сравнения статической и динамической экстракции смоделируем кривые зависимости сорбции и десорбции от объёма пробы и объёма элюента для одинаковых навесок одного и того же сорбента (Рисунок 3, параметры модели: масса сорбента = 50 мг, сорбционная ёмкость = 100 мг/г, концентрация аналита в пробе 1 мг/мл, константа сорбционного распределения = 1000, константа десорбционного распределения = 10, модель *Thomas*-а для кривой проскока [38]). Видно, что в случае статической и динамической экстракции сорбция падает при увеличении объёма пробы, а десорбция растёт при увеличении объёма элюента, однако кривые для статической и динамической экстракции различны. Отметим, что зависимость сорбции и десорбции от других параметров экстракции, например, концентрации аналита, температуры, времени экстракции, степени ионизации вещества и д.р., будет качественно такой же.

В аналитической процедуре пытаются достигнуть максимальной чувствительности и точности, т.е. стремятся к высокому извлечению и высокой степени концентрирования, при этом стараются, чтобы степень сорбции и десорбции была воспроизводима (т.е. возможные вариации условий экстракции должны приводить лишь к небольшим изменениям степени извлечения). В статической экстракции сорбция и десорбция монотонно падают относительно изменения соотношения объёма сорбент-проба, при этом достаточно высокая воспроизводимость (низкая ошибка) экстракции наблюдается лишь при очень маленьком объёме пробы, когда степень извлечения близка к 100%, либо при большом объёме пробы, когда степень сорбции небольшая. В этих случаях требуется строгая стандартизация условий сорбции и десорбции для высокой воспроизводимости анализа.

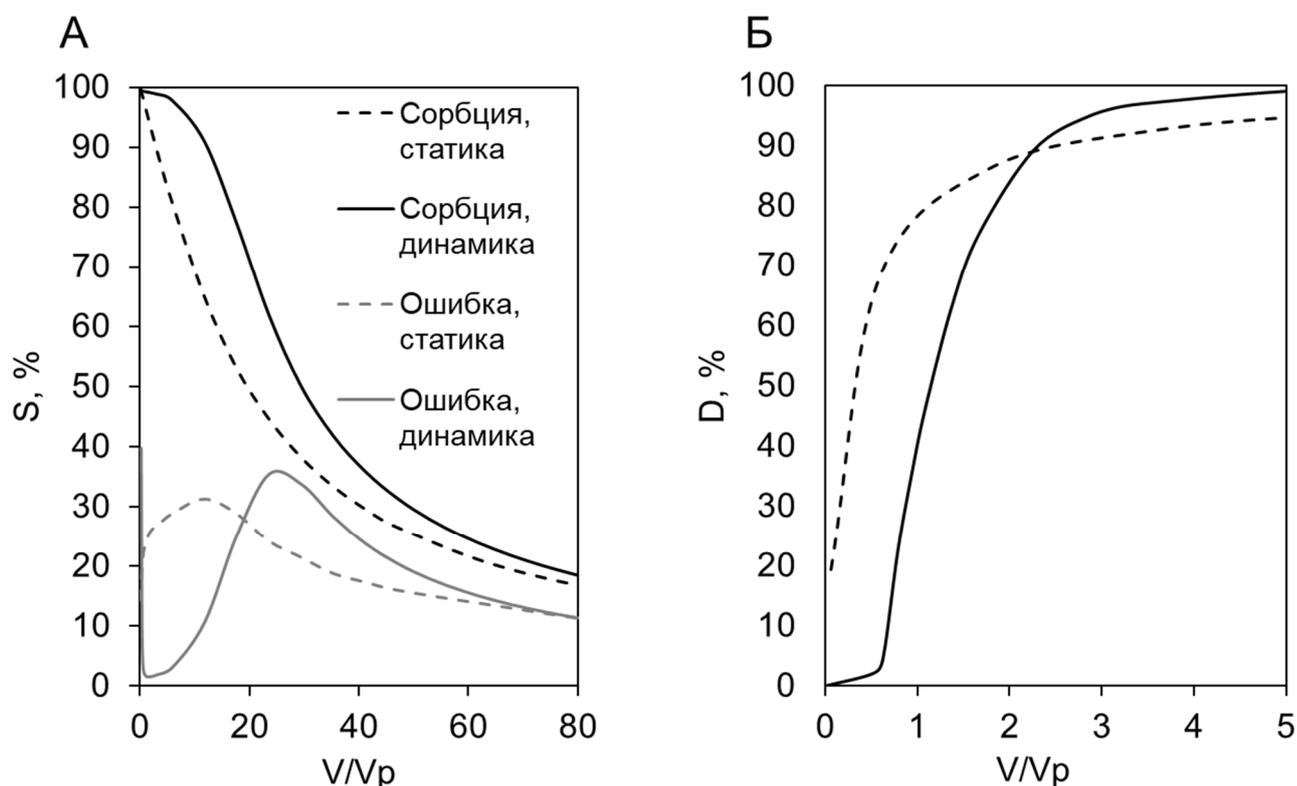


Рисунок 3. Сравнение статической и динамической экстракции. Зависимость (А) степени сорбции, (Б) степени десорбции, и (А, пунктир) относительной ошибки сорбции, $dS/(S \cdot dV)$, от отношения объёма пробы или элюента к объёму патрона. (V/V_p)

Статическую экстракцию часто осуществляют при низкой абсолютной степени извлечения, эта зона соответствует $V/V_c > 60$ для моделируемого случая на Рисунке 3. Такую неполную экстракцию называют неисчерпывающей [27; 39; 40]. Низкая степень извлечения экстракции является преимуществом, когда необходимо сохранить концентрацию аналита в пробе практически неизменной после экстракции. Эта особенность важна в тех областях, где необходимо в динамике следить за концентрацией аналита в малом объёме образца, где необходимо сохранить пробу для последующего аудита, или если изучается степень связанности аналита с белками [41] (высокая степень извлечения неизбежно приведёт к высвобождению части аналита из комплекса с белком).

В случае динамической экстракции обычно подбирают условия так, чтобы сорбция была полной, диапазон $V/V_c = 0-10$ на Рисунке 3, поэтому динамическую ТФЭ также называют исчерпывающей [42]. В этой зоне небольшие изменения

параметров экстракции практически не влияют на степень извлечения, т.е. относительная ошибка динамической экстракции ниже статической, именно поэтому для обеспечения высокой воспроизводимости анализа не требуется так тщательно стандартизировать условия динамической экстракции как в случае статической ТФЭ. К сожалению, во многих работах авторы пренебрегают важностью подбора условий, которые обеспечивают высокую степень извлечения $>90\%$. Если экстракция частичная, то даже небольшое изменение условий экстракции могут сильно сказаться на степени извлечения, как это показано на Рисунке 6, и тем самым исказить результаты анализа (удивительно, но на это мало кто обращает внимание). Например, для моделируемого случая в диапазоне $V/V_p = 15-40$ ошибка динамической экстракции выше, чем статической в аналогичных условиях. Кроме снижения ошибки, полное извлечение аналита позволяет обходиться более простыми методами калибровки [43], и, вероятно, сводит к минимуму возможную систематическую ошибку анализа.

Несмотря на то, что из-за высокого извлечения динамическая экстракция в общем случае кажется более надёжной, чем статическая, последняя зачастую позволяет добиться большей степени концентрирования, а, следовательно, более низкого LOD и LOQ всего анализа. Действительно, рассмотрим моделируемый случай (Рисунок 6). В динамической экстракции при 90% степени извлечения, мы можем взять объём пробы в 10 раз больший, чем объём сорбента и десорбировать аналит 3 объёмами элюента, в этом случае мы получим 3.3 кратное концентрирование. В случае же статической экстракции, при 20% извлечении можно взять 50 объёмов пробы и 1 объём элюента в результате получится 10ти кратное концентрирование.

Другое преимущество статической ТФЭ перед динамической заключается в том, что она позволяет легко работать с очень малыми объёмами пробы. В самом распространённом формате динамической ТФЭ используются колонки с навеской сорбента около 100 мг, иногда снижая до 10-30 мг, и обычно анализируют пробы объёмом 200 – 1000 мкл, но для десорбции зачастую берут такой же [44] или больший объём элюента [45; 46], следовательно, концентрирования не происходит.

При этом дальнейшее уменьшение навески сорбента и значительное уменьшение объёма элюирующего растворителя невозможно. В статической же экстракции можно использовать 5 мкг и менее сорбента, что пропорционально уменьшает необходимый объём пробы, а для неполной десорбции можно использовать небольшой объём растворителя, при этом возможно достичь концентрирования 10-100 раз, а иногда до нескольких тысяч [47], но при этом будет низкая степень извлечения.

Помимо двух основных стадий, сорбции и десорбции, твёрдофазная экстракция часто содержит дополнительные этапы, улучшающие качество экстракта. Кондиционирование – набор операций по предварительной активации сорбента. Гидрофобные сорбенты необходимо предварительно смачивать органическим растворителем, который затем удаляют водой. Ионообменные и лигандообменные сорбенты требуют перевода в рабочую форму. Используемый ранее картридж требует регенерации растворителем с высокой элюирующей силой. Финальным этапом кондиционирования является уравнивание сорбента с растворителем, в котором растворена проба.

После кондиционирования, анализируемый раствор приводят в контакт с сорбентом. Затем сорбент промывают растворителем, который не смывает целевой анализ, но десорбирует мешающие примеси. Дополнительной стадией, если необходимо, является химическая дериватизация образца на сорбенте [48]. Если растворитель, используемый для десорбции, не смешивается с водой, то сорбент подсушивают, пропуская поток воздуха. Даже в случае смешиваемого с водой элюента сорбент зачастую подсушивают, т.к. это увеличивает воспроизводимость и степень десорбции [30].

Перед тем как мы перейдём к обсуждению форматов ТФЭ и практических примеров анализа биологических жидкостей, рассмотрим современные сорбенты, которые используются для извлечения аналитов из биологических матриц.

1.3 Классические материалы ограниченного доступа (RAM)

Как было отмечено выше, белки являются основным матричным компонентом биологической жидкости и часто мешают анализу метаболома, поэтому стремятся удалить белки из образца. Существует простой подход, это использование для ТФЭ сорбента, который не поглощает белки, но поглощает малые молекулы. Такие сорбенты известны под названием “restricted access materials” (RAM, материалы ограниченного доступа) [49]. С их помощью можно получить свободный от белков экстракт аналитов всего в одну стадию без дополнительной химической, термической, или иной депротенизации.

Основная идея, которая лежит в основе практически всех RAM заключается в том, чтобы каким-либо образом экранировать от белков активные сорбционные центры, а доступную для белков поверхность сорбента сделать гидрофильной, что предотвращает сорбцию белков из водного раствора. Первый сорбент, построенный по этому принципу, был создан Helene и Pinkerton в 80х годах [18]. В качестве исходного материала использовался не модифицированный силикагель со средним диаметром пор 8 нм [50]. На схеме 1 изображены этапы модификации силикагеля. Глицерилпропильные группы были ковалентно пришиты к силикагелю с помощью силанизации γ -глицидоксипропилтриметоксисиланом. Затем спиртовые группы сорбента активировали карбонилдиимидазолом и связывали их с ди- или три-пептидом, глицин-(L-фенилаланин)_{1,2}.

Таким образом, на промежуточной стадии был получен силикагель внутренняя и внешняя поверхность которого покрыта гидрофобными фенильными группами. Большинство пор этого материала по размеру меньше, чем размер молекулы человеческого сывороточного альбумина, но, тем не менее, внешняя поверхность и поверхность крупных пор доступна для взаимодействия с гидрофобными группами белков. Чтобы избежать сорбции белков на таком материале, сорбент обрабатывали карбоксипептидазой А, этот фермент гидролизует пептид на поверхности гранул сорбента и на поверхности крупных пор, которые доступны для него.

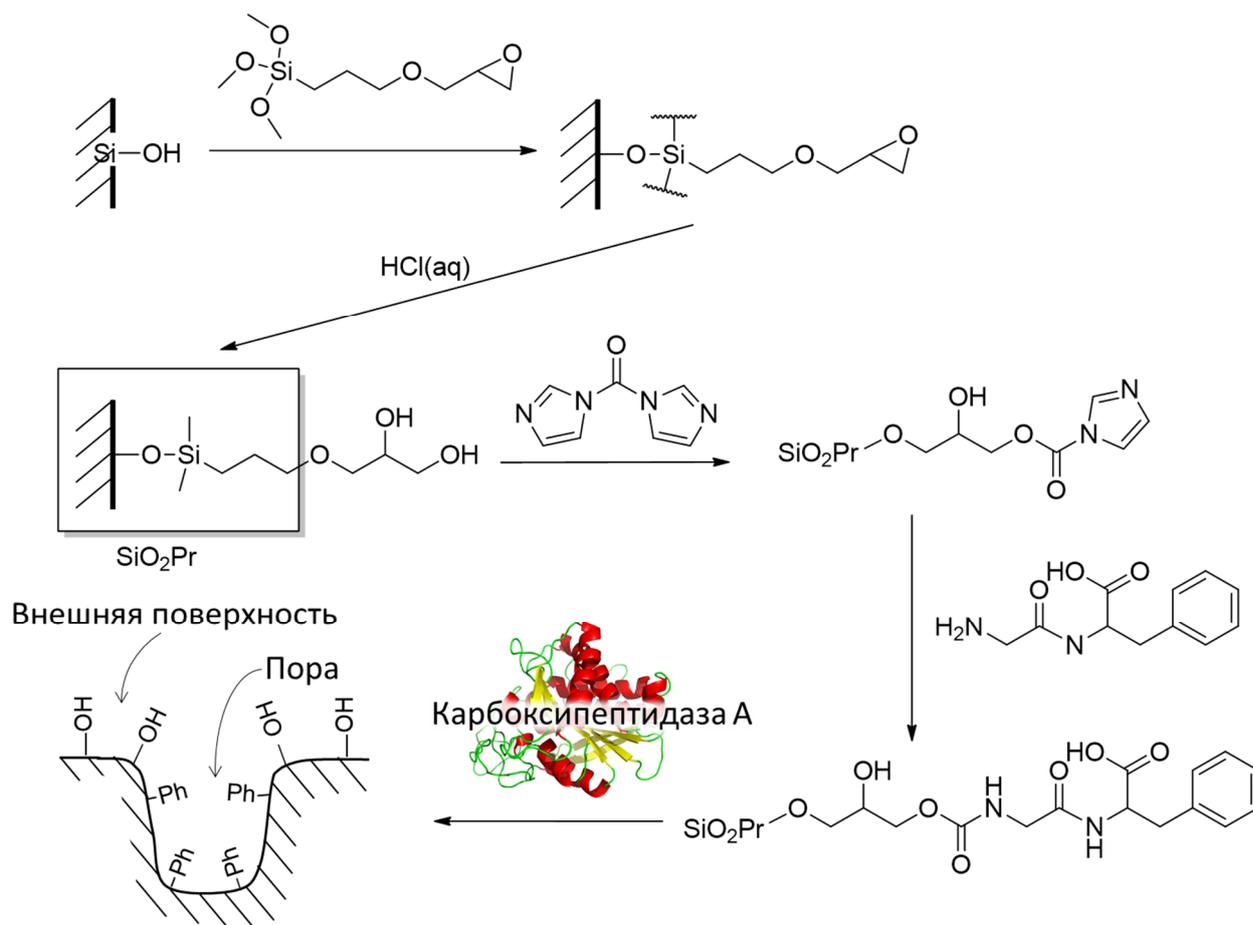


Схема 1. Синтез RAM на основе силикагеля

В той же работе, в которой описан синтез этого RAM [18] приведён пример разделения белков сыворотки крови и антиконвульсионных препаратов, фенобарбитала, карбамазепина и фенитоина после прямой инъекции 20 мкл сыворотки крови в хроматографическую колонку, заполненную 5 мкм гранулами силикагельного RAM. Хроматограмма представлена на Рисунке 4, видно, что препараты хорошо разрешены и отделены от белков сыворотки.

Другой метод создания RAM заключается в покрытии поверхности сорбента гидрофильным полимером, например, полиэтиленоксидом (Рисунок 5Б). Гидрофильный полимер в водной среде набухает и образует полупроницаемую оболочку на поверхности сорбента, которая проницаема только для малых молекул. Механизм исключения белков при работе с таким сорбентом предложено называть “химическим диффузионным барьером” [49]. К этой же группе относят силикагели, покрытые сшитыми глобулярными белками.

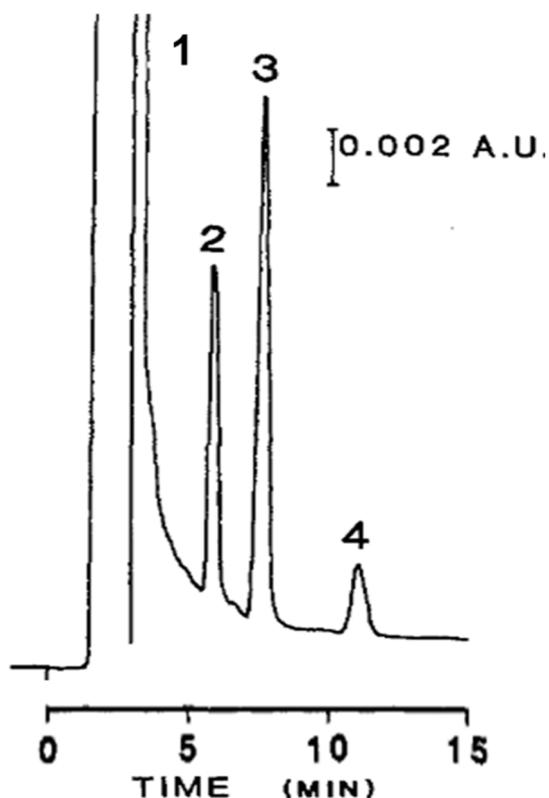


Рисунок 4. Хроматограмма сыворотки крови содержащей антиконвульсионные препараты: (1) сывороточные белки, (2) фенобарбитал, (3) карбамазепин, (4) фенитоин. Колонка 250x4 мм. Элюент АСН + 0.1М фосфатный буфер рН 6 (20:80 об/об), скорость потока 1 мл/мин. УФ-детектор, 254нм. [18]

Силикагельные РАМ плохо подходят для ТФЭ по ряду причин. Во-первых, для ТФЭ важна высокая сорбционная ёмкость сорбента, а силикагели обладают очень низкой предельной сорбционной ёмкостью. Во-вторых, силикагели слабо удерживают полярные соединения, или хорошо удерживают только малую группу соединений, специфичную для конкретного силикагеля, т.е. они не обладают универсальностью, которая необходима для одновременной экстракции разнообразных молекул метаболома. В-третьих, силикагели не стабильны при низких и высоких рН, а закисление или защелачивание пробы необходимо для экстракции кислотных или основных соединений. Силикагельные РАМ нашли применение только в качестве сорбентов для хроматографических колонок или для *On-line* сорбционных картриджей [51], но не для остальных форматов ТФЭ, где озвученные выше недостатки являются критическими.

В отличие от силикагелей, полимерные сорбенты обладают большей сорбционной ёмкостью или аффинностью, способны эффективно удерживать

полярные вещества и стабильны в широком диапазоне pH, поэтому очень перспективны для ТФЭ метаболома из биоматриц.

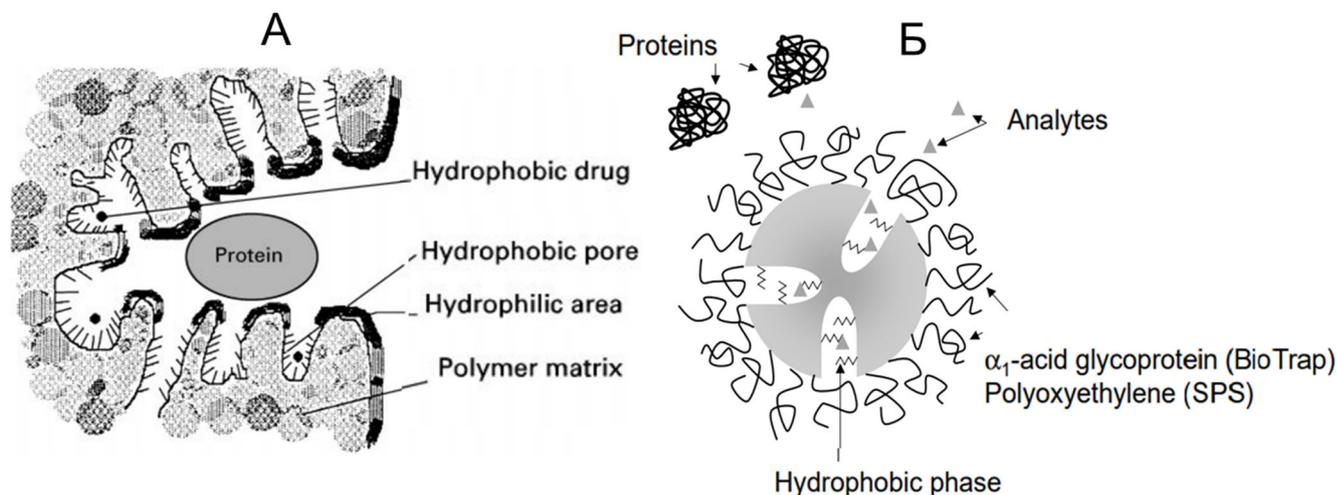


Рисунок 5. Два основных способа экранирования сорбционных центров. А – физический диффузионный барьер, Б – химический. [49; 51]

В последнее время проводится множество разработок по созданию молекулярно-отпечатанных полимеров (*Molecularly Imprinted Polymer*, **MIP**) и RAM на их основе (*Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers*, **RAMIP**). MIP представляет собой сетчатый сополимер, синтезируемый исходя из мономеров, которые образуют комплекс с молекулами шаблона (*template*). Шаблон может быть связан с мономерами за счёт сильных межмолекулярными связей или ковалентно [52]. После формирования сетки шаблон удаляют, и в результате образуется полость (молекулярный отпечаток), которая обладает высокой аффинностью к шаблону и структурно похожим веществам. Можно заметить, что полученная описанным выше образом полость должна быть закрытой. Поэтому полимеризацию ведут на поверхности какой либо подложки, например, на магнитите, получая магнитный композитный сорбент с тонким поверхностным слоем MIP [53], либо синтезируют MIP в присутствии порогена, таким образом получается материал с порами молекулярного размера и крупными транспортными порами сформированных порогеном.

В качестве примера приведём работу [54], в ней описан синтез MIP для ТФЭ домперидона из сыворотки крови. Сополимеризацию бифункционального

этиленгликоля диметакрилата с метакриловой кислотой проводили в присутствии хлороформа, в качестве разбавителя, и домперидона, в качестве шаблона. Полученный МІР не является РАМ, поэтому ТФЭ в этой работе проводили после депротеинизации сыворотки. Обратим внимание на то, что МІР в общем случае не является РАМ. Это может показаться странным, т.к. используемые молекулярные шаблоны на порядки меньше крупных белковых молекул. Дело в том, что при синтезе МІР образуются крупные поры. Поверхность этих пор, хоть и является гидрофильной (т.к. сформирована полярными мономерами), по всей видимости, способна удерживать белки [55].

Для синтеза МІР, которые не удерживают белки, применяют 2 основных подхода, которые аналогичны описанным выше подходам к созданию силикагельных РАМ [12]. Первый подход заключается в покрытии поверхности МІР сшитым альбумином. Такая поверхность обладает высокой толерантностью к белкам при рН 6-8. Однако белковая оболочка не долговечна и может легко разрушаться. Во втором подходе модифицируют поверхности МІР гидрофильными спиртовыми группами. Для этого начинают синтез МІР обычным способом. Спустя несколько часов после начала полимеризации к реакционной массе добавляют гидрофильные момеры (моно- и ди-метакрилаты глицерина, гидроксиэтилметакрилат, глицедил метакрилат с последующим раскрытием цикла [56]) которые образуют гидрофильную оболочку на поверхности глобул МІР.

Высокая селективность МІР одновременно является преимуществом и недостатком. ТФЭ с помощью МІР позволяет получать очень чистые экстракты целевых аналитов, которые можно анализировать на относительно простых аналитических приборах. С другой стороны, МІР не подходят для одновременного определения широкого круга разнородных аналитов, что требуется при скрининговых исследованиях нецелевой метаболомики. В целом разработано множество таких РАМІР, для селективной экстракции аналитов из биологических жидкостей. Однако, эти методы пока не нашли применения в рутинном анализе.

1.4 Сверхсшитый полистирол

Классом полимерных сорбентов, которые всё шире используются в ТФЭ метаболитов из биологических жидкостей, являются сверхсшитые полимеры (“Davankov resins”), они обладают уникальной структурой и свойствами, противоречащие некоторым устоявшимся воззрениям на классические полимерные сетки.

Принцип синтеза таких материалов заключается в формировании сильносшитой жёсткой сетки в среде сольватирующих растворителей [1; 57]. Реализовать этот принцип на практике можно, используя полимеризацию, поликонденсацию или сшивание полимерных цепей. Примером сверхсшитого полимера, полученного по первому пути, является полидивинилбензол [58]. Такие коммерчески успешные сорбенты для ТФЭ как Amberlite XAD-4 (DOW chemical), Oasis HLB (Waters), и Strata-X (Phenomenex), по-видимому, являются сверхсшитыми полимерами с высоким содержанием ДВБ [1].

К сверхсшитым полимерам относят [58; 59] самополиконденсационные полимеры, полученные по реакции Ф-К исходя из п-кислилендинхлорида [58; 60], 1,4-бис-(хлорметил)-дифенила [61], 1,4-бензолдиметанола [62] и многие др. [59; 63]. Полимеры полученные поликонденсацией незамещённых ароматических соединений с различными сшивающими агентами [64–66], а так-же полученные исходя из трифенилфосфина [67–69], трифениламина [70–72], тиофена [73], пиррола [73] карбазола [74] и других фенил содержащих соединений [75], гетероароматических соединений [76; 77] и металлоорганических соединений [78].

Также к сверхсшитым материалам можно отнести аморфные органические микропористые соединения [79–81], полученные с помощью отличных от Ф-К реакциям сшивания. Кроме того, к сверхсшитым материалам относят фотоотверждаемые силациклубутан циклосилоксаны [82], микро- мезопористые сшитые силсеквиоксаны, полученные на основе бис- и трис- триэтоксисилил арилов [83] или замещённых силсеквиоксанов [84–86], или микропористые полиамиды, полученные из тетра(N,N-дифениламино)-9,9’спиробифлуорена и пиромеллитового диангидрида [62].

Практически все поликонденсационные сверхсшитые сетки являются высокопористыми продуктами и имеют частицы неправильной формы, вероятно, это сильно ограничивает их практическое применение. Но стоит отметить, что всё же возможно сформировать поликонденсационную сетку в виде сферических частиц. Например, в работе [87], были получены гранулы полибисхлорметилдифенила в результате самополиконденсации мономера по Ф-К в нитробензольном растворе, который был суспензирован в силиконе.

Сверхсшитыми материалами является гидрофильные ионные полимеры, полученные сшиванием 4-фенилпиридина и п-ксилилендихлорида [88] или полученные комбинированным методом одновременной поликонденсации путём алкилирования по ароматическому азоту и спонтанной полимеризации ванильных групп, исходя из 4-винилпиридина и п-кислилендинхлорида [89] или 4-винилпиридина и 4-винилбензилхлорида [90].

Сшиванием полимерных цепей по Ф-К были получены полиарилаты и полисульфоны [58], сшиванием ди- и три-йодметаном по азоту получены сверхсшитые полианилин [91; 92] и полипирол [91].

Родоначальник класса сверхсшитых материалов был разработан в 1969 году Даванковым, Цюрупой и соавт. [93; 94], им является сверхсшитый полистирол на основе линейного полистирола и гелевых сополимеров стирола (Ст), гибкие цепи которых были сшиты п-кислилендихлоридом с образованием дифенилксилиленовых жёстких и длинных мостиков-распорок, или сшитые с помощью монохлордиметилового эфира, в результате чего образуются жёсткие дифенлметановые мостики-распороки, или же другими сшивающими агентами.

Сверхсшитый полистирол на основе линейного предшественника получают в виде блока, который дробят с получением частиц неправильной формы. Оптимальной же формой частиц для большинства форматов ТФЭ, как будет показано позже, является сферическая. Такая форма частиц обеспечивает наименьшее размытие концентрационного фронта аналита и низкое противодействие, создаваемое слоем сорбента. Поэтому первой стадией в получении сорбентов для ТФЭ на основе ССП является синтез сферических гранул

сетчатого полистирольного форполимера с диаметром частиц 30-120 мкм. Для этого лучше всего подходит радикальная сополимеризация стирола с дивинилбензолом, выполненная в дисперсионной, зародышевой или суспензионной технике [95]. На второй стадии сферические частицы сополимера сшивают, получая высокопористый сорбент.

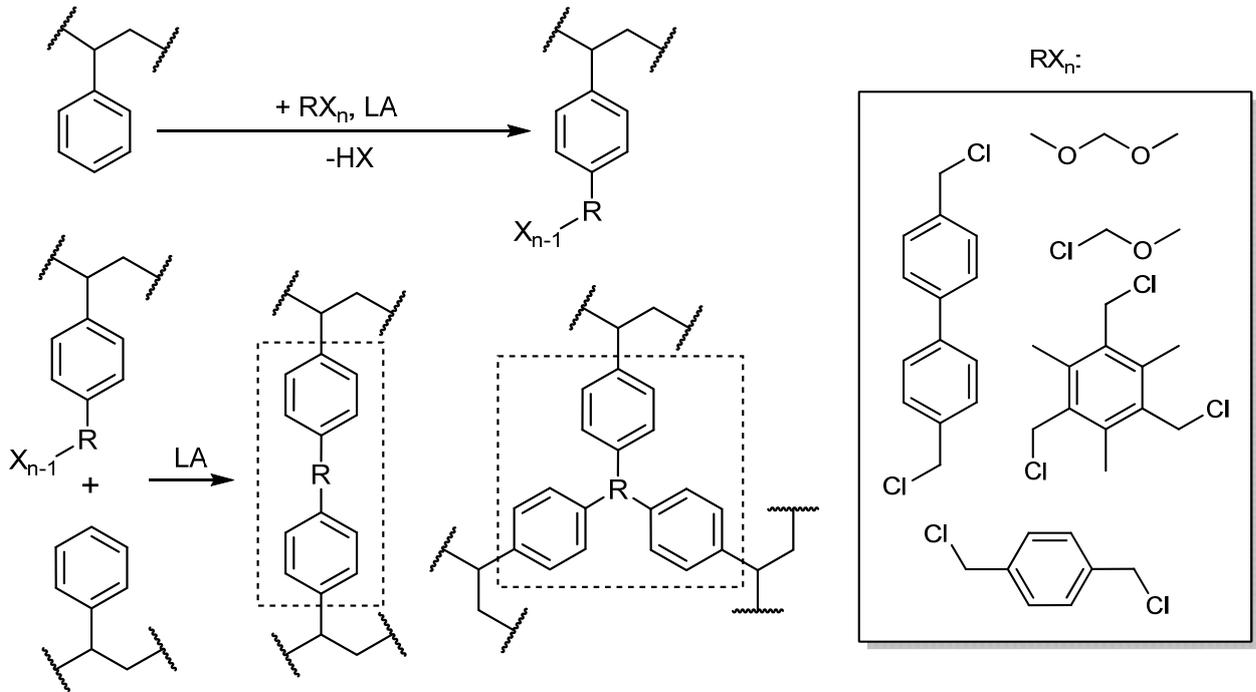


Схема 2. Сшивка по Ф-К. LA – кислота Льюиса.

Под степень сшивки (X) будем подразумевать отношение числа сшивок к общему числу структурных единиц полимера (сумма мостиков и незамещённых фенолов) по аналогии с гелевыми сополимерами стирола и ДВБ. В таком случае максимальная степень сшивки составляет 100%. Если же каждый фенил участвует более чем в одной сшивке, ($X > 100\%$), то под степень сшивки будем подразумевать число метиленовых групп, связывающие два фенола исходного полистирола.

$$\begin{cases} X[\%] = \frac{Z}{Z + (1 - fZ)} \times 100, & fZ < 1 \\ X[\%] = fZ \times 100 & , fZ > 1 \end{cases} \quad (3)$$

здесь, Z – количество сшивателя на одно стирольное звено, f – функциональность сшивающего агента.

Сверхсшитый полистирол получают из полистирола по реакции Ф-К с такими сшивающими агентами как, монохлордиметиловый эфир (МХДЭ) [96], другие эфиры вида ROCH_2Cl [97], п-ксилилендихлорид [98–101], 1,4-бис-(хлорметил)-дифенил [98; 102; 103], 1,3,5-трис-(хлорметил)-мезителеном [102], диметоксиметан (ДММ) [103–106], 1,2,3,4-тетра-(хлорметил)-бензол [107], цианурхлорид [108], параформальдегид [109; 110]. SOCl_2 и SO_2Cl_2 могут образовывать тиольные мостики по реакции Ф-К [111], и видимо, эту реакцию тоже можно использовать для получения ССП, однако сетки, полученные таким образом, к сожалению, изучены лишь в одной работе [112] методом твёрдотельного ЯМР, без обсуждения свойств и пористой структуры. Соединения типа 1,4-диметоксибензола [66], и 9,10-бис(хлорметил)антрацена [61] сопополиконденсируются с образованием сверхсшитых сеток, и, вероятно, могут вступать в реакцию с полистиролом, однако в литературе нет охарактеризованных сверхсшитых сеток, полученных таким образом.

Как уже отмечалось выше, арильные сшиватели в которой есть незамещённые водороды в ароматическом кольце п-ксилилендихлорид, 1,4-бис-(хлорметил)-дифенил и др. способны к самоконденсации с образованием сетчатого полимера [58; 60; 61]. Это осложняет их использование для структурирования сополимеров стирола с ДВБ, поскольку объемный продукт конденсации части сшивающего агента в межгранульном пространстве может диффундировать лишь в поверхностные слои гранулы и там реагировать с сополимером. В результате образуется довольно плотная оболочка, ухудшающая свойства конечного сорбента.

Другим методом получения ССП, который используют главным образом в промышленности [113; 114], является двухстадийный процесс, в котором хлорметиловый эфир стирола (Ст-ДВБ) сополимера проводят отдельно от стадии сшивки. В лабораторных условиях сополимеры полностью хлорметируются МХДЭ в мягких условиях в присутствии SnCl_4 в качестве катализатора [115], однако, в техническом МХДЭ, вероятно, содержится примесь канцерогенного бисхлордиметилового эфира [116], а SnCl_4 являются хоть и удобным, но дорогим, токсичным, коррозирующим и экологически небезопасным реактивом. Всё это

побудило к созданию множества альтернативных способов хлорметилирования, не использующих чистый эфир и хлорид олова. Эти методы представлены в обзоре Camps и соавт. 1987 г. [117]. Большинство способов основано на образовании МХДЭ *in situ* по реакции $\text{CH}_2\text{O} + \text{MeOH} + (\text{SOCl}_2 \text{ или } \text{SO}_2\text{Cl}_2 \text{ или } \text{ClSO}_3\text{H})$, а также по реакции $(\text{MeO})_2\text{CH}_2 + (\text{SOCl}_2 \text{ или } \text{SO}_2\text{Cl}_2 \text{ или } \text{ClSO}_3\text{H})$ в присутствии кислоты Льюиса.

Безопасный промышленный процесс хлорметилирования является ноу-хау производителей, а в научной литературе присутствует очень небольшое число публикаций, посвящённых разработке и изучению новых, дешёвых и безопасных методов хлорметилирования не использующих эфир [118–120]. Перспективным, дешёвым и относительно зелёным методом хлорметилирования сополимеров стирола с ДВБ может являться реакция Бланка в присутствии ионных жидкостей или полиэтиленгликоля в качестве катализаторов межфазного переноса. Эти методы успешно применены для хлорметилирования широкого круга низкомолекулярных соединений [119; 121], однако, нет опубликованных примеров применения этих реакций к Ст-ДВБ сополимерам.

Хлорметилирование и процесс образования дифенилметановых мостиков имеют схожий механизм, поэтому неудивительно, что основным побочным продуктом хлорметилирования является образование дополнительных сшивок. Это особенно важно в производстве анионитов, где степень сшивки влияет на осмотическую прочность и проницаемость ионообменника. В работе [122] изучали количество введённых мостиков в сополимер с 6% ДВБ при хлорметилировании с образованием МХДЭ *in situ* по удобному лабораторному методу с использованием параформальдегида, метанола, воды и хлорсульфоновой кислоты. В результате 75% хлорметилирования дополнительно образуется ~4% метиленовых сшивок, т.е. общее количество сшивок увеличилось с изначальных 6% до 10%.

При хлорметилировании форполимеров с низким содержанием ДВБ, в достаточно мягких условиях с высокой селективностью получается термодинамически выгодный пара-замещённый продукт (90-99%) [117]. В более жёстких условиях, в которых происходит сшивка, вероятно, реализуется

кинетический контроль реакции и получаются как пара- так и орто- и мета- продукты [1]. Кинетический контроль образования мостиков при реакции сшивки МХДЭ подтверждается экспериментально. На ИК спектрах ССП со степенью сшивки 100% наблюдается две полосы 700 см^{-1} и 760 см^{-1} , характерные для незамещённых фенилов, следовательно, продукт должен содержать как незамещённые, так и полизамещённые фенилы для сохранения в среднем 100% сшивки [1]. Аналогичный вывод о статистическом замещении подтверждается в компьютерных симуляциях синтеза ССП исходя из полистирола и МХДЭ [123] или поли-винилбензолхлорида [124; 125].

Третий способ синтеза ССП заключается в одностадийной сшивке сополимера, полученного на основе функционализированного стирола. Этот метод часто используют для получения ССП в лабораторных условиях исходя из сополимеров, содержащих винилбензилхлорид (**ВБХ**). Однако, ВБХ является сильным лакриматором, что ограничивает его применение. В работе [126] исследовались сорбенты, полученные как из чистого пара- ВБХ, так и из технической смеси пара/мета- изомеров. Авторы выяснили, что свойства полученных сополимеров и соответствующие сверхсшитые продукты значительно отличаются из-за сильного гидролиза пара-винилбензилхлорида во время суспензионной полимеризации.

В качестве катализатора при получении ССП по реакции Ф-К, обычно используют сильные кислоты Льюиса, такие как AlCl_3 , FeCl_3 , SnCl_4 , ZnCl_2 , TiCl_4 , SbCl_5 [1; 127]. Лабораторно удобным является SnCl_4 , т.к. он растворим в используемых для синтеза ССП растворителях и обеспечивает довольно плавное течение реакции. Тем не менее SnCl_4 используют редко по упомянутым ранее причинам, кроме того, SnCl_4 сильно дезактивируется метанолом, который выделяется в результате сшивки МХДЭ или ДММ [106; 128; 129]. Поэтому при получении высокопиристого продукта обычно используют моль SnCl_4 на моль сшивателя. FeCl_3 гораздо активнее и дешевле SnCl_4 , поэтому нашёл широкое применение в промышленном и лабораторном синтезе и ССП. AlCl_3 так-же используют для получения ССП по реакции Ф-К, однако он приводит к продуктам

с меньшей пористостью чем FeCl_3 [130], вероятно, из-за своей большей жёсткости как кислоты Льюиса, и вытекающей из этого способности к разрушению полистирольных цепей вплоть до получения растворимых продуктов. То же самое, но в меньшей степени, касается и FeCl_3 , который может вызывать разрушение полимера. ZnCl_2 эффективно катализирует реакцию сшивки только в нитробензоле, в ДХЭ получается продукт с низкой пористостью [131]. Также ZnCl_2 является крайне гигроскопичным и губительным для микробиологической очистки воды, что запрещает его применение в промышленном хлорметилировании и получении ССП.

Растворитель для реакции получения ССП должен хорошо растворять полистирол, не должен реагировать с полистиролом и сшивающим агентом и в нём должна протекать реакция Ф-К. Этим требованиям отвечают хлоралканы, нитробензол и циклогексан. Обычно используют дихлорэтан (ДХЭ), хотя реакция Ф-К в нём идёт медленнее, чем в нитробензоле (при одинаковой температуре) [132]. Причина того, что нитробензол редко используют для получения ССП, заключается в том, что нитробензол токсичнее дихлорэтана, и его очень сложно полностью удалить из матрицы сорбента после синтеза. Также стоит отметить, что сверхсшитый полистирол, полученный в нитробензоле, имеет несколько иные свойства, чем полученный в ДХЭ [133–135], например, обладает большей полярностью. Это связывают с реакциями окисления полистирольной матрицы нитробензолом [136; 137].

Интересными растворителем является циклогексан, из-за низкой диэлектрической проницаемости реакция Ф-К в нём идёт медленнее, чем в ДХЭ, это вынуждает использовать большое количество катализатора. Однако полученный в циклогексане ССП обладает рядом особенных свойств, чётко выраженной бипористой структурой при использовании линейного полистирола, и высокой сорбционной ёмкостью [138].

В некоторых работах сделано предположение, что хлоралканы CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 , 1,2-дихлорэтан, 1,2-дихлорбутан и др., способны выступать в качестве сшивающих агентов, образуя соответствующий мостик [139–142]. Однако,

достаточно тщательный анализ природы мостиков в сверхсшитом полимере, полученном конденсацией бифенила и хлороформа, выполненный в работе [143] с помощью C^{13} твердофазного ЯМР позволяет заключить, что С-С-кросс сочетание по Шоллю доминирует над образованием мостика из растворителя при использовании $AlCl_3$ в качестве катализатора (Схема 3). В работе [144] показано, что продукты конденсации дифенилбензола и CH_2Cl_2 или $CHCl_3$ в присутствии $AlCl_3$ имеют отличающиеся спектры ИК и ЯМР. На основании спектров авторы делают вывод, что $CHCl_3$ не реагирует как кросс-агент, а CH_2Cl_2 , напротив, образует метиленовую сшивку, кроме того, спектры продуктов сшитых CH_2Cl_2 и метилалем аналогичны, что подтверждает сделанный вывод.



Схема 3. Реакция Шоля.

В работе Fada Li и соавт. [142] была сравнена пористость и сорбция фенола на гранулах ССП, полученных из сополимера стирола с 6% ДВБ, с помощью сшивки в присутствии $AlCl_3$ в растворителях CH_2Cl_2 , ДХЭ и $CHCl_3$. Авторы работы указывают, что после сшивки в полимерах обнаруживается 0.3–3.6%_m Cl, поэтому авторы делают вывод, что все используемые растворители реагируют как сшивающий агент. Удельная поверхность, пористость и набухание в воде возрастала в ряду используемых растворителей: ДХЭ \ll $CH_2Cl_2 \leq CH_2Cl_2$. Этот ряд согласуется с жёсткостью образуемых мостиков. Однако сорбция фенола оказалась выше на полимере сшитом CH_2Cl_2 . Аналогичным методом, используя $FeCl_3$ и CH_2Cl_2 , были получены гранулы сверхсшитого поливинилфенола [145].

Четырёххлористый углерод в присутствии $AlCl_3$ так же используется для синтеза ССП, однако структура и функциональность образующихся сшивок достоверно не установлена. Вероятно образуется сшивка $-CCl_2-$, которая легко гидролизуется до кетогруппы при промывке полимера [146–149].

Ещё одними интересными растворителями являются высококипящие хлоралканы. Urban и соавт. [110] синтезировали пористый монолит ВВХ-Ст-ДВБ в кварцевом капилляре, а затем сшили полученный монолит в разных условиях,

используя SnCl_4 , FeCl_3 или AlCl_3 в качестве катализаторов, и 1,2-дихлорэтан, 1,2-дихлорбутан или 1,2-дихлоргексан в качестве растворителей. Авторы наблюдали, что разные растворители и катализаторы приводят к сверхсшитым монолитам с различной пористостью и хроматографическими свойствами.

В заключении отметим, что механохимическим способом возможен синтез ССП в присутствии FeCl_3 из низкомолекулярных ароматических соединений в присутствии FeCl_3 без применения растворителя [150] и сшивающих агентов [151].

1.5 Структура и основные свойства сверхсшитого полистирола

Сверхсшитый полистирол обладает рядом уникальных свойств, которые не присущи классическим сетчатым материалам, благодаря чему нашёл широкое применение во множестве практических приложений.

Первая важная особенность сверхсшитого полистирола заключается в очень низкой плотности упаковки полимерных цепей как в сольватированном, так и сухом состоянии. Это свойство ССП является следствием введения большого числа жёстких мостиков-распорок между сольватированными полистирольными цепями. Эти мостики фиксируют полимерные цепи в конформациях, близких к конформации исходных набухших цепей, и не дают полимерным цепям плотно упаковаться даже при удалении растворителя из полученного набухшего продукта. Это приводит к возникновению полимера с высокой пористостью в сухом состоянии.

Вообще говоря, ССП, полученный на основе набухших сополимеров стирола с дивинилбензолом в достаточно высокой концентрации цепей, является прозрачным, нерассеивающим видимый свет материалом, следовательно, однофазен на этом масштабе (а по данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), многие образцы ССП однородны и на меньших масштабах [1; 152], например, Рисунок 6Б [153]). Однородность на таком масштабе и наличие большого свободного объёма не противоречат друг другу. Дело в том, что “порами” ССП являются пустоты между цепями полистирола, которые разделены жёсткими мостиками-распорками, и, следовательно, малы. Сильное некомпенсированное

силовое поле в таких структурах обуславливает способность ССП поглощать большое количество инертных газов при низкой температуре, что приводит к измерению огромной кажущейся удельной поверхности.

Стандартным методом оценки внутренней удельной поверхности высокопористых материалов является измерение изотермы адсорбции азота или аргона при 77К и последующий расчёт поверхности по теории Brunauer–Emmett–Teller (БЭТ) или Ленгмюра [35; 154]. Изотерма адсорбции азота на ССП, полученных самосшиванием сополимеров винилбензилхлорида с 2- 10% ДВБ [153], или на основе гелевого сополимера стирола с $\geq 1\%$ ДВБ [1] относится к I(b) типу по классификации ИЮПАК [154] Рисунок 6В. Этот тип изотермы характерен для преимущественно микропористых материалов (диаметр пор < 2.5 нм), которые содержат микропоры разного размера, и, возможно, малые мезопоры (такие сорбенты можно называть нанопористыми). Чем выше набухание исходного полимера, тем больше наклон изотермы адсорбции азота в области относительных давлений $p/p_0 > 0.05$, (Рисунок 6В образец с 1% ДВБ [153]). Это говорит об увеличении среднего размера пор с уменьшением плотности сетки форполимера. Изотермы адсорбции азота на ССП, полученных на основе о гелевых прекурсоров, например, на сополимере винилбензилхлорида с 0.5% ДВБ [153], или на основе гелевого сополимера стирола с 0.3% ДВБ [155] можно отнести к IV(a) типу по классификации IUPAC.

Такие изотермы характерны для материалов, содержащих мезопоры шириной более 4 нм [154]. Действительно, на СЭМ изображениях образца с 0.5% ДВБ наблюдаются поры размером около 10 нм (Рисунок 6А), а на изображении образца с 2% ДВБ пор крупнее 4 нм нет.

Существует несколько методов расчёта распределения пор по размеру в микропористых материалах, исходя из изотерм адсорбции газов, основные из них МР-метод (*MicroPore analysis method*) [156], DA-метод Дубинина и Астахова [35], НК-метод Horvath-Kawazoe [157] и NLDFТ (*Non-Local Density Functional Theory*, теория нелокального функционала плотности) [125]. Все эти методы используют модели щелевидных или цилиндрических пор какие применяются для расчета

параметров таких сорбентов, как активированные угли, цеолиты, силикагели и др., но эти методы не могут быть обоснованно применены к расчету параметров пористой структуры ССП. В первую очередь потому, что в структуре ССП нет ни цилиндрических ни щелевидных пор. Несмотря на это, метод NLDFT в сочетании с моделью щелевидных пор часто используют и для расчёта пористой структуры ССП [144; 153; 158–160]. К сожалению, не все авторы обращают внимание на допущения используемого в работе алгоритма NLDFT.

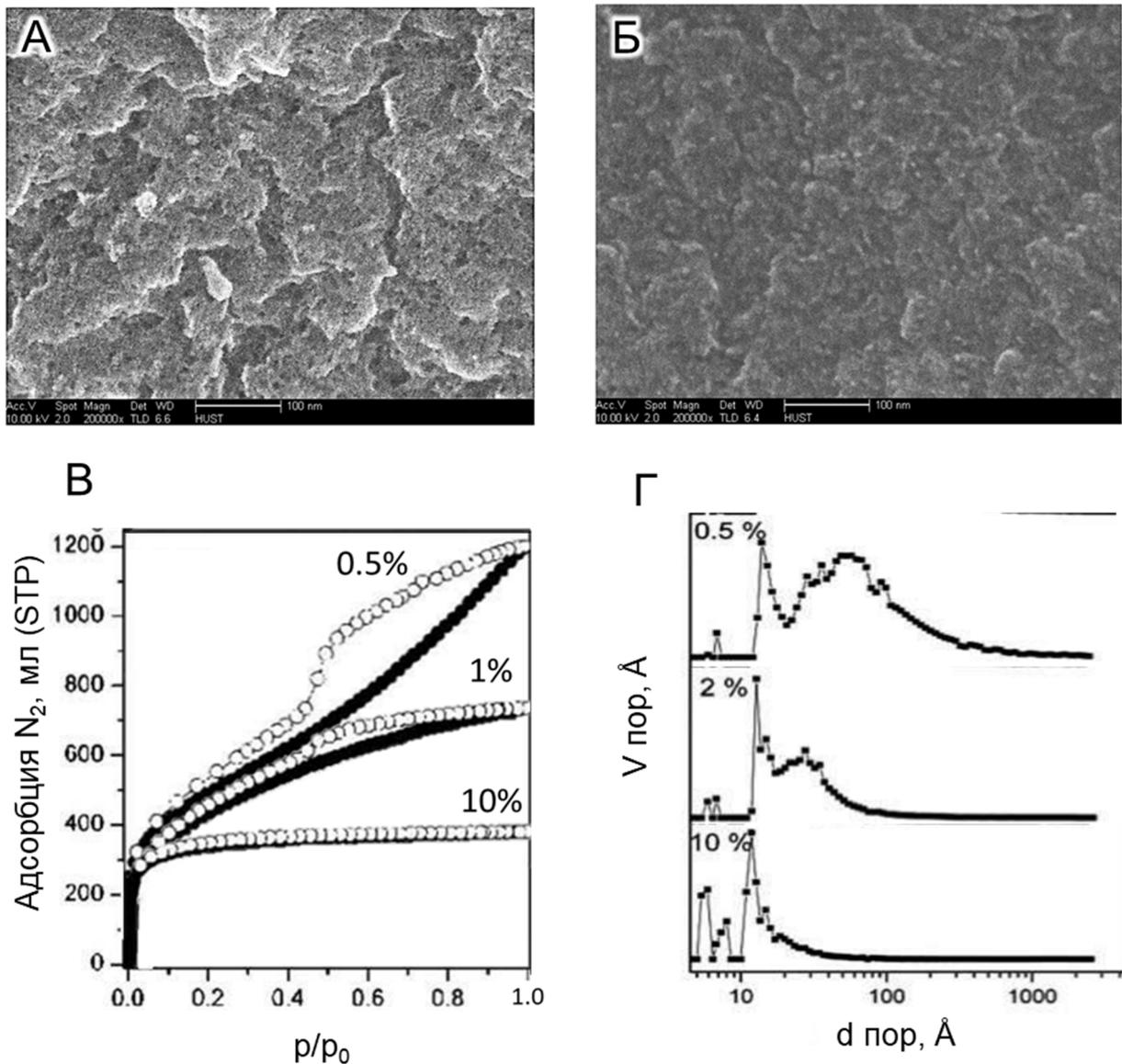


Рисунок 6. Изображения СЭМ сверхкритического полистирола, полученного на основе (А) гелевого сополимера ВВХ с 0.5% ДВБ, и (Б) с 2% ДВБ. (В) изотермы аналогичных ССП с различным содержанием ДВБ, (Г) распределение объёма пор по размеру. [153]

Kurpan и соавт. [125] обратили внимание на то, что метод NLDFT не применим для корректного расчёта распределения пор по размеру в микропористых аморфных полимерах. Авторы работы модифицировали метод NLDFT, откалибровав его для структуры ССП, смоделированной с помощью молекулярной динамики [124; 161]. В работе [125] показано, что применение стандартного метода NLDFT к сверхсшитому сополимеру винилбензилхлорида с 2% ДВБ даёт бимодальное распределение пор по размеру с $d^* \approx 5-8 \text{ \AA}$ и $d \approx 10-15 \text{ \AA}$, в то время как модифицированный метод показывает унимодальное распределение пор в диапазоне $d \approx 2-14 \text{ \AA}$. Корректность такого метода вызывает вопросы, т.к. подобные уширения показывают поры $2-3 \text{ \AA}$, которые не могут определяться азотом, размер молекулы которого 3.54 \AA , однако пустоты такого малого размера, несомненно, присутствуют в структуре ССП, но не доступны для азота.

Хотя стандартный метод NLDFT неприменим для количественного описания микропористой структуры, по всей видимости, он даёт качественно верную картину в области мезо- и малых макропор. Так, в упомянутой выше работе Вуй Ли и соавт. [153] была синтезирована серия образцов ССП на основе сополимера винилбензилхлорида с 0,5-10% ДВБ. Метод NLDFT показывает, что с уменьшением содержания ДВБ в форполимере размер и объём мезопор в ССП растёт, тогда как объём и размер микропор остаётся практически неизменным. Поры диаметром более 5 нм наблюдаются методом NLDFT в образцах, содержащих менее 1% ДВБ, тот же вывод можно сделать на основании СЭМ изображений, представленных в той же статье (Рисунок 5В).

Схожий результат даёт аннигиляция позитрония, представляющего собой связанную пару электрона и позитрона. Время жизни позитрония пропорционально длине его свободного пробега в поре до аннигиляции при контакте со стенками пор. В стеклообразном атактическом непористом линейном полистироле размер основных фрагментов свободного объёма по расчёту составляет величину порядка $d = 4-6 \text{ \AA}$ [162; 163]. Однако к этим пустотам нет диффузионных путей, доступных

* d- диаметр поры

для газов, поэтому эти пустоты не измеряются адсорбционными методами. После введения 100% сшивок в сополимер стирола с 0.3% ДВБ существовавший в исходном полимере свободный объём становится доступным, по крайней мере, для азота. В структуре появляется два максимума $d \sim 11 \text{ \AA}$ (7.5%_v) и 27 \AA (92%_v). Этот метод также указывает на то, что с повышением набухания исходного форполимера объём и размер крупных пор увеличивается, а микропористая составляющая остаётся практически неизменной [164; 165].

В сорбционных процессах используют сольватированный водой или другими растворителями ССП. При контакте с этим и средами ССП набухает, т.е. увеличивает свой объём. Следовательно, пористая структура сухого образца не характеризует структуру набухшего полимера. Методом обращённой эксклюзионной хроматографии были изучены поры промышленного сверхсшитого сорбента MN-200 в среде ТГФ [166]. Выяснено, что объём пор этого сорбента одинаково доступен для малых алканов C5-C7, а начиная с октана часть порового пространства становится недоступной. Авторы этой работы пришли к заключению, что нижняя граница размера микропор этого сорбента составляет примерно 7 \AA .

Другим методом изучения пористой структуры набухшего образца является ЯМР криопорометрия. Метод основан на измерении подвижности протонов воды, замороженной в порах, при постепенном отеплении образца [167]. Вода в порах сшитого МХДЭ (X=200%) сополимера стирола с 1.4% ДВБ плавится в широком интервале температур, что говорит о широком распределении пор по размерам. Тот же сополимер, сшитый на 100% ,и сшитые сополимеры с 0.5% ДВБ [168] демонстрируют два максимума плавления воды, основной при $-80..-60^\circ\text{C}$, что соответствует самым маленьким порам полимера, и небольшой от -30 до -20°C , что может говорить о наличии более крупных пор. Особенно чёткий высокотемпературный максимум плавления воды наблюдается в гелевом рыхлом сополимере стирола с 0.17% ДВБ, сшитом на 100 и 200% [167], и на основе сополимера с 0.5% ДВБ, сшитого на 500% [169]. Не исключено, что данные сорбенты обладают бипористой структурой.

Вторая важная особенность сверхсшитого полистирола заключается в его способности увеличивать объём, т.е. набухать в любых растворителях, включая воду. Этот факт довольно удивителен, т.к. вода является нерастворителем для полистирола.

На Рисунке 7А двойной линией изображена зависимость весового набухания в толуоле стандартных гелевых сополимеров стирола с дивинилбензолом от содержания ДВБ. Набухание гелевых сополимеров резко падает с увеличением доли ДВБ, и составляет всего 0.2 мл/г при 20% содержании ДВБ. В воде и метаноле гелевые полистиролы не набухают.

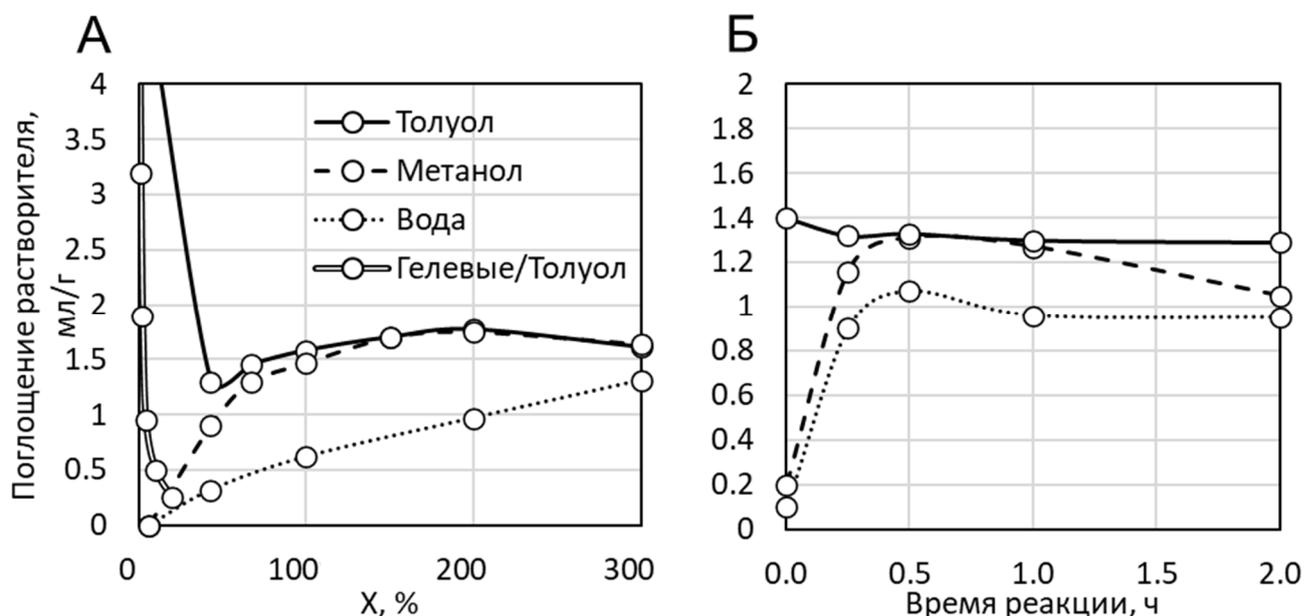


Рисунок 7. Поглощение растворителей сверхсшитым полистиролом, (А) в зависимости от степени сшивки МХДЭ сополимера стирола с 0.6 % ДВБ, (Б) в зависимости от времени реакции самосшивки сополимера ВБХ с 2% ДВБ. (Двойная линия) набухание гелевых сополимеров стирола с ДВБ в зависимости от содержания ДВБ. Графики построены на основании работ [130; 170; 171]

Набухание ССП коренным образом отличается от набухания классических сеток. Так, набухание в толуоле ССП, полученного сшиванием МХДЭ гелевого сополимера стирола с 0.5%-0.6 ДВБ, сначала падает, а затем растёт при увеличении степени сшивки от 43 до 200%, при этом величина набухания оказывается во много раз больше, чем можно было бы ожидать для классических сеток. Начиная со степени сшивки 43% ССП достаточно сильно набухает в воде и метаноле, несмотря

на то что эти растворители являются осадителями линейного полистирола. При высокой степени сшивки ($> 100\%$) полимер практически одинаково набухает как в метаноле, так и в толуоле, а при степени сшивки 300% полимер показывает сопоставимое набухание во всех растворителях [170; 171]

Помимо степени сшивки, влияние на набухание полимера оказывает содержание ДВБ в гелевом прекурсоре (см. Рисунок 8). Чем меньше содержание ДВБ, тем сильнее полимер набухает в дихлорэтане перед введением сшивок, и тем больше любого растворителя полимер способен поглотить после сшивки [170].

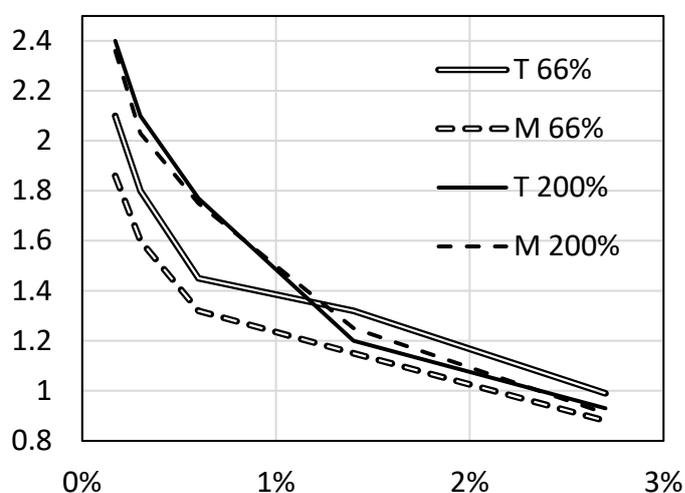


Рисунок 8. Поглощение (М) метанола и (Т) толуола ССП полученных сшивкой МХДЭ гелевых сополимеров стирола и ДВБ, в зависимости от содержания ДВБ [170].

До появления сверхсшитых сеток, деформационные свойства и набухание трёхмерных сеток объясняли следующими факторами: соотношением меж- и внутримолекулярных сшивок, циклизацией, подвешенными упруго неактивными цепями, механическими зацеплениями и размером цепей между соседними сшивками (M_c). Это факторы хорошо свойства слабосшитых структур, однако, для таких структур, как сверхсшитый полистирол эти понятия теряют свой изначальный смысл.

Поэтому авторы ССП разработали иное представление о структуре сверхсшитого полистирола [131]. Основным структурным элементом набухшей сверхсшитой сетки является ненапряжённый пространственный цикл, образованный мостиками и участками цепей между ними. Контурная длина такого

цикла определяется размером сшивающего агента и длиной цепей полистирола входящих в состав этих циклов.

В структуре сверхсшитых полистиролов, сшитых различными сшивающими агентами, наименьший ненапряжённый цикл может быть образован при участии трёх пар соседних фенилов, принадлежащих трём различным цепями или далеко отстоящим участкам одной цепи, соединённых только тремя метиленовыми группами [131] рисунок 9г. Не говоря уже о более крупных альтернативных ненапряжённых циклах, даже такой минимальный цикл обладает достаточной конформационной подвижностью, а его внутренняя полость имеет диаметр порядка 3-5 Å и проницаема для растворителя. Образование меньших циклов маловероятно, например, сшивка соседних фенилов одной цепи невыгодно как термодинамически (образуется сильнонапряжённый цикл, Рисунок 9Б) так и кинетически из-за низкой вероятности сближения соседних фенилов одной цепи (типичный угол между соседними фенилами атактического полистирола 120° [172], Рисунок 9А). Образование же лестничной структуры, в которой соседние фенилы одной цепи сшиты с соседними фенилами другой цепи так же маловероятно из-за исходной конформации полистирольной цепи [173]. При сшивке хлорметилированного полистирола можно ожидать образование двух метиленовых групп, связывающих два фенила, что приводит к возникновению термодинамически выгодного шестичленного цикла (Рисунок 9Б), интерно, что такой дигидроантраценовый фрагмент действительно был обнаружен в промышленном сверхсшитом полистироле MN-200 методом твёрдотельного C^{13} ЯМР [174].

Образование сшивок в сетке ССП носит статистический характер, поэтому структура ССП будет образована, главным образом циклами, большими чем минимальный. Фенилы, находящиеся между теми фенилами, которые участвуют в одном макроцикле, могут принадлежать другим макроциклам, кроме того, через один макроцикл могут проходить один или несколько других циклов (образуя механическое зацепление).

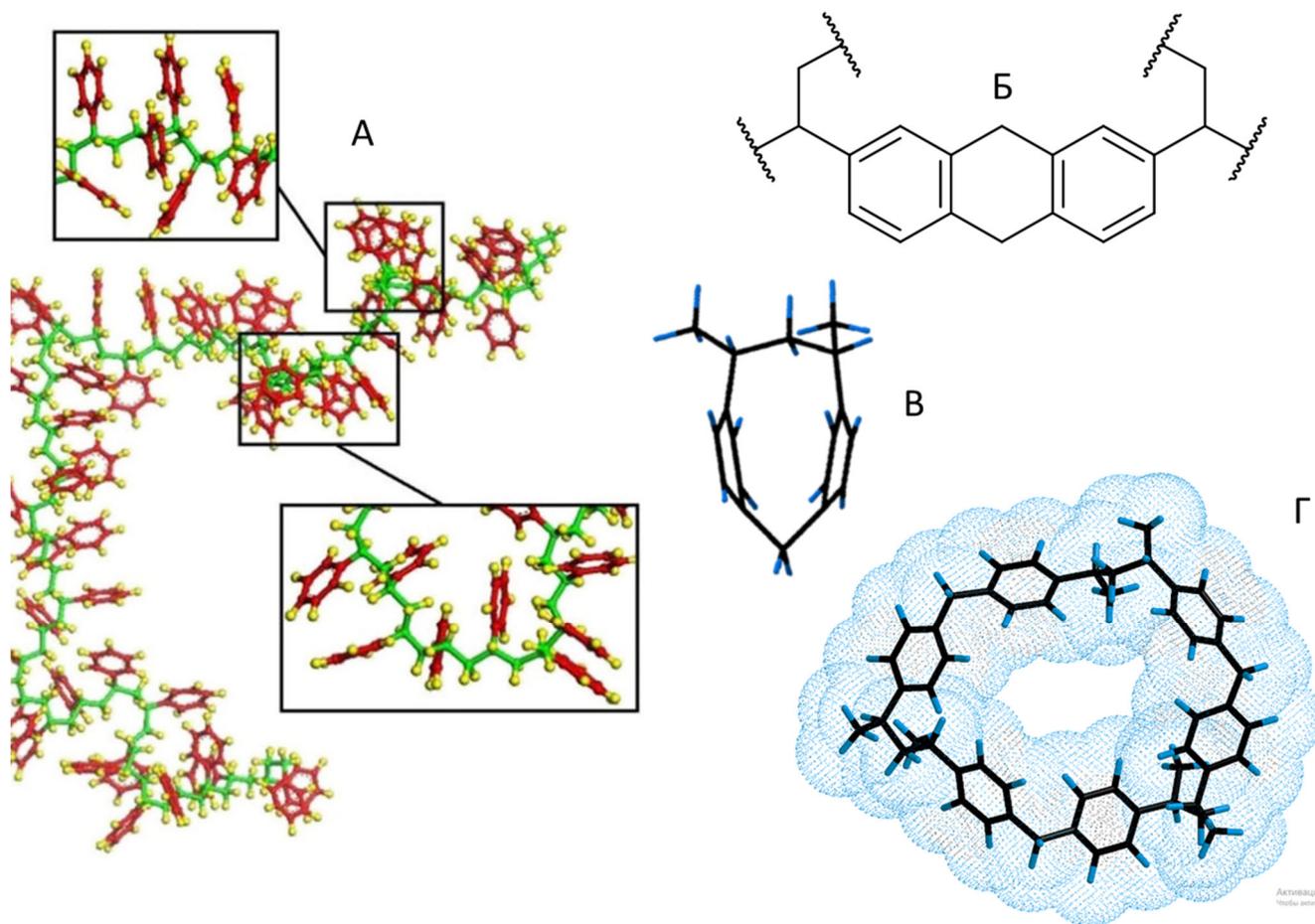


Рисунок 9. А – структура атактического полистирола в растворе [176], Б – стабильная структура, полученная двойной сшивкой двух финилов [174], В – напряжённый цикл при формировании сшивки между соседними фенилами, Г – минимальный неплоский ненапряжённый цикл из 3х цепочек полистирола.

Кооперативная перегруппировка большого числа связанных циклов делает возможным значительное изменение объёма полимерной макроскопической частицы при набухании или высушивании. Таким образом становится ясным главный фактор определяющий набухание сверхсшитой сетки, а именно степень взаимозацепления циклов [175]. Чем больше ДВБ содержит исходный сополимер, тем меньше набухаемость сополимера в начале сшивки (выше концентрация цепей) и тем больше степень зацепления циклов как в исходной, так и в сверхсшитой сетке, а, следовательно, ниже набухаемость сверхсшитого продукта. Дополнительными факторами, хоть и тесно связанными с первым, является средняя длина циклов и характер распределения циклов по размеру. Эти факторы зависят от степени сшивки, длины сшивающего агента, соотношения скорости

реакции сшивки и синерезиса растворителя. По всей видимости, неравномерное распределение сшивок приводит к более набухающей структуре, чем равномерное [1].

Вышесказанное хорошо объясняет закономерности набухания ССП в сольватирующих растворителях (толуол, ДХЭ), но удивительным известным свойством сверхсшитых сеток является способность сильно набухать в осадителях линейного полистирола. В некотором смысле, положение сольватированных цепей сверхсшитой сетки в ДХЭ, после окончания реакции является оптимальным, тогда при удалении растворителя сетка стремится компенсировать утраченные контакты полимер-растворитель новыми контактами полимер-полимер, этот процесс сопровождается уменьшением объёма. Если сетка ССП образована жёсткими мостиками распорками, то искажение полимерной сетки, приводит к возникновению внутренних напряжений из-за искажения двухуглеродных и валентных углов, и, вероятно, длин связей. Кроме того, даже при удалении всего растворителя полимерные цепи жёсткой сетки не могут эффективно упаковаться. Невозможность достижения плотной упаковки приводит к тому, что сухая сетка ССП является рыхлой (ажурной) а отстоящие друг от друга цепи полистирола имеют большую не скомпенсированную поверхностную энергию.

Эти два фактора, приводят к тому, что сетка стремится образовать межмолекулярные контакты с любыми молекулами и легко увеличивает свой объём даже при слабом межмолекулярном взаимодействии, иными словами, сетка стремится принять неискажённую структуру, которой обладал сверхсшитый полимер на момент окончания структурирования сетки. Поэтому ССП способен набухать в любых растворителях, даже в таком полярном, как вода.

Другим следствием неплотной упаковки полимерных цепей является присутствие большого порового пространства в сухом полимере. Чем жёстче образующиеся мостики, тем при меньшей степени сшивки возникает пористость и способность набухать в различных средах. Например, сшивка трис-хлорметилмезитилом приводит к возникновению пористости уже при 25% сшивки, а удельная поверхность достигает $700 \text{ м}^2/\text{г}$ (сопоставимой пористостью

обладает аналогичный полимер сшитый МХДЭ на 43%), напротив, сшивка гибкими мостиками, например, 1,4-бис-(пара-хлорметилфенил)бутаном даже на 100% не приводит к возникновению пористости и способности набухать в любых растворителях [1].

Описанные внутренние напряжения действительно были экспериментально обнаружены в гранулах ССП (0.5 ДВБ, сшитый МХДЭ на 100%) с помощью поляризационно-оптического метода. Напряжения сжатия проявляются в виде изотропии интенсивности проходящего света через гранулу сухого ССП, и выглядят как прозрачный мальтийский крест. Внутренние напряжения этим методом также обнаруживаются в гранулах ССП, набухшего в воде, а при набухании в метаноле напряжения сжатия исчезают, а напряжения растяжения не возникают, и гранула в проходящем поляризованном свете выглядит анизотропной. В толуоле гранулы ССП набухают сильнее, чем в метаноле, что сопровождается возникновением напряжения растяжения (в отличие от напряжения сжатия в сухом образце).

Широко известно, что ССП обладает уникальными сорбционными свойствами, и способен поглощать из водного раствора самые разнообразные вещества как органические, так и некоторые неорганические [171]. Объяснение уникальной сорбционной способности ССП в целом такое же, что и ранее рассмотренное объяснение способности сверхсшитых полимеров набухать в любом растворителе. Хотя ССП набухает в воде, сольватированное водой состояние не является самым выгодным. Во-первых, полимерная сетка всё ещё искажена и стремится быть расширенной, во-вторых, образованные контакты полимер-вода слабы т.к. они реализуются за счёт отсутствия некоторого количества очень выгодных потенциальных связей вода-вода. Поэтому практически любое вещество сорбируется на ССП из водного раствора за счёт гидрофобного взаимодействия [166]. Но только лишь одно гидрофобное взаимодействие с поверхностью полимерных цепей не способно полностью объяснить выдающиеся сорбционную способность сверхсшитого полистирола.

Пенер и соавт. [166] сравнили удерживание бензола, замещённых бензолов и полиароматических соединений на хроматографических колонках, заполненных ССП, С18 силикагелем и классическим макропористым сополимером стирола и ДВБ в режиме обращённо-фазовой ВЭЖХ. Было показано, что удерживание на ССП зависит как от $\text{Log}P$ удерживаемого вещества, а также коррелирует с числом π -электронов. При этом вклад π - π взаимодействия больше при сорбции на ССП, чем на макропористом Ст-ДВБ. Такое поведение можно объяснить тем, что многие ароматические группы ССП, из-за рыхлой структуры доступны для взаимодействия с сорбатом. Кроме того, рыхлая структура ССП позволяет образовывать энергетически выгодный контакт в виде стека параллельных π -системам сорбата и сорбента. При удерживании на макропористом сополимере анализ взаимодействует с поверхностью сплошной фазы Ст-ДВБ, на которой, присутствуют алифатические фрагменты полистирольных цепей, и, вероятно, многие фенилы ориентированы не параллельно к поверхности фазы сорбента.

Изучение сорбции на ССП в условиях газовой хроматографии показало [177], что ССП удерживает полярные и электронодонорные соединения сильнее, чем макропористый Ст-ДВБ сорбент, при этом способность к дисперсионному взаимодействию у ССП сопоставима с классическим Ст-ДВБ сорбентом, а электронодонорные свойства сверхсшитого сорбента несколько ниже.

Ещё одна причина столь высокой сорбционной способности — это микропористая структура сорбента, т.е. сорбируемое вещество может, и почти наверняка взаимодействует сразу с несколькими участками сетки ССП, что невозможно при взаимодействии с поверхностью макропоры. В качестве подтверждения микропористого характера сорбции приведём исследование [178], в ходе которого было обнаружено, что при сорбции алифатических газов на сверхсшитом MN-200 энергия взаимодействия сорбент-сорбат выше, чем на макропористом Ст-ДВБ. Кроме того, адсорбционный потенциал в порах макропористого Ст-ДВБ сополимера сильнее падает при насыщении сорбента, чем при сорбции на MN-200. Такое отличие можно объяснить различием характера сорбции на этих сорбентах: на макропористом сополимере сорбция алифатических

газов идёт послойно на внутренней поверхности пор, а сорбция на MN-200 протекает в результате объёмного заполнения микропор. Другим подтверждением объёмного заполнения микропор ССП является хорошее описание изотерм адсорбции газов и растворённых веществ в воде с помощью уравнений теории объёмного заполнения микропор (ТОЗМ) [179–185] (при этом объём пор по ТОЗМ совпадает с произведением коэффициента объёмного набухания на объём микропор, измеренный по азоту [219]).

При набухании сухой сетки меняется её пористая структура, поэтому предсказание сорбции веществ из раствора с помощью измеренной поверхности сухого образца работает плохо. Например, в работе [186] показано, что сухой сверхсшитый полимер на основе гелевого сополимера ВБХ-ДВБ со степенью сшивки 130% имеет поверхность 300 м²/г, а со степенью сшивки 180% - 1090 м²/г. Напротив, в набухом состоянии, образцы показывают одинаковую удельную поверхность около 1180 м²/г, измеренную методом "стерического исключения" [186]. Результаты работы [187] подтверждают вышесказанное, а именно, сорбция из раствора в первую очередь зависит от объёма пор набухшего полимера, а не от удельной поверхности сухого сорбента.

Интересный результат представлен в работе [188], в которой рассматривалось самосшивание сополимера ВБХ с ДВБ с добавлением толуола. Толуол более реакционноспособен в реакции Ф-К, чем ди-замещённая ароматическая система бензилхлорида, поэтому хлорметильные группы в первую очередь реагируют с толуолом, образуя более длинные и подвижные мостики, чем при те, которые образуются при взаимодействии двух мономерных единиц ВБХ. Кроме того, велика вероятность образования подвешенных групп, уменьшающих эффективную степень сшивки. Не удивительно, что удельная поверхность и пористость в сухом состоянии падет с увеличением количества введённого толуола, с 850 м²/г до 300 м²/г при 20% введённого толуола. Однако сорбция фенола при увеличении доли толуола растёт при увеличении содержания толуола до 15%. К сожалению, авторы работы не измерили набухание полимеров, однако, можно подозревать, что набухание сорбента в воде возрастает с введением некоторого количества толуола

(из-за увеличения размера макроциклов с сохранением жёсткости сетки). Например, в работе [130] было показано, что набухание в воде сополимеров с 2% ДВБ и с различным соотношением стирола к ВБХ, до некоторой степени возрастает с увеличением доли стирола, пока не будет потеряна жёсткость сетки с уменьшением эффективной степени сшивки.

Поскольку сверхсшитый полистирол обладает отличной сорбционной способностью [189] и хорошо показал себя в ТФЭ фенолов из воды, [190; 191] было логично использовать ССП для создания RAM. Первая работа, посвящённая созданию сверхсшитых RAM, опубликована в 1993г Veth и соавт. [192]. В работе использовали микросферические гранулы сверхсшитого полистирола, которые были модифицированы трис-(гидроксиметил)аминометаном (**трис**). Трис аминогруппой связывается с остаточными хлорметильными группами ССП, которые, как предположили авторы, в основном находятся на поверхности. Полученный сорбенты упаковывали в 29 x 4id мм хроматографическую колонку. Показано, что при использовании в качестве элюента ТГФ/фосфатный буфер (рН 8.2 15:85 об./об.), колонка практически не удерживает белки плазмы, в том числе миоглобин (18 кДа). При этом колонка удерживает и полностью разделяет нейрелептик Амперозид с $\log P = 4$ и его структурные аналоги.

Однако, нужно критически отнестись к идее о том, что модификация остаточных хлорметильных групп трисом значительно препятствует удерживанию белков. Действительно, в настоящее время стало известно, что даже не модифицированный ССП является гемосовместимым материалом, а это означает, что форменные элементы крови и белкам низкую адгезию к поверхности сверхсшитого сорбента [99; 193–195]. Также в работе [196] показано, что удерживание белков на сверхсшитой пористой монолитной колонке несколько меньше чем на исходной Ст-ДВБ фазе, несмотря на то, что удерживание малых молекул значительно возрастает при сшивке.

Всё это указывает на то, что даже не модифицированный полистирол, можно использовать в качестве RAM. Действительно, в литературе есть достаточно много примеров использования сорбентов на основе сверхсшитого полистирола,

представленных в таблице 2, для ТФЭ низкомолекулярных аналитов из биологических жидкостей с высоким содержанием белков (таблица 3). Хотя авторы этих работ не относят ССП к материалам ограниченного доступа и не изучают соответствующие свойства, депротенинизацию проводили лишь в шести случаях, а в остальных 17ти работах экстракцию проводили в присутствии белков, и это не мешало анализу. Отметим, что из примерно 30 последних работ по ТФЭ аналитов из биологических матриц с использованием очень популярного сорбента Oasis HLB, депротенинизацию не проводили лишь в двух работах, однако, в этих работах экстракцию проводили при pH 8-9, при этой кислотности сорбент и альбумин несут отрицательный заряд, поэтому отсутствие удерживания белков не удивительно. Детально примеры анализа биологических жидкостей с помощью ССП, приведённые в таблицах ниже, описываются в следующем разделе 1.6 литобзора.

Таблица 2. Сорбенты на основе сверхсшитого полистирола в виде сферических частиц используемые для ТФЭ аналитов из биологических жидкостей.

Сорбент	Поры	$S_{уд}$, м ² /г	Размер частиц, мкм	Функционализация	Ссылка
Коммерческие					
Diapak P-3	Микро+макро	1100	50-100	нет	[197; 198]
Purosep 200	Микро+макро	1100	≈ 50-130	нет	[199; 200]
Purosep 270	Микр	1200	60-120	нет	[201]
Isolute ENV+	Микро+макро	1000	50-130	Гидрофобизирован	[202; 203]
LiChrolut EN	Микро	1200	40-120	нет	[204]
Optipore SD2	Микро+макро	800	300-1200	Третичный амин	[205]
Лабораторные					
0.7x100 (Styrosorb 2)	Микро			нет	[206]
HXLPP-SCX	Микро	800	3-5	Сульфирован	[207]
HXLPP-SAX	Микро	1100	4-6	Кватернизованный диметилбутиламин	[208]
7x200 БП	Микро+макро	1100	40-80	нет	[209]

Таблица 3. Использование ССП в ТФЭ веществ из биологических жидкостей.

Сорбент	Масса сорбента, мг	Объём пробы, мл	Матрица	Пробоподготов	Аналит (заряд)	LogP	R, %	Формат ТФЭ	Ссылка
0.7x100 (Styrosorb 2)	1-2	0.2	Плазма	-	Сердечно сосудестные препараты	0.8..3.2	48..100	PT-μSPE	[206]
HXLPP-SCX	60	0.45	Сыворотка	д	Инозин (+), Гипоксантин (+), Ксантин (+)	-2.1..-0.7	87..91	c-SPE	[207]
HXLPP-SAX	60	2	Молоко	д	Амфотерные фторохинолины (0)	-0.2	87..93	c-SPE	[208]
7x200 БП	2	0.07	Сыворотка	п	ФКК (0)	0.8..1.8	8..64	MEPS	[209]
Diapak P-3@Fe3O4	20	25	Молоко	-	Сульфаниламиды (0)	-0.6..1	90..100	MSPE	[210]
Purosep 270	5	0.3	Плазма слюна	д	Малоновый диальдегид (0)	-0.5	80..84	c-SPE	[211]
Purosep 200	30	1	Сыворотка	п	Прогестерон (0)	3.9		c-SPE	[212]
Purosep 200	30	1	Сыворотка	п	Дегидроэпиандростерон сульфат (0)	2.8	95	c-SPE	[213]
IsoluteENV+	500	5	Сыворотка	п	Полибромированные дифениловые эфиры (0)	-	28..58	c-SPE	[214]
IsoluteENV+	200	5	Кровь, Сыворотка	д	Полихлорированные бифенилы (0)	5.7	31..100	c-SPE	[23; 215]
IsoluteENV+	200	0.5	Плазма	-	Фторхинолины (0)	0.3-0.6	57..98	c-SPE	[216]
IsoluteENV+	100	0.05	Сухая кровь	-	Взрывчатые вещества (0)	0.1..2	24..100	c-SPE	[217]
IsoluteENV+	100	5	Сыворотка	п	N-(2- карбамоилэтил)-валин и структурный аналог (0)	-0.9	-	c-SPE	[218]
IsoluteENV+	30	1	Плазма	-	n-метил-2-пирролидон и его метоболиты (0)	-1..-0.4	71..27	c-SPE	[219]
IsoluteENV+	10	0.5	Сыворотка	-	Сальбутамол (+)	1.4	61..66	c-SPE	[46]
IsoluteENV+	1	0.125	Плазма	-	Ропивацин и аналоги (+)	2.9..2	-	MEPS	[220]
IsoluteENV+	?	0.025	Сыворотка	?	α-дикарбоновые соединения (0)	-2.5..-0.3	5..94	c-SPE	[221]
LiChrolut EN	200	0.5	Сыворотка	-	Микотоксины (0)	3.6..-0.7	6..79	c-SPE	[222]
LiChrolut EN	80	0.1	Кровь	п	Парабены и фенолы (0)	1.9..5.7	86..100	c-SPE	[223]
LiChrolut EN	-	0.5	Плазма	-	Бензодиазепины (+/-)	2.1..3.9	25..30	HT-BAμE	[224]
Optipore SD2 WCE	25	0.025	Сыворотка	п	Ацетоминофен и структурные аналоги (0)	-1.8..4.4	68..98	MSPE	[225]
Diapak P-3	20	10	Молоко	д	Сульфаниламиды (0)	-0.6..1	30..90	d-SPME	[226]
Diapak P-3	30	8	Куриное мясо	п	Антибиотики и др. препараты	-1.7..1	85..100	c-SPE	[227]

* Способы пробоподготовки: (-) отсутствует, (д) депротенионизация, (п) иная пробоподготовка без депротенионизации.

1.6 ТФЭ в анализе биологической матрицы

Принципиальные схемы устройств и методики ТФЭ будем называть форматами. Существует огромное число форматов ТФЭ, но все они описываются в рамках статической или динамической экстракции. Рассмотрим сначала форматы статической, а затем динамической экстракции.

Элементарным форматом статической экстракции является дисперсионная ТФЭ (dispersive Solid-Phase Extraction, **d-SPE**). В этом формате частицы сорбента диспергируют в пробе, затем их отделяют от супернатанта с помощью отстаивания, центрифугирования или фильтрования. Затем из частиц сорбента извлекают аналит и определяют его концентрацию подходящим методом. Этот метод хорош тем, что позволяет работать с сорбентом в виде порошка, без упаковки в картридж или иммобилизации на носителе.

С помощью метода d-SPE, используя сверхсшитый полистирольный сорбент Диарак Р-3, в работе [226] был определён суммарный уровень сульфонамидных антибиотиков в коровьем молоке простым спектрофотометрическим методом. Для этого 10 мл молока охлаждали до 2-3 °С, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и отбирали средний слой (верхний слой содержит преимущественно жиры, а осадок белки). Полученную жидкость встряхивали на шейкере с 20 мг сорбента в течение 30 мин, затем центрифугировали 5 мин при 4000 об/мин, декантировали супернатант, а сорбент промывали 4 раза по 10 мл воды. Сульфонамиды элюировали 2 мл ацетонитрила, дериватизировали с помощью п-диметиламиноциннамальдегида и измеряли поглощение при 540 нм. Абсолютное извлечение 80 - 100%, LOD 0.02 мг/мл.

Шаг в сторону миниатюризации и удобства отделения сорбента от пробы был сделан в магнитной ТФЭ (Magnetic SPE, **MSPE**) [228] в этом формате используют сорбент, который содержит частицы магнетита Fe₃O₄. С помощью магнитного поля сорбент можно легко извлечь с помощью магнита из вязкого раствора. MSPE

позволяет работать с небольшими объёмами раствора, и может обеспечить высокий коэффициент концентрирования, вплоть до 250, поэтому этот метод нашёл относительно широкое применение в биомедицинском анализе [229].

В последние годы получены магнитные RAM сорбенты (**MRAM**) на основе MIP [56] и COF (*Covalent Organic Network*) [230], сорбенты на основе ССП [210; 231], по всей видимости, также являются RAM. В пользу последнего утверждения говорит то, что при анализе некоторых биологических жидкостей с помощью этих сорбентов не пользуются стадией депротеинонизации. Например, в работе Толмачевой и соавт. [210] был получен магнитный сорбент на основе макропористого сверхсшитого полистирола Диапак Р-3 (БиоХимМак СТ, Россия). Магнитные частицы Fe_3O_4 , были получены в чистом виде, затем их спиртовая суспензия была объединена со спиртовой суспензией гранул ССП. Часть магнитных частиц Fe_3O_4 прочно адсорбируются на поверхности полимера и не смываются водой или органическими растворителями. По истечении времени контакта сорбента с пробой, сорбент извлекают с помощью магнита. Используя 20 мг полученного сорбента, удалось количественно извлечь 4 сульфаниламидных антибиотика из 25 мл коровьего молока. Десорбцию проводили 2×1 мл ацетонитрила. Абсолютная степень извлечения в таких условиях была 92-105%, полученные хроматограммы и условия определения представлены на Рисунке 10.

Стоит отметить, что широко используемый метод **QuEChERS** (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe - Быстрый, Простой, Дешёвый, Эффективный, Надежный и Безопасный) [232], не является ТФЭ в строгом смысле, поскольку предназначен не для экстракции аналита, а для необратимого поглощения мешающих анализу примесей [10]. Данный подход часто используется в анализе пищевых продуктов [232], но он также может использоваться в анализе биологических жидкостей. Например, этот метод использовался для определения каннабиноидов в цельной крови [233]. Пробу молока разбавляли органическим растворителем, а белки высаживали неорганическими солями. Полученный органический слой помимо антибиотика содержал жиры и органические кислоты. Последние удаляли адсорбцией на силикагеле С18 и силикагеле с

иминопрорильными группами, а антибиотик анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

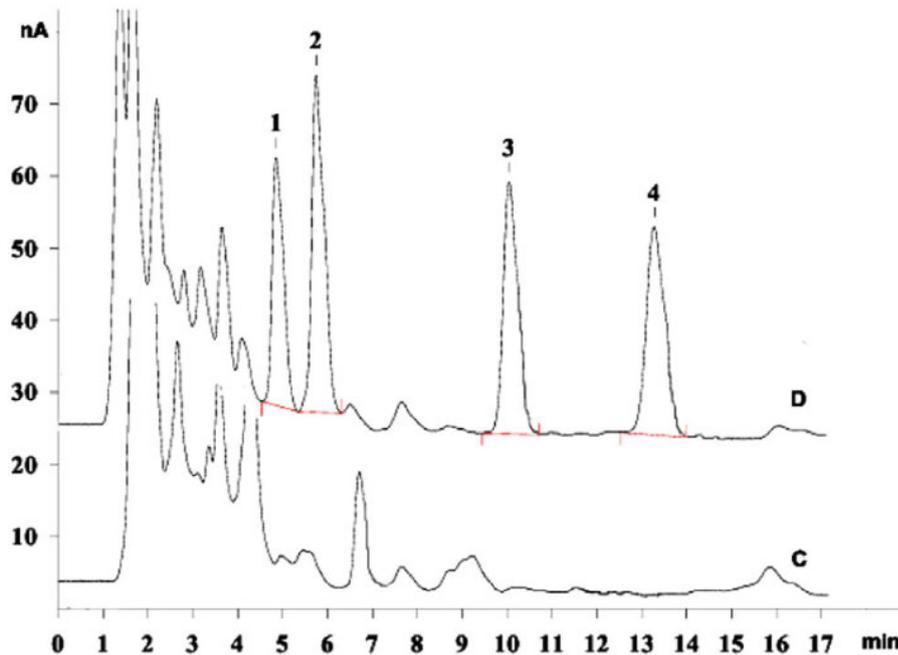


Рисунок 10. Хроматограммы экстрактов молока, полученные с помощью сверхсшитого магнитного сорбента. Колонка C18, элюент ACN + 0.1% водный раствор H_3PO_4 (20:80, об/об). С – исходный образец молока, D – образец молока с добавленными антибиотиками. 1 – сульфадимидин, 2 – сульфаметоксипиридазин, 3- сульфахлорпиридазин, 4 – сульфаметоксазол. [210]

Отделение сорбента от раствора декантацией или фильтрованием достаточно длительная и неудобная процедура. Логичным шагом в упрощении разделения сорбента и пробы стала иммобилизация сорбента на магнитном якоре мешалки (Stir bar sorptive extraction, **SBSE**) [234]. Этот метод удобен для экстракции соединений из относительно больших объёмов пробы, поэтому нашёл применение в экологическом и пищевом анализе [235; 236], но описаны лишь несколько попыток применения SBSE в анализе биологических матриц [237]. Так, в работе [238] была разработана методика определения гидрофобных антидепрессантов флуоксетина и дезипрамина в плазме крови после предварительной депротеинонизации плазмы с помощью коммерчески доступного якоря SBSE покрытого полидиметилсилоксаном. Десорбцию вели 150 мкл метанола, и, несмотря на высокую гидрофобность аналитов, степень извлечения составила 50-60%, а степень

концентрирования достигла всего ~ 3.7 раз. В работе [239] для экстракции кофеина из плазмы использовали якорь, покрытый частицами C-18 RAM силикагеля поэтому депротенизация плазмы не требовалась, однако авторам для определения аналита потребовался большой объём биологической пробы, 4 мл плазмы, а сорбционного концентрирования не было т.к. для десорбции использовалось так-же 4 мл элюента.

Дальнейшая эволюция статических методов экстракции была направлена на ещё большую миниатюризацию, автоматизацию и упрощение сопряжения с инжекторами аналитических приборов. Удобной для использования совместно с газовым хроматографом оказалась твёрдофазная микроэкстракция, где сорбент иммобилизован на стальной проволоке (*Fiber Solid-Phase MicroExtraction, f-SPME*), которую можно непосредственно ввести “вколоть” в инжектор хроматографа. Существует две техники выполнения **f-SPME** [240].

Первый метод заключается в помещении иглы с сорбентом в насыщенные пары над биологической пробой (*headspace SPME, HS-SPME*). Этот подход очень удобен для экстракции летучих соединений из сложных биологических матриц, поскольку в этом режиме сорбент не контактирует с биологической пробой и не загрязняется белками и др. нелетучими матричными компонентами [241]. Используя ГХ с детектором электронного захвата и HS-SPME на полидиметилсилоксане, López и соавт. разработали крайне чувствительную методику определения хлорорганических пестицидов, включая известный дуст (ДДТ) и его метоболит с LOD порядка 10^{-9} г/л [242]. Для экстракции 0.5 мл сыворотки крови человека, 1 мл кислого буфера pH 3 и якорь магнитной мешалки помещали в 5 мл стеклянную виалу со спетой, затем вводили иглу f-SPME в свободное пространство виалы над образцом, сорбцию вели в течение 50 мин. при 85°C и перемешивании 900 об/мин. По этой процедуре были проанализированы образцы крови 33 добровольцев из Испании в 2006 г., у всех был обнаружен ДДТ в концентрации от 0.05 - 1.06×10^{-9} г/мл, несмотря на то что дуст перестали использовать в 1972 г. В исследовании 2016 года по схожей методике ДДТ был

обнаружен в крови молодых жителей Греции (медианна 0.85×10^{-9} г/мл), которые родись после прекращения использования ДДТ [243].

Второй режим заключается в прямом погружении иглы с сорбентом в раствор (*direct immersion SPME*, **DI-SPME**), что позволяет анализировать нелетучие вещества. Для предотвращения сорбции белков на обычных гидрофобных сорбентах были разработаны гидрофильные биосовместимые покрытия на основе полидопамина, полиакрилонитрила и др., а также были разработаны устройства f-SPME на основе RAM. Иглу с такими сорбентами можно непосредственно вводить в орган живого организма без значительного влияния на изучаемый объект (*in-vivo SPME*). Таким образом, появилась возможность проводить анализ локального метаболомного профиля различных биологических тканей и жидкостей одного и того же живого организма в разные моменты времени [244].

В качестве примера приведём работу группы Bessonneau [245], в которой с помощью *in vivo* DI-SPME была определена концентрация эйкозаноидов (окисленные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот) в крови крыс до и после, индуцированного. липополисахаридом сепсиса. В этой работе использовали коммерчески доступное устройство для f-SPME на основе сорбента C-18 с биосовместимым полиакрилонитрильным покрытием. Сорбцию вели из потока крови или модельного раствора в течение 4 минут, десорбцию осуществляли в статике 100 мкл 50% водного ацетонитрила в течение 60 минут. В таких условиях концентрация аналита в экстракте повышалась в 2 раза относительно исходной пробы. В этой работе также проведено *in vitro* сравнение DI-SPME и ЖЖЭ с осаждением белков. В работе показано, что ЖЖЭ приводит к полному извлечению эйкозаноидов из крови, в то время как в SPME экстрагируется лишь свободная, т.е. несвязанная с белками крови фракция аналита.

Другой статический метод, высокопроизводительная стержень-адсорбционная микроэкстракция (*high-throughput bar adsorptive microextraction*, **HT-BA μ E**), позволяет проводить одновременную экстракцию из 100 образцов. В этом методе, около 1-5 мг порошка сорбента иммобилизируют на полипропиленовой втулке (7.5×3 мм) с помощью липкой плёнки [246], затем

штуки насаживаются на батарею полистирольных стержней. Полученное устройство позволяет одновременно погрузить сорбент в множество стеклянных виал, содержащих по 1.5 мл образца. В работе [224], были изготовлены устройства содержащие такие распространённые сорбенты как Strata (-X, -SDB-L, -CN); Oasis (HLB, MAX, MCX); ENVI (-18, -Florisol, -Chrom P) и сверхсшитый полистирольный сорбент LiChrolut EN (Рисунок 11).

С помощью полученных устройств в сочетании с ВЭЖХ-ДМД, удалось определить разнообразные бензодиазепины в образцах мочи, плазмы и сыворотки крови человека с LOD 2-30 мкг/л. Сорбцию вели из 0.5 мл сыворотки или плазмы, разбавленных 1 мл фосфатного буфера pH 6.8, в ультразвуковой ванне в течение 2 ч. После этого виалы с образцами заменяли на виалы со 100 мкл элюента (MeOH/ACN, 50/50 об/об), десорбцию вели также в ультразвуке в течение 1 ч. Абсолютная степень извлечения бензодиазепинов из водного раствора составила 25-35% для LiChrolut EN, лучший результат были достигнут с помощью Strata-SDB-L R=60-90%, который и использовали для анализа биологических жидкостей. Однако при использовании Strata-SDB-L наблюдался значительный матричный эффект, который достигал 46% для мочи, 9% для плазмы и 37% для сыворотки крови.

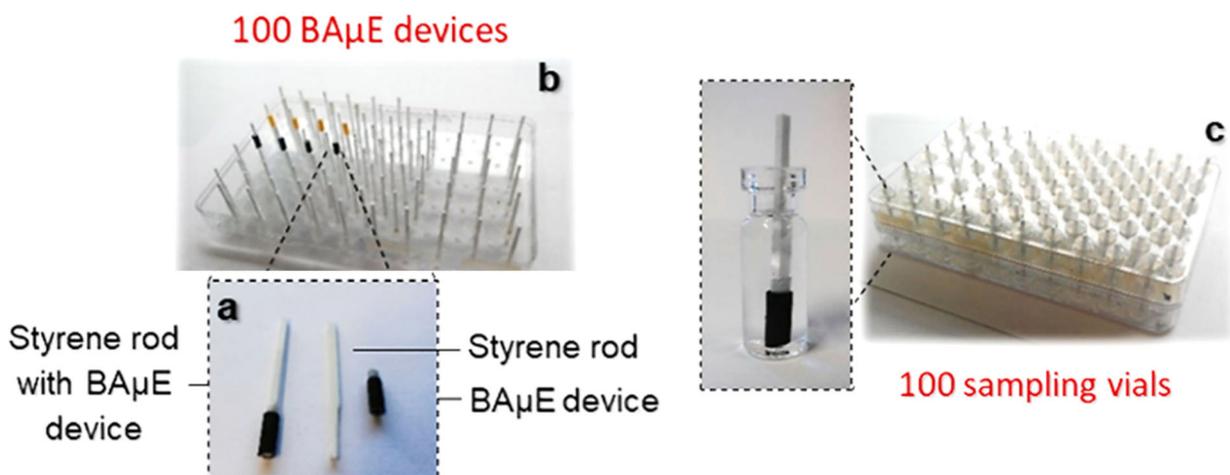


Рисунок 11. Устройства для НТ-ВАμЕ. (а) устройство сорбционного стержня; (б) батарея (плашка) из ста сорбционных стержней; (с) одновременная сорбция из 100 образцов [224].

В заключение приведём три сходных формата статической микроэкстракции, в которой проба, в отличие от предыдущих вариантов, прокачивается через сорбент. В первом формате микросферические частицы или монолит сорбента упакованы в микропатрон, который встроен в иглу шприца (Micro Extraction in Packed Syringe, **MEPS**) [247]. Коммерчески доступны устройства на основе силикагельных и полимерных макропористых сорбентов [248]. Во втором варианте плёнка сорбента на основе силикона или полиэтиленгликоля [249] покрывает внутреннюю поверхность иглы (solid-phase dynamic extraction, **SPDE**). В третьем варианте неорганический или органический сорбент помещают в носик пластикового наконечника для автоматической пипетки (**in-tip SPME**) [29]. Вышеперечисленные методы необходимо отнести к статической (неисчерпывающей) экстракции. Дело в том, что в этих форматах пробу последовательно прокачивают в двух направлениях (“туда-обратно”) через упакованный сорбент, проводя один или несколько циклов покачивания. Если обратиться к принципиальной схеме методов экстракции (Рисунок 1), ясно, что эти методы относятся к статической ТФЭ т.к. массообмен в растворе пробы свободен, а не однонаправлен как в случае динамической экстракции. Различные методы статической (неисчерпывающей) экстракции изображены на Рисунке 12.

В пионерской работе [220] сравнивали эффективность экстракции анестетиков ропивакаина и лидокаина и его метаболитами из сыворотки крови человека с использованием самодельного MEPS устройства, с силикагельным сорбентом C8, с полимерным макропористым монолитом (глицедил метакрилат + этилен гликоль диметакрилат + бутил метакрилат) и со сверхсшитым сорбентом Isolute ENV+. Экстракцию проводили с помощью 8 мкл сорбента из 125 мкл плазмы или 75 мкл мочи без предварительной обработки образцов, сорбент промывали 10 мкл воды и элюировали аналиты 250 мкл смеси ацетонитрил/вода (1/1 об./об.). Степень извлечения препаратов из плазмы была самой высокой для сверхсшитого сорбента R=75%, для C8 R=19%, для полимерного монолита R=5%.

В недавней работе Паутовой и соавт. [209] с помощью MEPS решали ту же задачу, что и в этом диссертационном исследовании, а именно задачу экстракции

фенилкарбоновых кислот из сыворотки крови и их количественного определения. Самодельные устройства MEPS были упакованы 2 мг сверхсшитого бипористого полистирола 7×200, или гранулами силикагельного C18 сорбента. Перед экстракцией 80 мкл сыворотки крови разбавляли 80 мкл воды, содержащей внутренний стандарт, и добавляли 2.5 мкл серной кислоты. Экстракцию проводили с помощью двух циклов прокачивания пробы через патрон с сорбентом, используя шприц объёмом 1 мл. Аналогичным образом за один цикл сорбент промывали водным раствором муравьиной кислоты с концентрацией 0.3 мМ, затем через патрон продавливали воздух для подсушивания сорбента.

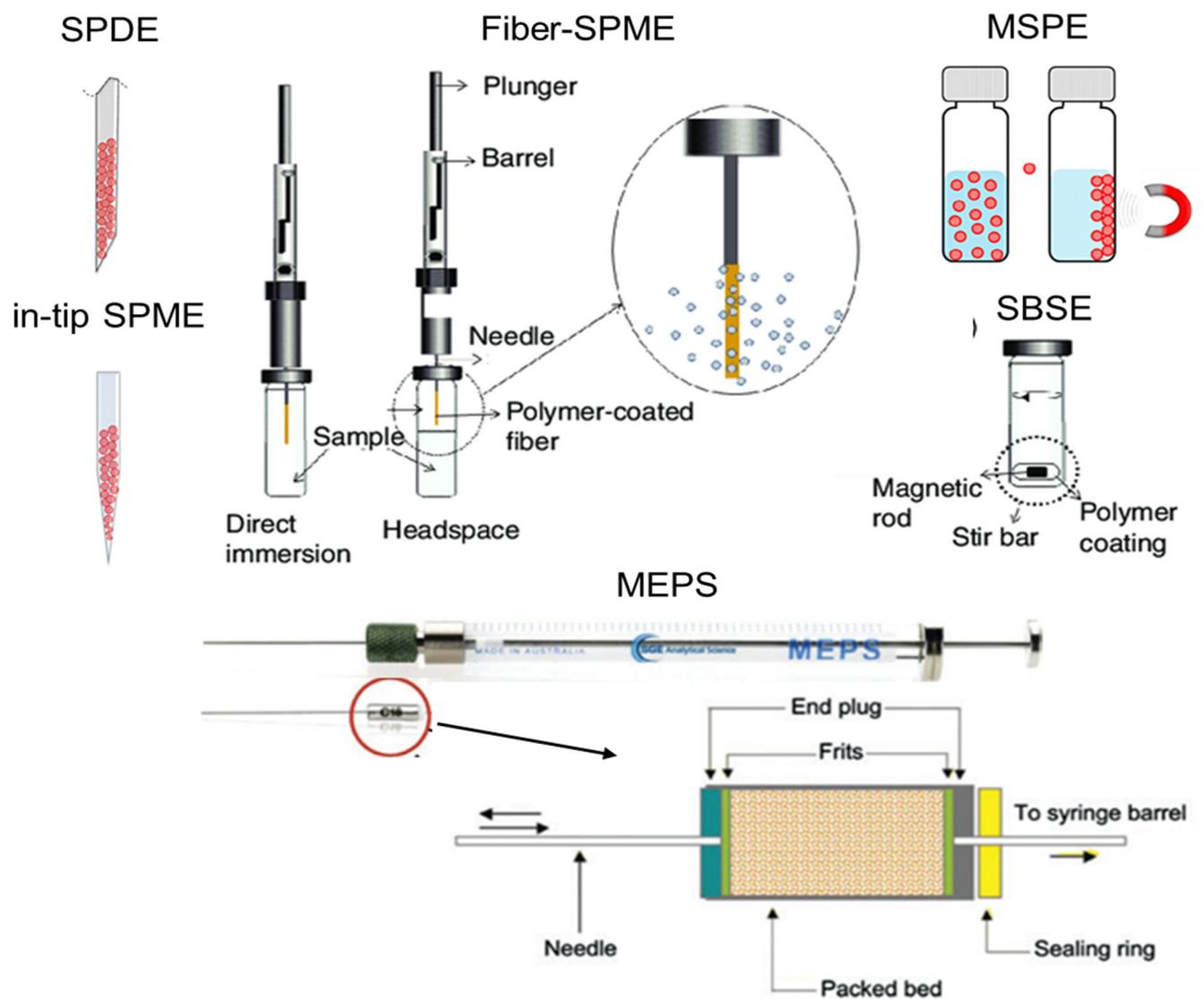


Рисунок 12. Основные форматы статической ТФЭ. Рисунок перепечатаны из [42; 250; 251].

Десорбцию вели, используя 40 мкл диэтилового эфира, за 5 циклов всасывания и выдавливания. Концентрацию аналитов в экстракте определяли с помощью ГХ-МС метода после силилирования кислот. В этих условиях степень извлечения с помощью сорбентов С18 и сверхсшитого полистирола оказалась статистически одинаковой для всех ФКК ($R = 30-70$) кроме 4-гидроксифенилмолочной кислоты, для неё степень извлечения на сорбенте С18 оказалась выше, чем на сверхсшитом полистироле, $R = 20$ и 45% соответственно.

Причина низкой экстракции в том, что как было сказано ранее, MEPS является вариантом статической не исчерпывающей экстракции. Вероятно, в этих условиях не происходит полной десорбции аналита со сверхсшитого сорбента, который, несомненно, обладает большей сорбционной способностью, чем сорбент С18, с которого десорбция аналита протекает легче. Для решения этой проблемы необходимо использовать сверхсшитый полистирольный сорбент в динамических форматах ТФЭ.

Теперь рассмотрим динамическую ТФЭ, в которой принято выделять 2 режима проведения экстракции, “*Off-line*” и “*On-line*”. В режиме *Off-line* экстракционный патрон отделён от хроматографической системы. В большинстве случаев патроном является корпус пластикового шприца с двумя жёсткими пористыми фриттами (Рисунок 13А), реже специальная пластиковая колонка-патрон (Рисунок 13Б) (*cartridge-SPE*, *c-SPE*). Раствор пропускают через патрон самотёком, то есть под действием гравитации или с помощью вакуумного мэнифолда, поэтому разница давления в стандартной *off-line* ТФЭ менее 1 атмосферы. В связи с этим предпочтительно использовать узкодисперстные сферические частицы, и чем меньше их размер, тем выше скорость сорбции, а, следовательно, выше эффективность экстракции. Обычно используют сорбент с частицами от 40 до 80 мкм [21; 30; 252], компания Waters выпускает линейку полимерных сорбентов от 30 мкм [253], есть единичные статьи, в которых используют частицы от 20 мкм в *off-line* ТФЭ [254], а частицы меньшего размера не используют из-за создания значительного сопротивления потоку пробы.

Изначально в формате с-SPE в основном использовали классические силикагельные полимеры, однако в настоящий момент их вытеснили полимерные сорбенты.

Показательным примером классической динамической с-SPE служит количественное определение N-метилпирролидина и его полярных метаболитов (в т.ч. 2-гидрокси-N-метилсукцинамида, $\lg P = -1.2$) в плазме крови и моче человека методом ВЭЖХ-МС [219]. Через патрон, содержащий 50 мг предварительно кондиционированного бипористого сверхсшитого полистирола Isolute ENV+, пропускали 1 мл биологической жидкости. После промывки и подсушивания сорбента поглощённый анализит элюировали 2 мл смеси этилацетата и этанола 80/20 об/об. Перед анализом экстракт высушивали и перерастворяли в 1 мл воды. Степень извлечения, рассчитанная как отношение интенсивностей ионного тока стандарта и экстракта образца, варьировалась от 70 до 17% в плазме и от 104 до 51% в моче в зависимости от типа анализита и его концентрации.

Дутов и соавт. разработали множество практических методик определения фармпрепаратов в слюне, сыворотке крови и в моче человека с помощью сверхсшитых полистиролов Purosep-270 и Purosep-200 используя ВЭЖХ определение, большинство методик приведены в книге [44]. Методика ВЭЖХ-МС определения широчайшего спектра ветеринарных препаратов в курином мясе с помощью ТФЭ с сорбентом Diapak P-3 представлена в работе Мелехина А.О. и соавт. [227]. Необходимо отметить, что практически во всех этих методах анализа биологических жидкостей депротенионизация не требуется, а картридж с сорбентом не теряет эффективности после многократного использования, это говорит о низкой способности немодифицированного гидрофобного сверхсшитого полистирола удерживать белки.

На наш взгляд, существует очень перспективный и недооценённый метод *Off-line* экстракции, позволяющий использовать тонкодисперсный порошок сорбента. Основным элементом аппаратного оформления процедуры ТФЭ является специальная пластиковая колонка, т.н. спиновая колонка (*spin column*), которая вставляется в обычный эппендорф, как показано на Рисунке 13В. Пробу

пропускают через слой сорбента под высоким давлением в центрифуге, важно, что экстракцию можно проводить одновременно на нескольких патронах. Спиновые колонки, заполненные частицами силикагеля, доступны на мировом рынке [255], они вошли в стандартную практику медико-биологических лабораторий для выделения ДНК и очистки пептидов [256; 257]. Коммерчески доступными являются также спиновые колонки, содержащие частицы полисахаридов. Такие колонки используют для выделения макромолекул, К сожалению, указанные сорбенты не подходят для экстракции метаболитов из биологических матриц т.к. они удерживают белки и довольно слабо удерживают полярные соединения [258].

Тем не менее есть несколько примеров использования спиновых колонок в анализе сложных биологических матриц. Namera и соавт. [259] синтезировали 2 типа монолитных силикагельных колонок с чистой С-18 фазой и комбинированной октадецильной фазой, несущей ещё и катионообменные группы (С-18/SCX). В работе показано, что полученные экстракционные колонки были удобны при анализе нативной сыворотки крови или мочой человека без дополнительной депротеинизации пробы. Для определения опиатов и бензодиазепинов по катионообменному механизму, 0.2 мл сыворотки или мочи смешивали с внутренним стандартом и 0.4 мл цитратного буфера (рН 3), загружали в спиновую монолитную колонку, и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 мин, затем колонку промывали 0.3 мл метанола, и десорбировали метанолом с 2% водного аммиака так-же при 5000 об/мин в течение 1 мин. Абсолютная степень извлечения составила 70-100%. Авторы работы отмечают, что такой метод по точности и чувствительности сопоставим со стандартной с-ТФЭ на частицах С-18, С-18/SCX и на катионообменном полимерном сорбенте Oasis MCX. Также авторы отмечают, что этот метод гораздо удобнее, быстрее, и позволяет просто работать с множеством параллельных экстракций, требует малый объём пробы и элюента.

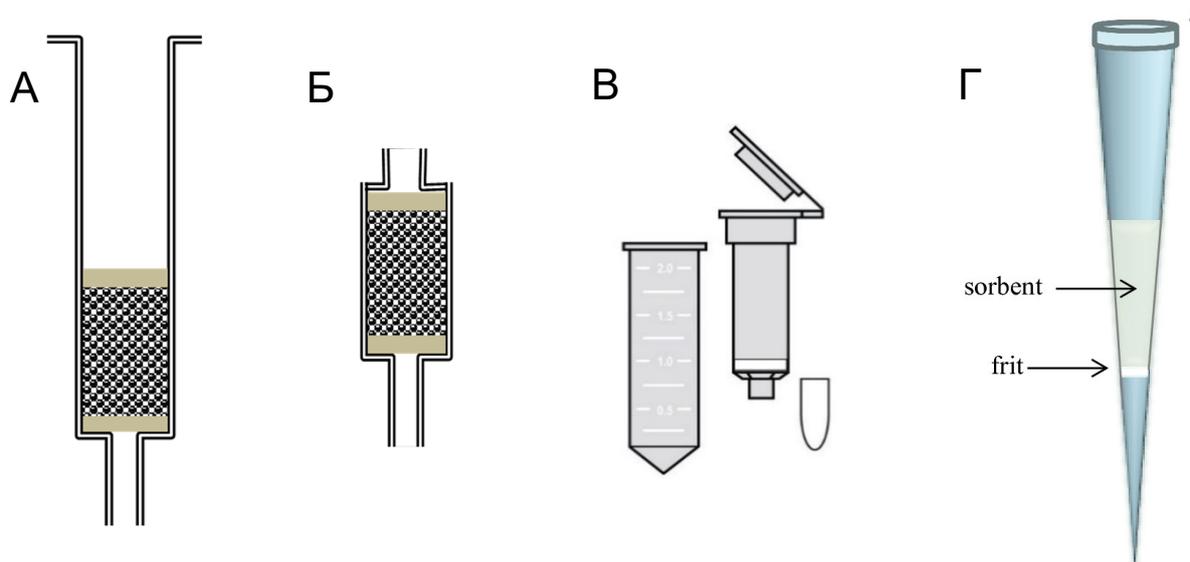


Рисунок 13. Форматы динамической *Off-line* ТФЭ. А и Б – *c-SPE*, В - *spin column SPE*, Г - *PT-μSPE*

Ещё более миниатюрным форматом динамической *off-line* экстракции является микро-ТФЭ в наконечнике пипетки (*pipette-tip micro solid-phase extraction, PT-μSPE*) [21; 258] (Рисунок 13Г). Здесь важно отметить, что, в зависимости от способа введения пробы и десорбции аналита, такое устройство может работать как в статическом, так и в динамическом режиме. Если пробу загружать через узкий кончик пипетки, заполненный сорбентом, и смывать её в обратную сторону, то реализуется статическая экстракция, если же пробу пропускать только в одну сторону, например, через широкий конец пипетки “вниз” с помощью центрифуги (Рисунок 13В), то реализуется динамическая т.е. исчерпывающая экстракция [258].

Одно из первых применений такого формата экстракции в анализе биологических жидкостей было осуществлено в 1980х годах в Московском центре кардиологии для изучения фармакокинетики сердечных препаратов в крови пациентов центра [206]. Около 2 мг 10-50 мкм микрочастиц ССП были упакованы в носике стеклянной пипетки Пастера. В пипетку помещали 200 мкл плазмы крови и перколировали пробу с помощью центрифуги. Десорбцию вели в аналогичных условиях 200 мкл органического растворителя, анализ экстракта проводили с помощью ВЭЖХ-УФ. Степень извлечения в таких условиях составила 48-99%

(медиана 92%), а пипетки заполненные C-18 обеспечили извлечение 29-94% (медиана 65%).

В режиме *On-line* патрон с сорбентом подключён к 6-ти [260] или 8-ми [261] ходовому крану жидкостного хроматографа. В положении крана, отключённом от основного потока элюента, через петлю с миниатюрным патроном пропускается проба. Затем поворотом крана патрон встраивается в поток элюента, который десорбирует аналит и переносит его в аналитическую колонку для его идентификации и количественного определения. Достоинствами этого метод ТФЭ заключаются в минимальной потере аналита, уменьшении риска загрязнения образца, малом времени анализа, а для анализа требуется лишь малый объём сорбента, пробы и необходимого растворителя. Система легко автоматизируется, в воспроизводимости результатов высока, что важно для определения аналитов в малых концентрациях [30; 260]. Наконец, в *on-line* ТФЭ можно использовать частицы сорбента малого размера, <10 мкм, что повышает эффективность сорбции и десорбции [30]. Вместе с тем, весьма желательно, чтобы сорбент в патроне и сорбент в аналитической колонке одинаково удерживали анализируемые вещества. Аналитическая колонка, как правило, заполнена силикагельной C-18 фазой, которая малоприспособлена для прекоцентрирования аналитов. Напротив, сверхсшитый сорбент сильно удерживает органические соединения, что в комбинации с C-18 приводит к уширению и даже перекрыванию хроматографических пиков [262].

Хотя силикагельные RAM практически не используются в большинстве форматов ТФЭ из биологических жидкостей, наиболее широкое распространение они нашли именно в *on-line* ТФЭ [12; 49], в так называемой конфигурации с переключением колонок (*column-switching configuration*) [51]. Что касается использования полимерных RAMIP, то их применяют в *on-line* ТФЭ значительно реже из-за сложности синтеза сферических частиц сорбента малого размера, из-за плохой упаковки микросферического полимерного сорбента и из-за озвученной выше причины сильного удерживания аналита на микропористом высокоаффинном RAMIP.

Однако существуют такие условия on-line ТФЭ, в которых частично гидрофильные полимерные сорбенты с малыми порами ведут себя почти как RAM. Эти условия возникают при использовании в экстракционной колонке больших частиц сорбента 30-50 мкм и высокой турбулентной скорости прокачивания пробы [49]. Этот метод был запатентован в 1997 году под названием турбулентной проточной хроматографии [263]. В современной зарубежной литературе такой метод называют *large particle supports*. В условиях такой хроматографии белки не успевают проникнуть в малые поры сорбента, а адсорбция на поверхности гранул из-за турбулентного потока незначительна.

В качестве примера приведём работу, выполненную Zeng и соавт. [264], в которой предлагается достаточно универсальный метод определения концентрации фарм препаратов в плазме крови человека для фармакокинетических исследований. В этой работе использовали колонку 50×1 мм, заполненную 30 мкм частицами сорбента Oasis HLB в качестве экстракционной колонки, а в качестве аналитической колонку Waters YMC AQ (5 мкм, 100×2 мм) на основе водосовместимого модифицированного C-18 сорбента. Пробу, 10 мкл плазмы крови, вводили в экстракционную колонку с потоком чистой воды, повышая скорость потока с 0.5 до 4 мл/мин за 0.7 минуты. С 1.5 по 4 минуту скорость потока установили 0.3 мл/мин. Затем переключали поток с экстракционной колонки на аналитическую и десорбировали аналиты 70% подкисленного ацетонитрила в течении 30 секунд при скорости 0.4 мл/мин, затем содержание ацетонитрила снижали до 10% для хорошего разделения аналитов.

Вообще говоря, в динамической ТФЭ частицы сорбента не обязательно должны быть сферическим, также могут использоваться нановолокна. Колонки, упакованные таким сорбентом, имеет преимущества монолитных колонок, хорошую проницаемость, устойчивость к высокому давлению, к тому же такие сорбенты гораздо проще в изготовлении т.к. синтезируются вне колонки [265].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реактивы и материалы

Реагенты, которые использовали без дополнительной очистки:

NaCl ($\geq 99,5\%$), $K_2Cr_2O_7$ (х.ч., Реахим), поливиниловый спирт (Gashinol GM-14, NipponSynthetic), перекись бензоила (75 %, ИРЭА-2000, Россия), гидроксид калия (х.ч., Химмед), $FeCl_3$ ($\geq 99\%$, Acros), $SnCl_4$ (ч., Реахим), $AlCl_3$ ($\geq 99\%$, Acros), NaI (х.ч., Реахим), $CHCl_3$ (ч.д.а., Экос-1), диметоксиметан (99%, Aldrich), ацетон (ч.д.а., Спектр-Хим), толуол (ч.д.а., Компонент-Реактив). соляную кислоту (конц., х.ч., Мосреактив), H_2SO_4 (конц., х.ч.), параформ (х.ч., Реахим), метанол (х.ч., Вектон). Метанол (Ultra gradient HPLC grade, J.T.Baker), ацетонитрил (HPLC-S, Biosolve), ЧСА (водный раствор 20%, Microgen), Цитохром С (Самсон-Мед), 3,4-дигидроксибензойная к. (ДГБК; $>99\%$, Aldrich), 4-гидроксибензойная к. (ГБК; $>99\%$, Acros), 3-гидрокси-2-фенилпропионовая к. (ТК; $>97\%$, Acros), 2-гидрокси-3-фенилпропионовая к. (ФМК; $>98\%$, Acros), бензойная к. (БК; ч.д.а.), фенилуксусная к. (ФУК; ч.д.а.), 3-фенилпропионовая к. (ФПК; $>99\%$, Acros), пентоксифиллин ($>99\%$, Aldrich), витамин С ($>99\%$, Aldrich), витамин В12 ($>98\%$, Aldrich), витамин В6 ($>98\%$, Acros), трифторуксусная кислота (HPLC grade, Panreac), уксусная кислота (ч.д.а., Экос-1), водный аммиак ($>25\%$, Компонент-Реактив). Аргон сжатый (высший сорт $>99,993\%$, Логика), гелий сжатый (марка А $>99,992\%$, НИИ КМ), жидкий азот (повышенной частоты 1й сорт). Деионизированная вода была получена станции водоподготовки ИНЭОС РАН.

Промышленные сорбенты Macronet Hypersol MN-200 и MN-270 были любезно предоставлены Российским офисом Purolite International.

Реагенты, прошедшие дополнительную очистку:

Стирол или ДВБ очищали от ингибитора полимеризации, промывая мономер 0% водный раствором КОН до прекращения окрашивания водного раствора, а затем водой до нейтральной реакции и пропускали через небольшой слой оксида алюминия.

1,2- Дихлорэтан (х.ч., Уфареактив) кипятили 4 ч над пятиокисью фосфора, а затем перегоняли над свежей порцией осушителя, отбирая фракцию с температурой кипения 82-84°C.

Ультрачистая вода Milli-Q была получена на установке Merck Millipore. Воду дегазировали ультразвуком в вакууме водоструйного насоса.

2.2 Оборудование

ИК спектрофотометр с НПВС (Vertex 70v, Bruker, Германия), жидкостный хроматограф (Varian 5000, США), УФ детектор (Knauer UV/VIS Filter Photometer 1000), перистальтический насос (Heidolph Pumpdrive 5101), жидкостный хроматограф с диодно-матричным детектором (Agilent 1100, США), аналитическая C-18 колонка 250x4 мм (БиоХимМак СТ, РФ), лабораторная центрифуга 1000-8000 об/мин (РФ), шейкер (GFL 1083, Германия), спектрофотометр (Unico 2800 США), хроматограф Цвет 211 (РФ) для изучения адсорбции аргона, прибор для измерения изотермы адсорбции азота Quantachrome (NOVA 2200, США), весы аналитические с точностью 0.0001г (Aczet CY124C), мешалка механическая 0-2000 об/мин (КА EURO ST D, Германия).

2.3 Синтез гелевого сополимера стирола с дивинилбензолом

0.47 г стабилизатора суспензии Gashenol GM-14 (поливиниловый спирт) растворяли в 140 см³ воды при 60°C и перемешивании. Затем в полученной массе растворяли 4.62 г NaCl, 0.0252 г K₂Cr₂O₇. Полученный раствор помещали в 250 мл трёхгорлую яйцевидную колбу, снабжённую стеклянной центробежной (колокольчиковой) мешалкой с механическим приводом и обратным холодильником. Реактор был полностью погружен в водяную баню (уровень теплоносителя доходил до шлифов колбы). После прогрева реактора до 60°C в реакционную массу добавляли 20–25 мл предварительно приготовленной органической фазы, представляющую собой раствор стирола и дивинилбензола в необходимом соотношении и 2% мол. перекиси бензоила. Температуру бани плавно поднимали до 80°C в течение 30 минут, и только после этого начинали

перемешивание, плавно повышая обороты с 0 до 1750 об/мин в течение ~ 1 минуты. Полимеризацию вели при 80°C в течение 8 часов при постоянной скорости перемешивания. После реакции образовавшиеся гранулы промывали на сите с размером ячеек 20 мкм для удаления возможной примеси мелких частиц. Затем гранулы помещали на фильтр и тщательно промывали от стабилизатора (10×100 мл) горячей воды с температурой 60–80°C, затем холодной водой (3×100 мл), ацетоном (4×100 мл), и водой до удаления запаха ацетона. Промытые гранулы сушили сначала на воздухе при комнатной температуре 12 ч, затем в сушильном шкафу при 80°C до постоянной массы. Выход сополимера 70–80%.

Определение доли растворимой золь–фракции полимера (цепей не связанных с основной сеткой), осуществляли следующим образом [266]. Измеренную навеску полученного полимера помещали в плоскодонную 200 мл колбу и заливали избытком толуола (~ 2 объёма необходимых для полного набухания гранул). Обработывали ультразвуком при нагревании ~ 60 С в течение 2–3 часов, затем с помощью погружного фильтра и шприца отсасывали избыток растворителя, а в колбу добавляли новую порцию растворителя. Экстракцию прекращали, когда отобранный толуол не даёт какой-либо мутности при прикапывании его в метанол (осадитель полистирола). Полимер промывали последовательно ацетоном и водой, затем сушили до постоянной массы. Весовое содержание растворимой фракции определяли как процентное уменьшение массы полимера. Сополимер с 1% ДВБ содержал 14% растворимой фракции, с 2% ДВБ – 8%, с 3% ДВБ – 4% растворимой фракции.

2.4 Синтез монохлордиметилового эфира

В 2–литровую трёхгорлую колбу, снабжённую термометром, якорной механической мешалкой и капельной воронкой, помещали 180 г тонкого порошка параформа, 200 г тонкого порошка NaCl, 192 мл метанола, охлаждали до -10..-15°C и при интенсивном перемешивании приливали 500 мл предварительно охлаждённой до -10..-15°C соляной кислоты в течение 10 минут, поддерживая температуру реакционной среды не выше -10°C. Затем реакционную массу

перемешивали 30 минут, охлаждая до $-10..-15^{\circ}\text{C}$. Затем медленно, в течение трёх часов, прикапывали 600 мл охлаждённой до $-10..-15^{\circ}\text{C}$ концентрированную серную кислоту, следя за тем, чтобы температура реакционной смеси не поднималась выше -5°C . Перемешивание и охлаждение продолжали ещё 6 часов до полного растворения проформа. После завершения реакции верхний органический слой отделяли, водно-кислотную фазу промывали 5×5 мл 1,2-дихлорэтана. Органические фазы объединяли, сушили над сульфатом натрия и перегоняли в безводной атмосфере, отбирая фракцию с температурой кипения $56..60^{\circ}\text{C}$. Выход продукта 58%. Чистота продукта по газожидкостному хроматографическому анализу $>98\%$.

2.5 Сшивание сополимеров стирола с дивинилбензолом

В 50 мл круглодонную колбу, снабжённую механической якорной мешалкой и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, помещали 3 г сополимера, 15 мл ДХЭ и расчётное количество сшивающего агента. Если требовалось, то добавляли необходимый объём ДХЭ для полного набухания полимера. Важно, чтобы небольшой избыток растворителя полностью покрывал гранулы полимера. Полимеру давали полностью набухнуть в течение ночи, затем реакционную массу охлаждали до -5°C и при интенсивном перемешивании вносили расчётное количество катализатора. Перемешивание и охлаждение продолжали 30 мин для диффузии раствора внутрь гранул. Чтобы предотвратить потерю летучих сшивающих агентов, первые 1.5 ч реакции вели при температуре ниже температуры кипения сшивателя ($53..55^{\circ}\text{C}$ для МХДЭ и CHCl_3 , и $38..40^{\circ}\text{C}$ для метилаля), заканчивали реакцию при 80°C в течение 7.5 ч. Продукт переносили на стеклянный фильтр Шота, отфильтровывали, промывали ацетоном (5×20 мл), смесью ацетона с 1М HCl 1:1 (5×20 мл). После этого, если необходимо, сорбент отмучивали от примеси разрушенных гранул в ацетоне. Гранулы сорбента промывали 1М HCl (100 мл) и дистиллированной водой (2 л). Сорбент высушивали в сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы (4..6 ч).

2.6 Измерение кажущейся удельной поверхности

Кажущуюся внутреннюю удельную поверхность S_{Ar} , оценивали методом тепловой десорбции аргона при 77К на анализаторе Цвет 211. S_{Ar} , рассчитывали по теории Брунауэра–Эммета–Теллора (БЭТ) с использованием уравнения Тёмкина, который привёл уравнение БЭТ к виду, позволяющему рассчитать ёмкость монослоя из одного измерения величины адсорбции при относительном давлении в интервале 0.18..0.26. Константу C в уравнении БЭТ принимали равной 60. Методика измерений и расчётов изложена в [267; 268]. Данный метод не чувствителен к точному значению константы C , ошибка для большинства образцов не превышает 2–3% [269; 270].

Кажущуюся внутреннюю удельную поверхность S_{N_2} также рассчитывали по теории БЭТ из изотерм сорбции азота при 77 К [270; 271]. Измерения проводили в автоматическом режиме на приборе Quantachrome с допуском по давлению 0.1/0.1 (адсорбция/десорбция), и временной задержкой для установления равновесия 60/60 сек. (адсорбция/десорбция). Перед измерением образцы были предварительно дегазированы в вакууме при температуре 80°C в течение 60 минут. Расчёт поверхности проводили, используя прилагаемый к прибору софт в соответствии [270; 271]. В этом методе, вычисленная напрямую константа C варьируется от 90, для слабосшитых образцов, до 160..200 для сеток, сшитых на 300 и 400%.

Отметим, что метод определения удельной поверхности не сказываются на характере обнаруженных закономерностей, однако, S_{Ar} оказалась на 5..15% больше S_{N_2} . Вероятно, это связано с меньшим размером молекулы аргона, которому может быть доступен больший объём внутреннего пространства в сверхсшитой сетке.

Полный объём пор сорбента, W_{N_2} , был определён из изотерм сорбции азота путём линейной экстраполяции значений адсорбции азота при $P/P_0 = 0.95..0.98$ к значению $P/P_0 = 1$.

2.7 ИК спектроскопия

Все образцы были предварительно высушены при 105°C и раздроблены в тонкий порошок с помощью вибрационной шаровой мельницы. ИК спектры НПВО

(нарушенное полное отражение) были получены в лаборатории молекулярной спектроскопии ИНЭОС РАН на приборе Vertex 70v (Bruker, США), с разрешением 4 см^{-1} .

2.8 Измерение кажущейся плотности полимера

В градуированный цилиндр с ценой деления 0.05 мл помещали 1.000 г полимера. Полимерный слой тщательно уплотняли мягким постукиванием по цилиндру и измеряли его объём. Эту операцию повторяли три раза. Плотность вычисляли по следующей формуле:

$$\rho_{app} = \frac{m}{V_{bulk} \times K_p}$$

где $m = 1 \text{ г}$ – навеска полимера, V_{bulk} – объём слоя сорбента, K_p – коэффициент упаковки гранул, который был принят равным коэффициенту упаковки исходного гелевого сополимера стирола с ДВБ. Его измеряли аналогичным и рассчитывали по следующей формуле:

$$K_p = \frac{m}{V_{bulk} \times \rho_{PS}}$$

где $m = 1 \text{ г}$ – навеска сополимера, V_{bulk} – объём, занятый слоем сополимера, $\rho_{PS} = 1.05 \text{ г/мл}$ – плотность сополимера, принятая равной плотности атактического полистирола. K_p для всех сополимеров оказалась равна 0.58.

2.9 Измерение объёмного набухания

Приблизительно 0.4 г сорбента помещали в узкий стеклянный цилиндр с внутренним $d = 5\text{--}6 \text{ мм}$. Полимерный слой тщательно уплотняли мягким постукиванием по цилиндру и измеряли линейкой высоту столба сорбента. Затем сорбент заливали избытком растворителя, взрыхляли несколько раз тонкой стальной спицей до полного удаления воздуха из межканального пространства и оставляли набухать при комнатной температуре минимум на 6 ч. Затем полимерный слой тщательно уплотняли и измеряли высоту столба набухшего сорбента. Для каждого образца выполняли 3 измерения в разных цилиндрах.

Коэффициент объёмного набухания определяли, как соотношение высоты столба набухшего полимера к исходному.

Сорбент не смачивается водой напрямую, поэтому сначала сорбент в цилиндре подвергали набуханию в метаноле, затем метанол отсасывали с помощью шприца, набухший сорбент заливали избытком воды и перемешивали сорбент спицей. Операцию по замене растворителя на свежую воду повторяли 10 раз до полного удаления метанола. Набухание в воде рассчитывали, как указано выше.

2.10 Измерение весового набухания

Навеску 0.4–0.6 г полимера помещали в пробирку с пористым дном, заливали растворителем и оставляли для набухания как минимум на 6 ч. Затем самотёком сливали избыток растворителя и межгранульную жидкость удаляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 минут. Сорбент быстро переносили из пробирки в заранее взвешенный стеклянный бюкс, и сушили сорбент до постоянного веса при 105°C. Весовое набухание, W_s рассчитывали, как количество миллилитров растворителя, поглощённого одним граммом сухого полимера. Для каждого сорбента делали 3 повторных измерения. Расчёт весового набухания проводили по следующей формуле:

$$W_s = \frac{(m_s - m_0)}{m_0 \times \rho_s}$$

где m_s , г – масса набухшего полимера, m_0 , г – масса высушенного полимера, ρ_s , мл/г – плотность выбранного растворителя. Определение набухания сорбента в воде проводили, используя уже набухший полимер, тщательно промытый водой сразу после синтеза.

2.11 Измерение адсорбции в статических условиях.

0.125 г сухого полимера помещали в коническую колбу и смачивали 0.3 мл метанола. Затем добавляли 10 мл водного раствора индивидуального низкомолекулярного органического соединения или белка. Растворы белков готовили в фосфатном 0.05 М буфере с рН 6.86, а растворы фенолкарбоновых

кислот в растворе, подкисленном уксусной кислотой до pH 3. Смесь перемешивали в шейкере в течении 4 часов, после чего гранулы сорбента отфильтровывали и определяли концентрацию аналитов в фильтрате спектрофотометрическим методом на приборе Unico 2800 (США). Анализ индивидуальных соединений проводили при максимальном поглощении на следующих длинах волн, нм: ЧСА $\lambda = 279$, цитохром С $\lambda = 412$, пентоксифиллин $\lambda = 274$, аскорбиновая кислота $\lambda = 245$, витамин В12 $\lambda = 362$, витамин В6 $\lambda = 324$, ДГБК $\lambda = 274$, ФПК $\lambda = 212$.

Сорбцию рассчитывали, как % поглощённого вещества по следующей формуле:

$$A\% = \frac{ABS' - ABS_0'}{ABS - ABS_0}$$

где ABS_0' - оптическая плотность чистой воды или буфера в холостом опыте, т.е. без добавления сорбата, ABS' - оптическая плотность раствора после завершения сорбции, ABS - оптическая плотность раствора до сорбции. Сорбционный эксперимент проводился в двух параллельных опытах.

2.12 Измерение экстракции ДГБК в статических условиях

Сорбцию проводили описанным выше образом исходя из 0.125 г полимера и 10 мл раствора. В первом варианте сорбцию вели из водного раствора ДГБК 10^{-4} М подкисленного уксусной кислотой до pH 3. Во втором варианте раствор 10^{-4} М ДГБК готовили на основе свежего водного раствора ЧСА 40г/л. После приготовления раствор выдерживали в холодильнике 24 ч, и подкисляли уксусной кислотой до pH 3 непосредственно перед сорбцией.

После завершения сорбции ДГБК гранулы отфильтровывали, подсушивали слабым потоком воздуха в течение 5 минут и количественно переносили в стеклянную пробирку. К сорбенту добавили 3 мл метанола и каплю концентрированного водного аммиака. Содержимое пробирки интенсивно встряхивали в течение 15 минут, гранулы отфильтровывали и определяли концентрацию ДГБК описанным выше спектрофотометрическим методом при $\lambda = 274$.

В случае белкового раствора ДГБК анализ проводили аналогичным образом, за тем исключением, что после сорбции, гранулы отфильтровывали и тщательно промывали 2×1 мл подкисленной воды, и лишь потом подсушивали сорбент. Кроме того, оптическую плотность ДГБК измеряли при $\lambda = 255$ нм (на этой длине волны разница между поглощением ДГБК и альбумина максимальна). Для калибровки определения ДГБК при возможном присутствии ЧСА в экстракте был проведён аналогичный эксперимент с той разницей, что сорбцию вели из кислого раствора ЧСА не содержащего ДГБК. На основе полученного метального экстракта был приготовлен раствор ДГБК с концентрацией, соответствующей 100% извлечению кислоты. Оптическая плотность этого раствора соответствует *ABS* в формуле выше.

2.13 Измерение сорбции смеси ФКК в статических условиях.

Сорбцию проводили описанным выше образом исходя из 0.125 г полимера и 10 мл раствора. Использовали водный раствор смеси 7 ФКК при концентрации каждой из кислот 5×10^{-4} М, раствор подкислен уксусной кислотой до pH 3. Концентрация ФКК была установлена методом ВЭЖХ с использованием простейшего хроматографа со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 206$ нм) и стандартной аналитической колонки 250×4 мм с обращённой фазой C-18 (5 мкм) в изографическом режиме. Лучший результат достигнут при скорости потока 0.8 мл / мин при использовании в качестве элюента смеси MeOH : ACN : H₂O : ТФУ = 50 : 5 : 45 : 0.001 об/об.

Таблица 4. Время удерживания ФКК

Кислота	ДГБК	КБК	ТК	ФМЛ	БК	ФУК	ФПК
<i>t_R</i> , мин	3.42	4.33	4.99	6.17	7.77	8.29	12.11

t_R, - время удерживания аналита

2.14 Измерение кривых проскока

Сорбенты были упакованы по 30 мг в пустые полиэтиленовые патроны необходимого объёма ($d = 4$ мм, $h = 5.6 - 6$ мм, $V = 69 - 75$ мкл), упаковка сорбента

производилась сухими методом. После этого сорбенты кондиционировали последовательно 5 мл ацетона, 2 мл метанола, 5 мл Milli-Q воды и 2 мл водного раствора ТФУ с рН 4. Подготовленный патрон подключали к перистальтическому насосу и к проточному спектрофотометру, регистрацию уровня ДГБК вели при $\lambda = 279$ нм а ФПК при $\lambda = 206$ нм.

Базовый раствор ТФУ с рН 4 готовился путём добавления $\sim 0.08\%v$ ТФУ к Milli-Q воде с последующей дегазацией в вакууме водоструйного насоса при активации ультразвуком в течение двух минут. Растворы ДГБК и ФПК приготовлены путём растворения кислот в базовом растворе.

Окончательное кондиционирование патрона проводили базовым подкисленным раствором до полного устранения дрейфа сигнала детектора, требовалось около 15 мл раствора. Полученная базовая линия соответствует участку I на Рисунке 14, этот уровень сигнала принимали за 0% содержания кислоты в растворе. Затем патрон, заполненный базовым раствором, отключали от системы, а рабочий раствор ДГБК или ФПК подавался в детектор напрямую до стабилизации сигнала (участок II на Рисунке 14). Этот уровень сигнала принимали за 100% содержание кислоты. Наконец, патрон вновь подключали к системе и раствор кислоты подавали через подготовленный патрон в спектрофотометр. В результате подключения патрона сигнал быстро падал до 0% с последующим медленным ростом по мере проскока кислоты (участок III на Рисунке 14).

Объём проскока регистрировали на начальном участке кривой, когда концентрация аналита мала, но ошибки могут быть значительны. Поэтому мы проводили независимый *off-line* контроль. Для этого собирали весь пропущенный через патрон раствор начиная с момента, когда уровень кислоты падал до 0%. Сбор раствора прекращали, когда проскок достигал 3%. Концентрацию кислоты в полученной фракции анализировали на спектрофотометре (ДГБК $\lambda = 279$ нм, ФПК $\lambda = 206$ нм). С другой стороны, концентрацию кислоты в сливе можно оценить как площадь под кривой проскока к моменту взятия пробы. Данные полученные в *on-line* и *off-line* согласуются в пределах 5%.

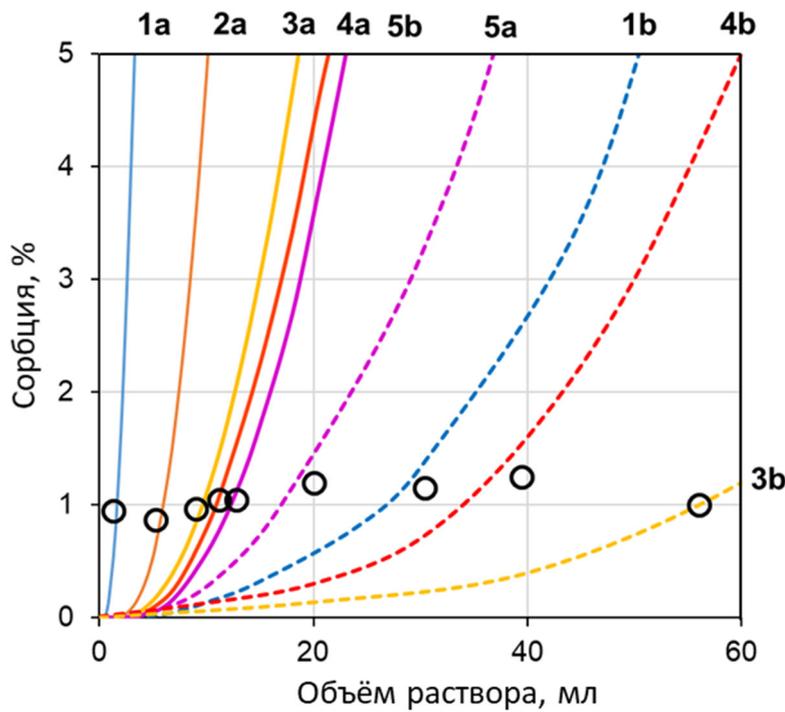


Рисунок 14. Сравнение сорбции (сплошная линия, а) ДГБК, (пунктир, б) ФПК рассчитанной интегрированием кривой проскока, (кружок) сорбция определённая по концентрации кислоты в растворе, который пропустили через патрон.

2.15 Измерение десорбции кислот и альбумина в динамическом режиме

Через предварительно кондиционированные патроны со скоростью 0.5 мл/мин были пропущены растворы ДГБК и ФПК с концентрацией 5×10^{-5} М, приготовленные на основе базового раствора. Объём пропущенного раствора равнялся объёму проскока ДГБК на изучаемом патроне. Затем патрон подсушивали в течение 5 мин в слабом токе воздуха. Десорбцию осуществляли раствором MeOH + 0.1% об NH₄OH со скоростью 0.3 мл/мин, пропущенный раствор собирали по 100 мкл фракциям. Концентрацию кислоты в каждой фракции определяли спектрофотометрическим методом, если необходимо, пробу разбавляли базовым раствором. Процент десорбированной кислоты в каждой фракции рассчитывали по следующей формуле:

$$D\% = \frac{V_f \times C_f}{V_b \times C_0}$$

где $V_f = 100$ мкл — объём анализируемой фракции, V_b — объём пропущенного раствора кислоты; $C_0 = 5 \times 10^{-5}$ М — концентрация кислоты в пропускаемом растворе; C_f — концентрация ФКК в фракции.

Удерживание ЧСА сорбентом 2x200 измеряли аналогичным образом с использованием 1 мл раствора ЧСА с концентрацией 40 г/л. Было проведено 2 эксперимента, один с нейтральным раствором ЧСА и другой – с раствором ЧСА, подкисленным уксусной кислотой до pH 4. Затем межгранульный раствор удаляли из патрона воздухом, после чего смывали остатки ЧСА соответственно нейтральной или подкисленной водой, последовательно отбирая 100 мкл фракции пропущенного раствора. Концентрацию ЧСА во фракциях определяли спектрофотометрически при $\lambda = 216$ нм.

2.16 ТФЭ-ВЭЖХ анализ ФКК в модельном белковом растворе

Модельный белковый раствор приготавливали путём разбавления медицинского 20% раствора ЧСА в изотоническом растворе (0.9% NaCl) до нормальной физиологической концентрации ЧСА 40 г/л. Исходный раствор кислот, содержащий по 2×10^{-6} М каждой из 7 ФКК, был приготовлен на основе Milli-Q воды. Для приготовления рабочего раствора, содержащего по 1×10^{-7} М ФКК, смешивали 5 частей исходного раствора и 95 частей модельного белкового раствора. ФКК могут образовывать комплексы с альбумином, поэтому рабочий раствор перед использованием инкубировали в холодильнике при 5-8°C в течение 24 часов.

Сорбент предварительно кондиционировали по стандартной методике (см 2.14). Затем через патрон пропускали 10 мл, подкисленного до pH 4, рабочего раствора со скоростью 0.5 мл / мин. После этого патрон промывали 3×0.5 мл водным раствором уксусной кислоты с pH 4 и сушили 5 минут в слабом токе воздуха. Десорбцию осуществляли со скоростью 0.3 мл/мин 250 мкл метанола с добавлением 2%об водного р-ра аммиака, затем к полученному раствору добавляли 250 мкл 2%об водного раствора ТФУ.

Концентрация ФКК была установлена методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 206$ нм), и стандартной аналитической колонкой 250x3 мм с обращённой фазой C-18 (5мкм) в изократическом режиме.

Элюент MeOH : ACN : H₂O : ТФУ = 50 : 5 : 45 : 0.001 об/об, скорость потока 0.8 мл / мин.

2.17 Определение фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови

К 2 мл сыворотки крови здорового человека добавляли 2 мл изотонического раствора 0.9% NaCl, затем 100 мкл чистой воды или раствора ФКК. Инкубировали полученные образцы сыворотки в холодильнике при 5-8°C в течение 24 часов для формирования возможных комплексов ФКК с компонентами сыворотки.

Для анализа образцы подкисляли 50 мкл концентрированной уксусной кислоты, и с помощью мэнифолда пропускали сыворотку через миниатюрные патроны для ТФЭ со скоростью 0.5 мл/мин. Затем патроны промывали 2×0.5 мл воды, подкисленной уксусной кислотой. Десорбировали ФКК со скоростью 0.3 мл/мин с помощью 250 мкл метанола с 2%_v NH₄OH. Экстракт упаривали при 50°C и остаток перерастворяли в 100 мкл Milli-Q воды с добавлением 0.01 об/об трифторуксусной кислоты.

Хроматографический анализ проводили на приборе Agilent 1100, оснащённый дегазатором, петлёй 10 мкл, аналитической колонкой C-18 250х4 мм и спектрофотометрическим диодно-матричным детектором. Использовали градиентное элюирование с 10% до 70% ацетонитрила за 10 минут, при скорости потока 1 мл/мин. Анализируемые вещества детектировали при 210 и 254 нм.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано в литературном обзоре, некоторые представители сверхсшитого полистирола (ССП) обладают свойствами сорбентов ограниченного доступа (RAM). Это побудило нас, с одной стороны, оптимизировать структуру SSP для эффективной экстракции низкомолекулярных метаболитов из биологических жидкостей, в частности, фенолкарбоновых кислот (ФКК), которые являются маркерами сепсиса [4]. С другой стороны, необходимо было разработать чувствительный, точный и удобный метод количественного определения этих кислот в сыворотке крови. В качестве аналитического метода мы выбрали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), которая, на наш взгляд, позволит точнее определять концентрацию ФКК, чем описанная ТФЭ с использованием газовой хроматографии [209; 272]. Для проведения ТФЭ мы выбрали динамическую off-line экстракцию, но использовали миниатюрный патрон, заполненный небольшим количеством SSP. В сочетании с методом ВЭЖХ такой формат может обеспечить определение абсолютного уровня как полярных, так и гидрофобных ФКК.

3.1 Синтез гелевых сополимеров стирола с дивинилбензолом

Для картриджной (колоночной) ТФЭ идеальными являются частицы размером 30-60 мкм с низкой полидисперсностью. В промышленности мелкие монодисперсные гранулы сополимеров стирола с дивинилбензолом (ДВБ) получают с помощью технологий джетинга [273], требующего специального оборудования, а в лабораторной практике используют многостадийный, трудоёмкий и продолжительный метод суспензионной полимеризации сомономеров в присутствии латексных зародышей полистирола [274]. Суспензионный метод проведения радикально сополимеризации стирола и ДВБ, напротив, прост и хорошо разработан, однако, приводит к получению полидисперсных частиц. Нам удалось подобрать такие условия суспензионной

сополимеризации, которые позволили получить гранулы желаемого размера и приемлемо малой полидисперсностью.

Реакцию проводили в колбе яйцевидной (или цилиндрической) формы, снабжённой центробежной стеклянной мешалкой в форме полого колокольчика с четырьмя отверстиями [275]. Размер мешалки подбирали таким образом, чтобы обеспечить небольшой зазор между мешалкой и стенками колбы. При вращении мешалка засасывает реакционную смесь снизу и выбрасывает её через боковые отверстия, в результате чего достигается турбулентное перемешивание как в горизонтальном, так и вертикальном направлении. Благодаря удачному сочетанию формы и размеров колбы и мешалки, смесь перемешивается равномерно и во всём реакционном объёме. Соотношение объёмов водной и органической фаз должно быть более 3:1, а 5:1 является оптимальным значением.

Чтобы избежать образования фракции очень мелких гранул, в колбе не должны присутствовать никакие другие элементы оборудования, кроме мешалки, а вибрация установки должна быть минимальной. Кроме того, важно, чтобы реакционная масса и паровое (свободное) пространство над ней прогревались одинаково, для предотвращения конденсации паров азеотропа стирола с водой на стенках колбы. Понятно, что пространство над реакционной массой в колбе должно быть по возможности минимальным. Снижению полидисперсности конечных гранул способствует также предварительный прогрев реакционной массы в течение 15–30 минут без перемешивания (или при малых оборотах мешалки) перед активным диспергированием мономеров. По-видимому, кратковременная форполимеризация приводит к увеличению вязкости органической фазы, что способствует получению более узкой фракции частиц.

Принимая во внимание все вышесказанное и используя скорость центробежной мешалки 1750 об/мин (см. экспериментальную часть), мы получили желаемые сферические гранулы сополимера стирола с 0.7% ДВБ. На Рисунок 15 приведена их микрофотография. Как видно, гранулы довольно однородны по размеру, наименьшие из них имеют диаметр 30 мкм, а размер встречающихся крупных гранул составляет 80 мкм. На фракцию 50–70 мкм приходится около 85%

частиц. Для дальнейшего исследования связи между составом, структурой, и сорбционными свойствами сорбентов были синтезированы сополимеры, содержащие 0.5, 0.7, 1, 2 и 3 мол. % ДВБ.

или

<p>Водная фаза содержит 0.32%_m поливинилового спирта, 3.2%_m NaCl, 5×10⁻⁵%_m K₂Cr₂O₇. Соотношение водной и органической фазы 5 к 1</p>	<p>Перемешивание 1750 об/мин</p>	<p>Дихлорэтан р-ль. 55°С, 0.5 ч 80°С, 7-8 ч</p>
---	--------------------------------------	---

Схема 4. Синтез сверхсшитого полистирола.

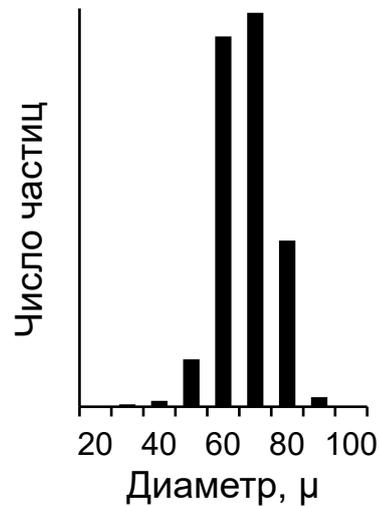
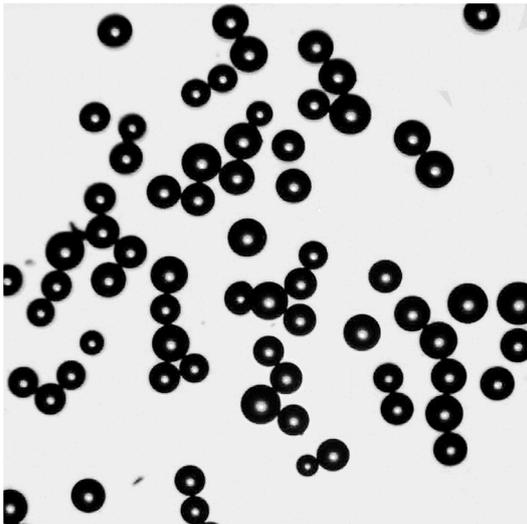


Рисунок 15. Микрофотография частиц гелевого сополимера с 2% ДВБ, и их распределение по размеру.

3.2 Оптимизация условий синтеза сверхсшитого полистирола

Принцип синтеза сверхсшитых сеток, состоит в сшивании набухших в дихлорэтано цепей полистирола множеством конформационно жестких мостиков. Как показано в литературном обзоре, многие сшивающие агенты и катализаторы

могут быть использованы для сшивания полистирола. Классическим сшивающим агентом является моноклордиметиловый эфир (МХДЭ), однако его использование нежелательно, поскольку он считается канцерогенным продуктом и запрещён во многих странах. Вероятно, этот вывод был сделан, когда использовали технический продукт с примесью бисхлордиметилового эфира для хлорметилирования сополимеров стирола при промышленном производстве анионитов. Есть данные, что чистый МХДЭ не оказывает канцерогенного воздействия на организм человека [116]. Всё же мы предприняли поиск других сшивающих агентов для получения сорбента с требуемыми физическими и сорбционными свойствами. Предварительные опыты показали, что хлорметилированные производные бензола и дифенила не подходят для получения качественного сорбента на основе гранульных сополимеров стирола. Было замечено, что продукты сшивки обладают пониженной кинетикой сорбции. Предположительно это связано с тем, что в присутствии катализатора одновременно с реакцией сшивания гранул, в межгранульном растворе протекает самоконденсации сшивающего агента, а образовавшиеся олигомеры не могут легко диффундировать в объём гранул и поэтому преимущественно реагируют с полистиролом в поверхностном слое гранулы, образуя плотную оболочку. В качестве альтернативных МХДЭ сшивающих агентов были рассмотрены диметоксиметан и хлороформ, которые не способны к самоконденсации, а в качестве замены дорогому хлорному олову мы испытали более дешёвые и активные катализаторы FeCl_3 и AlCl_3 .

Тестирование активности возможных систем катализатор-сшивающий агент проводили на крупных гранулах (диаметром 0.2–1.0 мм) макропористого сополимера стирола с 7 мол. % ДВБ. Синтез вели при 80°C в течение 7 часов. Подробные условия реакции приведены в экспериментальной части. Критерием успешно прошедшей реакции служила величина кажущейся внутренней удельной поверхности, которая для продукта сшивания этого сополимера МХДЭ на 100% в присутствии 1 моля SnCl_4 на моль сшивающего агента составляет примерно

700 м²/г (Таблица 5, № 1), в то время как поверхность исходного макропористого сополимера составляет всего 50 м²/г.

Таблица 5. Загрузки реагентов, кажущаяся внутренняя удельная поверхность и степень разрушения гранул свёрхсшитых полимеров на основе макропористого сополимера стирола с 7% ДВБ.

№	Сшивающий агент		Катализатор		S _{Ag} , м ² /г	Разрушение гранул
	Формула	N(СА)/ N(ПС)	Формула	N(Кат.)/N(СА)		
1	МХДЭ	0.5	SnCl ₄	1	700	-
2	CHCl ₃	1	SnCl ₄	1	50	-
3	CHCl ₃	0.33	FeCl ₃	1	50	-
4	CHCl ₃	0.33	AlCl ₃	1	300	+
5	CHCl ₃	1	FeCl ₃	0.3	60	-
6	CHCl ₃	1	FeCl ₃	1	170	+
7	CHCl ₃	1	FeCl ₃ +NaI	1	170	+
8	CHCl ₃	1	FeCl ₃	2	260	++
9	CHCl ₃	~10 (растворитель)	FeCl ₃	0.1	150	+
10	CHCl ₃	1	AlCl ₃	1	500	++
11	CHCl ₃	1	AlCl ₃	0.23	400	+
12	CHCl ₃	1	FeCl ₃	0.77	650	++
			AlCl ₃	0.77		
13	CHCl ₃	1	FeCl ₃	0.23	1000	++
			AlCl ₃	1		
14	CHCl ₃	1	FeCl ₃	0.3	1100	++
			AlCl ₃	2		
15	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	FeCl ₃	0.3	1100	++
16	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	SnCl ₄	1	80	-
17	CH ₂ (OCH ₂) ₂	2.5	SnCl ₄	1	170	-
18	CH ₂ (OCH ₂) ₂	2.5	SnCl ₄	2	600	-
19	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	FeCl ₃	0.3	90	-
20	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	FeCl ₃	1	750	+
	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	FeCl ₃	2	1100	++

S_{Ag} – кажущаяся удельная поверхность измеренная методом тепловой десорбции аргона и рассчитанная по однотоочечному методу БЭТ [267; 276].

СА – сшивающий агент, ПС – полистирол, Кат. – катализатор.

N – число основомолей соответствующего компонента.

Степень разрушения гранул: (-) нет разрушения; (+) разрушение небольшой части гранул; (++) полное разрушение гранул.

Хлороформ в присутствии эквимольного количества хлорного олова не сшивает сополимер в достаточной степени (№ 2), удельная поверхность полученного продукта, 50 м²/г, не отличается от поверхности исходного

макропористого сополимера. Использование такого же количества FeCl_3 позволяет увеличить поверхность сшитого хлороформом продукта лишь до $170 \text{ м}^2/\text{г}$ (№ 3). Даже в присутствии хлористого алюминия – самого активного катализатора алкилирования – S_{Ag} полученного полимера не превышает $500 \text{ м}^2/\text{г}$ (№ 4). Стоит отметить, что в этом случае значительная часть полимерных гранул разрушается, а целые гранулы сорбента становятся хрупкими и легко разрушаются при незначительном механическом воздействии.

Интересно, что смесь FeCl_3 и AlCl_3 проявляет синергизм действия. Действительно, продукт, сшитый хлороформом в присутствии смеси 0.77 моля AlCl_3 и 0.23 моля FeCl_3 (№ 12), обладает большей S_{Ag} , чем при использовании 1 моля индивидуальных катализаторов (Таблица 5, № 6 и № 10). В случае каталитической смеси, содержащей 1 моль AlCl_3 и 0.3 моля FeCl_3 , получается продукт с удельной поверхностью $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ (№ 13), что немногим выше поверхности сорбента, полученного по классической схеме $\text{MXDЭ} + \text{SnCl}_4$.

В литературе имеется множество примеров сшивки полистирола диметоксиметаном. При использовании SnCl_4 нам удалось получить продукт с достаточно высокой поверхностью лишь при использовании 2.5 молей диметоксиметана (ДММ) и 2 молей SnCl_4 на моль сшивателя (№ 17). Попытка использовать диметоксиметан в качестве сшивающего агента в сочетании с FeCl_3 также не привела к желаемому результату. Только в случае реакции 0.5 моля ДММ с 1 основомолем макропористого сополимера в присутствии 1 моля FeCl_3 на моль сшивателя удалось получить гранулы с поверхностью $750 \text{ м}^2/\text{г}$ (№ 19), а при двух молях $1100 \text{ м}^2/\text{г}$ (№ 20). Стоит отметить, что использование большого количества FeCl_3 или AlCl_3 , (от одного моля и выше), приводит к образованию большого объёма кашеобразного побочного продукта, который трудно отделяется от продукта и является, вероятно, смесью разрушенных гранул и продукта взаимодействия катализатора с фрагментами полистирольной цепи.

Продукты дополнительной сшивки макропористого форполимера (7 мол. % ДВБ) представляют самостоятельный интерес как бипористые сорбенты, в структуре которых имеются микро-, мезо- и макропоры, но они не могут служить

сорбентами ограниченного доступа. Поэтому мы на примере сополимера с 0.7% ДВБ, было решено оптимизировать синтез сверхсшитых полимеров на основе слабосшитых гелевых сополимеров стирола (от 0.5% до 3% ДВБ). В этом случае должны получиться нанопористые сорбенты не содержащие макропоры, перспективные для использования в качестве RAM.

Системы, содержащие хлороформ или ДММ, пригодные для дополнительного структурирования макропористого сополимера с 7% ДВБ, оказались непригодными для сшивания гелевого сополимера с 0.7% ДВБ. На Рисунке 16 приведены фотографии гранул исходного полимера и продуктов его дополнительной сшивки. Как видно, обработка гранул смесью 1 моля хлороформа и 1 моля $AlCl_3$ (№ 21) или смесью $AlCl_3$ и $FeCl_3$ (№ 22) приводит к полному их разрушению. Известно [277], что хлористый алюминий при повышенной температуре способствует практически полной деградации сополимеров с невысоким содержанием ДВБ. Структурирование гелевого сополимера 0.5 моля ДММ в присутствии 1 моля $FeCl_3$ (№ 24) также позволяет получить высокопористый продукт, но с разрушением гранул (Рисунок 2с). По всей вероятности, $FeCl_3$ также разрушает структуру исходного слабосшитого форполимера, хотя и не столь радикально, как $AlCl_3$.

В отличие от хлороформа и диметоксиметана, монохлордиметиловый эфир является более активным сшивающим реагентом. Для получения высокопористого продукта на основе гелевого сополимера (0.7% ДВБ) и 0.5 моля МХДЭ достаточно 0.3 моля $FeCl_3$ (№ 29). Синтезированный в этих условиях сверхсшитый полимер обладает такой же поверхностью $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ что и продукт классического синтеза с использованием 1 моля $SnCl_4$ (№ 25). К тому же в присутствии такого количества $FeCl_3$ гранулы не разрушаются. Большое количество катализатора $FeCl_3$ не способствует значительному росту удельной поверхности (№ 30). Таким образом, в качестве сшивающего агента для синтеза сверхсшитых сорбентов ограниченного доступа на основе гелевого форполимера с малым содержанием ДВБ следует использовать монохлордиметиловый эфир, а большое количество дорогого

хлорного олова можно заменить малым количеством более дешёвого хлорного железа.

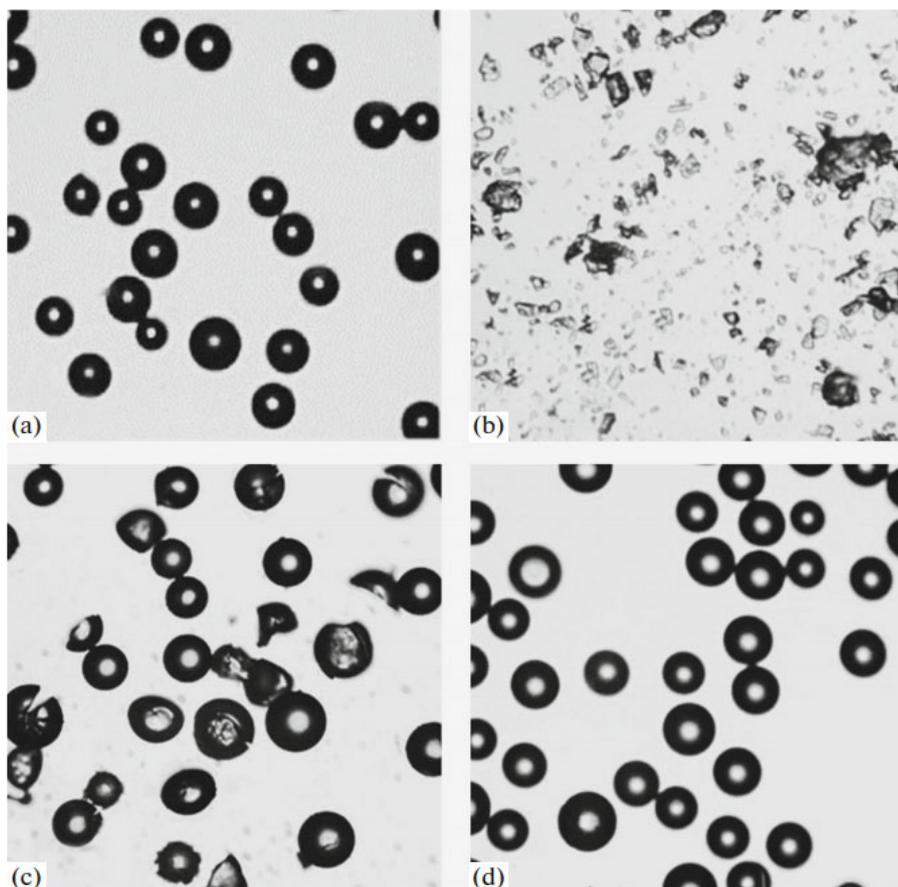


Рисунок 16. Микрофотографии (а) исходного сополимера с 0.7% ДВБ, а также продукты его сшивки: (b) 1 молям CHCl_3 в присутствии 1 моля AlCl_3 (c), 0.5 моль метилаля в присутствии 1 моля FeCl_3 (d), 0.5 моль эфира в присутствии 0.3 моль FeCl_3 .

Полученные на предыдущем этапе работы гелевые сополимеры были сшиты на 100–400% в оптимальных условиях (0.3 моля FeCl_3 на моль МХДЭ), загрузки реагентов и характеристики сорбентов представлены в Таблице 7. Конверсия МХДЭ (т.е. содержание непрореагировавшего эфира в ДХЭ после завершения синтеза), найденная газохроматографическим методом, для большинства сорбентов превышает 98%, а содержание остаточного хлора во всех образцах незначительно, кроме сеток со степенью сшивки 300% и 400%). Следовательно, реальная степень сшивки сорбентов близка к номинальной.

Таблица 6. Загрузки реагентов и внутренняя удельная поверхность при сшивке сополимеров на основе гелевого сополимера стирола с 0.7% ДВБ.

№	Сшивающий агент		Катализатор		S _{Ar} , м ² /г
	Формула	N(СА)/ N(ПС)	Формула	N(Кат.)/ N(СА)	
21	CHCl ₃	1	AlCl ₃	1	Разрушение
22	CHCl ₃	1	0.77 AlCl ₃ + 0.23 FeCl ₃	1	Разрушение
23	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	FeCl ₃	0.3	50
24	CH ₂ (OCH ₂) ₂	0.5	FeCl ₃	1	800
25	CH ₃ OCH ₂ Cl	0.5	SnCl ₄	1	1000
26	CH ₃ OCH ₂ Cl	0.5	FeCl ₃	0.1	100
27	CH ₃ OCH ₂ Cl	0.5	FeCl ₃	0.2	200
28	CH ₃ OCH ₂ Cl	0.75	FeCl ₃	0.1	300
29	CH ₃ OCH ₂ Cl	0.5	FeCl ₃	0.3	1000
30	CH ₃ OCH ₂ Cl	0.5	FeCl ₃	0.5	1100

СА – сшивающий агент; ПС – полистирол; Кат. – катализатор.

N() – число основомолей соответствующего компонента.

Таблица 7. Основные характеристики синтезированных сорбентов. FeCl₃/МХДЭ = 0.3

Шифр сорбента	ДВБ, моль %	МХДЭ. моль/моль ПС	Степень сшивки	S _{N2} , м ² /г	Cl, %
0.5×200	0.5	1	200		
0.7×200	0.7	1	200		
1×100	1	0.5	100	800	0.7
1×150	1	0.75	150	1000	1.5
1×200	1	1	200	1050	1.8
2×100	2	0.5	100	610	0.9
2×150	2	0.75	150	730	1.7
2×200	2	1	200	900	2.3
2×300	2	1.5	300	1020	2.7
2×400	2	2	400	870	3.2
3×100	3	0.5	100	450	1
3×150	3	0.75	150	600	1.9
3×200	3	1	200	850	2.4

S_{N2} – кажущаяся удельная поверхность измеренная по изотерме адсорбции азота, многоточечным методом БЭТ [278]

3.3 Исследование структуры сорбентов с помощью ИК-спектроскопии

Для изучения влияния степени сшивки и содержания ДВБ в гелевом исходном сополимере на химическую структуру сеток мы изучили ИК спектры образцов методом нарушенного полного отражения (**НПВО ИК**).

На Рисунок 17 показаны ИК спектры исходного сополимера, и сшитых образцов с разной степенью сшивки. Отнесение полос было выполнено на основании [1; 279–281]. Для ИК спектра исходного сополимера характерны две сильные полосы 756 и 700 см^{-1} которые отвечают внеплоскостным скелетным колебаниям однозамещённого бензола. На спектре исходного сополимера также имеется три полосы в области $1400\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ отвечающие скелетным колебаниям фенила. Полоса 1445 см^{-1} является наложением полос колебания фенила, и деформационных колебаний алифатических С-Н связей. Полоса 2854 см^{-1} соответствует валентным симметричным колебаниям, а полоса 2920 см^{-1} валентным ассиметричным колебаниям алифатических С-Н связей. Полоса 3014 см^{-1} соответствует валентным С-Н колебаниям фенилов.

В ИК-спектре образца со степенью сшивки 100% появляется полоса $811\text{--}814\text{ см}^{-1}$ которая отвечает внеплоскостным колебаниям 1,4-дизамещённого бензола, а полосы незамещённого фенила 756 и 700 см^{-1} , становятся менее интенсивными. Это говорит о том, что основной является реакция пара-замещения, но даже при 100% степени сшивки в сетке остаётся заметное количество незамещённых фенилов. Из этого следует, что в структуре данной сетки должны присутствовать два- или тризамещенные бензольные кольца. Судить о наличии в структуре сетки таких высокозамещенных бензолов по ИК-спектру нельзя, но мы можем прийти к такому заключению на основе материального баланса, полагая практически полный расход МХДЭ в реакции. При увеличении степени сшивки до 200% полосы незамещённых фенилов практически исчезают, что говорит о формировании сшивающих мостиков с участием всех ароматических групп полимера.

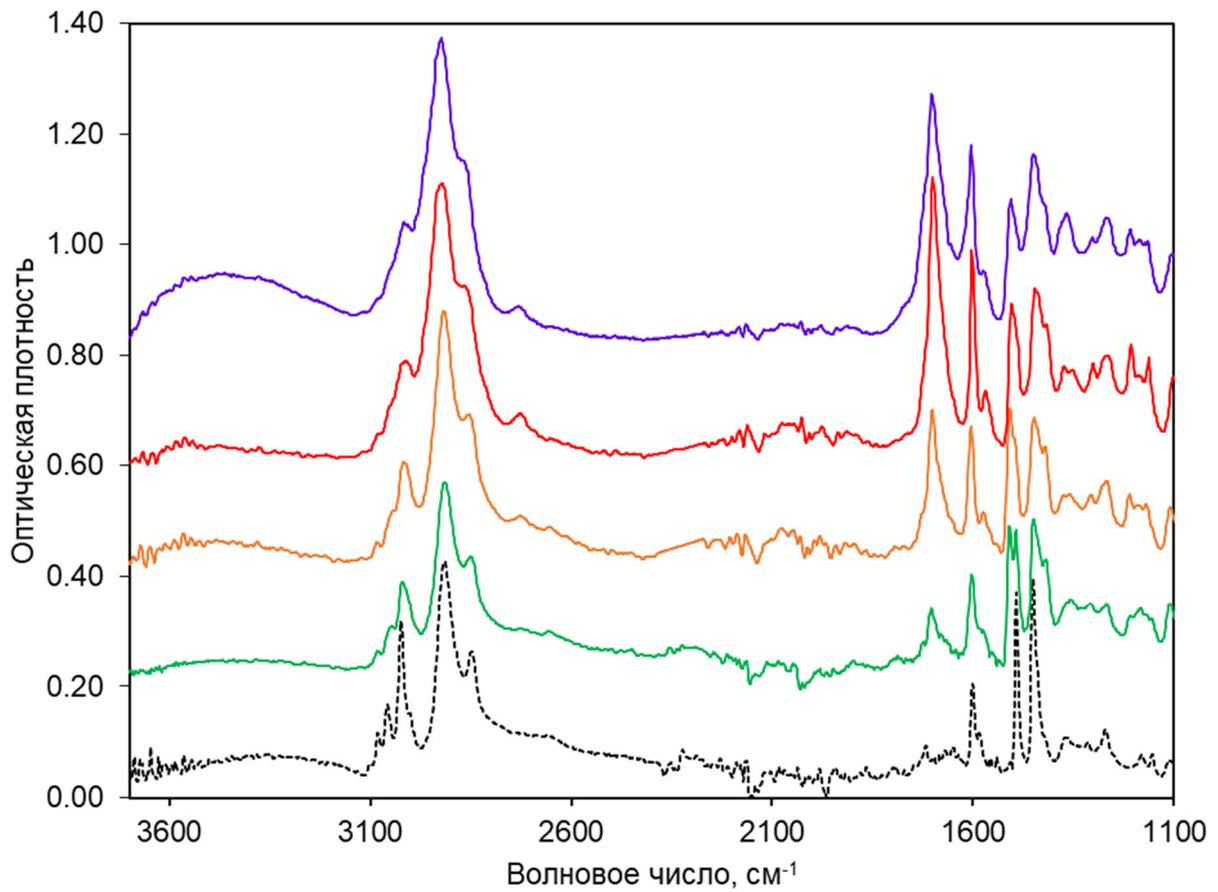
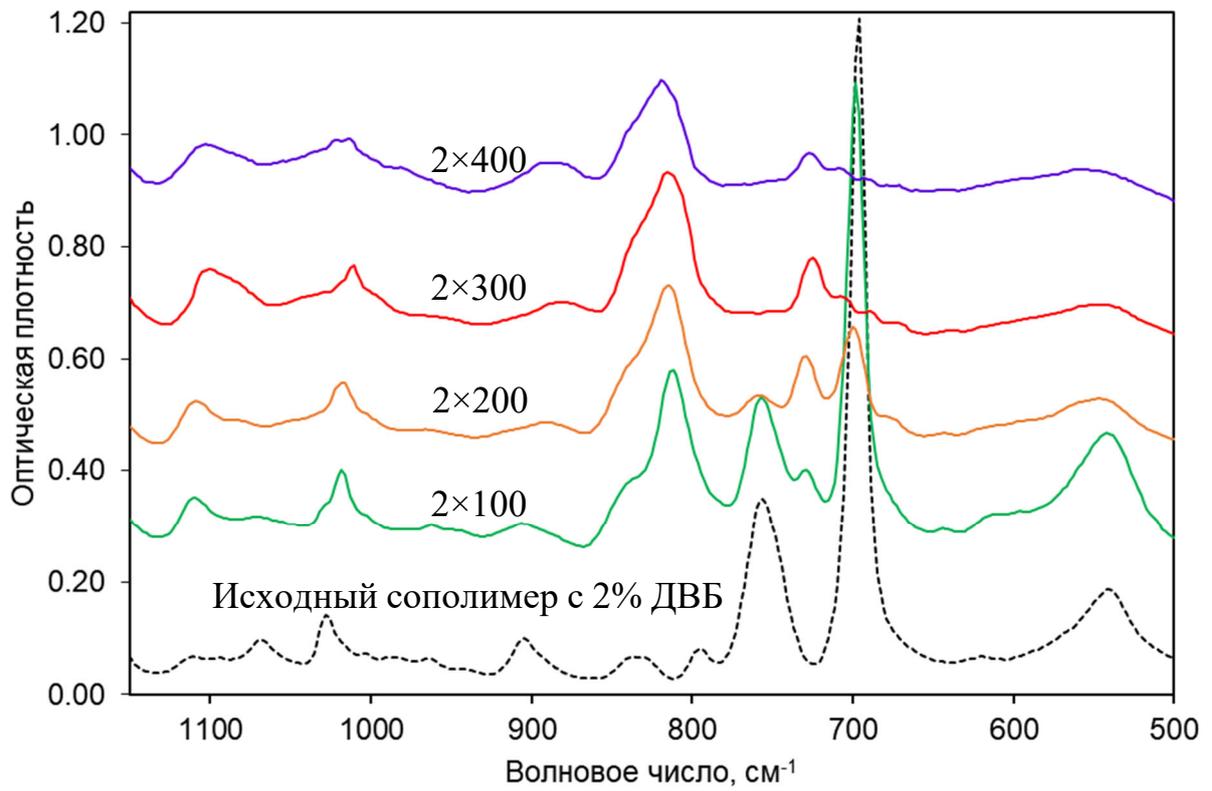


Рисунок 17. ИК спектры сверхсшитых образцов полученных на основе сополимеров с 2% ДВБ. Подписи-легенду.

Интересной особенностью ИК спектров ССП является появление интенсивной полосы 1700 см^{-1} . Обычно появление этой полосы объясняют наличием в структуре образца карбонильной группы. Однако, было надёжно установлено, что ССП, сшитые МХДЭ, не содержит $\text{C}=\text{O}$ групп [281]. Скорее всего, эта полоса соответствует групповым колебаниям неких сильно связанных фрагментов сетки [282]. Наиболее интенсивна эта полоса в спектре сетки со степенью сшивки 300-400%.

3.4 Изучение пористости полученных сорбентов

Объём пор сухого сорбента был оценён двумя методами. По первому методу объём пор рассчитывали исходя из кажущейся и истинной плотности, по следующей формуле:

$$W = \rho_{app}^{-1} - \rho_m^{-1} \quad (3)$$

где ρ_{app}^{-1} кажущаяся плотность сорбента, а ρ_m^{-1} его истинная (скелетная) плотность.

Кажущуюся плотность можно определить по насыпному весу, но проблема заключается в том, что истинная плотность ССП неизвестна. На первый взгляд, можно оценить истинную плотность как плотность атактического полистирола 1.05 г/см^3 , но такая оценка плотности будет заниженной. Действительно, коэффициент упаковки макромолекул атактического полистирола по принятым оценкам составляет ~ 0.7 [283; 284], т.е. атактический полистирол сам по себе обладает свободным объёмом около 0.33 мл/г , этот объём недоступен для гелия, азота или аргона, поэтому он не может рассматриваться как объём пор. При сшивке между цепями вводятся жёсткие мостики, они ведут себя как распорки, делая полимерную сетку более рыхлой и проницаемой. При этом, по крайней мере часть свободного объёма должна стать доступной для газов. Другую оценку для истинной плотности ССП можно получить из расчёта Ван-дер-Ваальсова объёма полимерной сетки. Однако это значение плотности будет завышено, потому что такой расчёт предполагает полную доступность всего межцепного объёма для газов. На Рисунке

18 представлен пример расчёта объёма звена сверхсшитого полистирола, инкременты объёма взяты из работы Аскадского А.А. [283].

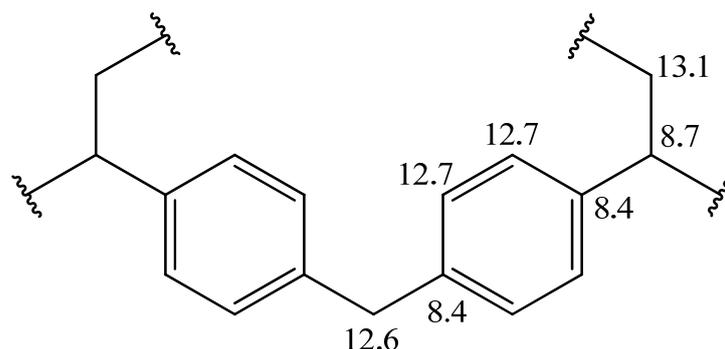


Рисунок 18. Инкременты, Å^3 для расчёта Ван-Дер-Ваальсова объёма звена сверхсшитого на 100% полистирола.

Второй метод оценки объёма пор микропористого материала основан на объёме адсорбированного азота при $p/p_0 \rightarrow 1$. Данные, полученные с помощью описанных подходов, сведены в таблице 8.

Таблица 8. Плотность и объём пор сверхсшитых полимеров

Образец	V , мл/г	ρ_{app} , г/мл	ρ_v , г/мл	W_A , мл/г	W_V , мл/г	W_{N_2} , мл/г
1×0 (исходный)	1.62	1.05*	1.84	0.00	0.41	0
0.5×100	1.79	0.93	1.91	0.10	0.53	0.46
0.5×200	2.30	0.74	1.97	0.40	0.85	0.83
0.7×200	1.99	0.85	1.97	0.22	0.67	0.66
1×100	1.78	0.95	1.91	0.10	0.53	0.41
1×150	1.9	0.89	1.94	0.17	0.61	0.59
1×200	1.91	0.89	1.97	0.17	0.62	0.61
2×50	1.65	1.03	1.88	0.02	0.44	0.15
2×100	1.75	0.97	1.91	0.08	0.51	0.35
2×150	1.76	0.96	1.94	0.09	0.52	0.41
2×200	1.78	0.95	1.97	0.10	0.54	0.49
2×300	1.80	0.94	2.03	0.11	0.57	0.53
2×400	1.76	0.96	2.09	0.09	0.56	0.48
3×100	1.67	1.01	1.91	0.03	0.46	0.24
3×150	1.72	0.99	1.94	0.06	0.50	0.33
3×200	1.75	0.97	1.97	0.08	0.52	0.45

V – удельный насыпной объём полимера,

ρ_{app} – кажущаяся плотность полимера,

ρ_v – скелетная плотность полимера, рассчитанная по [283],

W_A – объём пор, рассчитанный на основании плотности атактического полистирола,

W_V - объём пор, рассчитанный на основании скелетной плотности,

W_{N_2} – объём пор по максимальной адсорбции азота,

* плотность непористого атактического полистирола.

Анализируя данные, представленные в таблице 4, можно заметить, что объём пор, рассчитанный исходя из плотности атактического полистирола, W_A , заметно меньше объёма пор, доступного для азота. Напротив, для большинства исследованных структур объём пор, рассчитанный с использованием Ван-дер-Ваальсовой скелетной плотности, оказался выше объёма пор по азоту, из 15 исследованных образцов только четыре полимера продемонстрировали примерное равенство указанных объёмов пор (0.5×200, 0.7×200, 1×150 и 1×200). Для наглядности те же данные представлены на Рисунке 19.

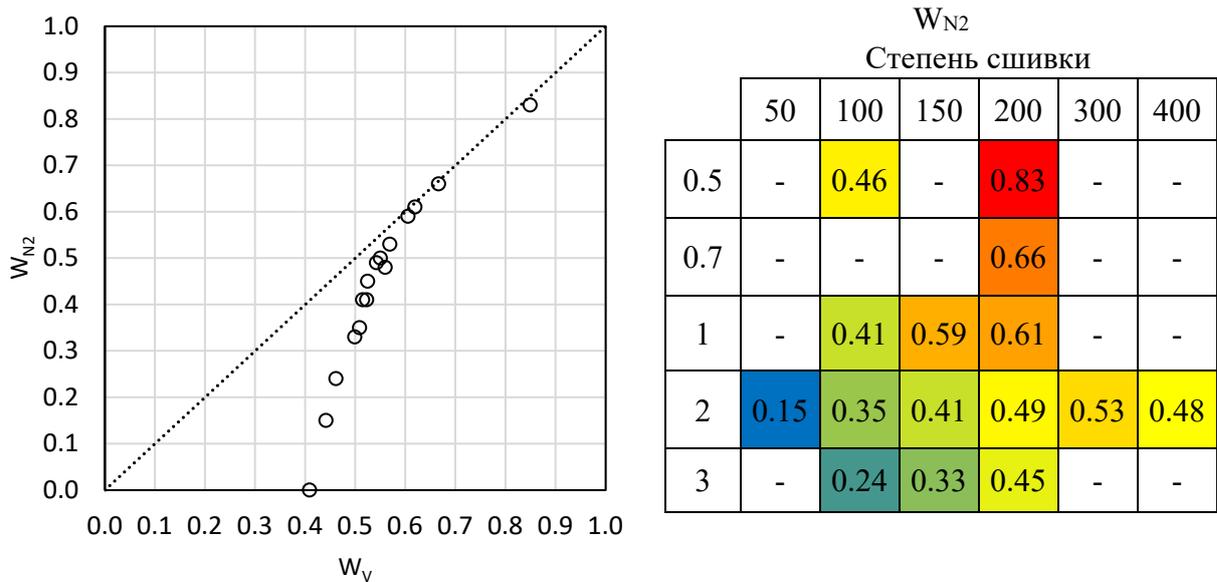


Рисунок 19. А-График связи между W_{N_2} и W_V . Б-Тепловая карта объёма пор, W_{N_2} , для синтезированных сеток. На этой диаграмме ось X соответствует степени сшивки, ось Y - содержанию ДВБ в сополимере, а значение объёма пор, W_{N_2} , указано на пересечении соответствующих значений X и Y, и дополнительно обозначено цветом.

Чёткую корреляцию между значениями W_{N_2} и W_V , можно объяснить тем, что при уменьшении плотности сетки, возрастает объём пустот доступных для молекул азота, пока практически весь объём пустот полимера не станет доступным для азота. Для самых рыхлых сетей, объём пор, рассчитанный по формуле (3) на основе

скелетной Ван-Дер-Ваальсовой плотности, даёт хорошее приближение к объёму пор измеренной по азоту. В целом, можно утверждать, что объём пор сверхсшитого полимера растёт с увеличением степени сшивки и с уменьшением ДВБ в исходном гелевом сополимере.

Кажется странным, что в ряде случаев W_{N_2} практически равен W_v . Трудно представить, что весь межцепной объём полимера заполняется молекулами азота. Вероятно, плотность жидкого азота, сконденсированного в микропорах, выше макроскопической плотности жидкого азота, которую обычно используют для расчёта объёма пор из изотермы адсорбции. При рассмотрении изотерм сорбции паров азота обращает на себя внимание сильный гистерезис (десорбционная ветвь изотермы располагается выше адсорбционной ветви), который простирается во всём интервале относительных давлений (Рисунок 20). Сухая сверхсшитая сетка сильно напряжена и конформационно подвижна. Можно предположить, что под воздействием молекул азота сетка перестраивает свою структуру, чтобы тем самым хотя бы частично снять сильные внутренние напряжения. Перестройка структуры может сопровождаться увеличением доступности порового пространства для молекул азота, однако мы экспериментально не обнаружили макроскопическое набухание синтезированных сеток. Jeromenok и соавт. [285] исследовали пористую структуру PIM-1 (*polymer of intrinsic microporosity*) и получили для него изотерму сорбции азота с широким гистерезисом, аналогичную нашей. Хотя они обнаружили незначительное макроскопическое увеличение объёма полимера в процессе адсорбции азота, они сделали вывод, что лишь этого увеличения объёма недостаточно для объяснения гистерезиса. Авторы объясняют обширный гистерезис тем, что при насыщении полимера азотом, структура частично искажается и некоторые ранее недоступные пустоты становятся доступными для сорбата. Впрочем, выраженный гистерезис сорбции газов при низкой температуре требует дополнительного изучения.

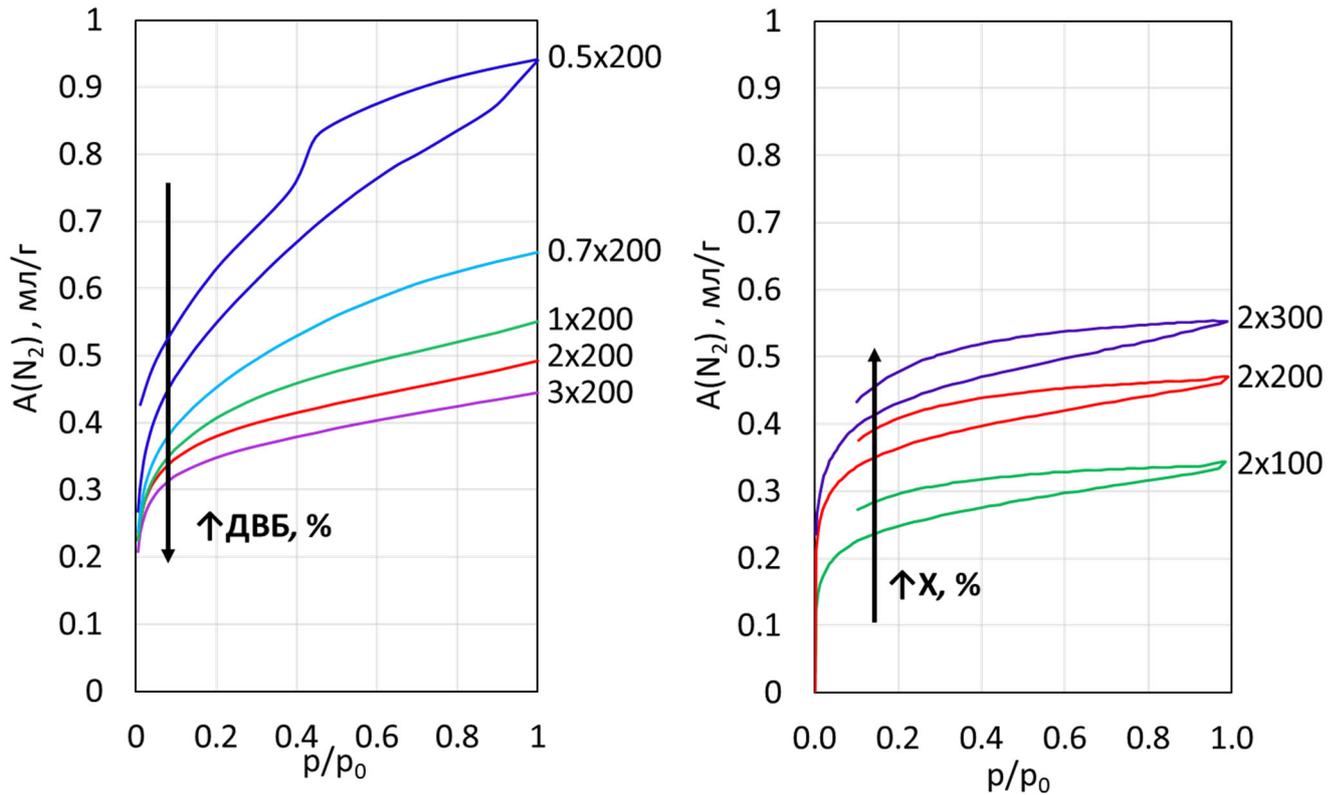


Рисунок 20. Изотермы сорбции азота при 77К на сверхсшитых полимерах

Изотермы адсорбции азота при 77К также дают информацию о пористой структуре ССП. По классификации ИЮПАК изотермы сорбции азота на полученных сорбентах относятся к Ib типу (Рисунок 20). Крутой подъём изотермы при низком давлении говорит о наличии большого объёма микропор. К сожалению, нет общепринятой надёжной модели для описания адсорбции азота на ССП и получения достоверной количественной информации о структуре пор. Для получения качественной информации о пористой структуре сорбентов мы воспользовались модельно независимым подходом на основе сравнительного α_s метода Синга [286]. Для этого изотермы были нормированы на величину адсорбции при относительном давлении 0.4. При этом давлении завершается однослойное заполнение плоских поверхностей и объёмное заполнение истинных микропор, поэтому Синг предложил использовать эту точку в качестве инварианта. Относительное расположение нормированных изотерм не зависит ни от закона адсорбции, ни от суммарного объёма пор, а определяется только адсорбционными потенциалом

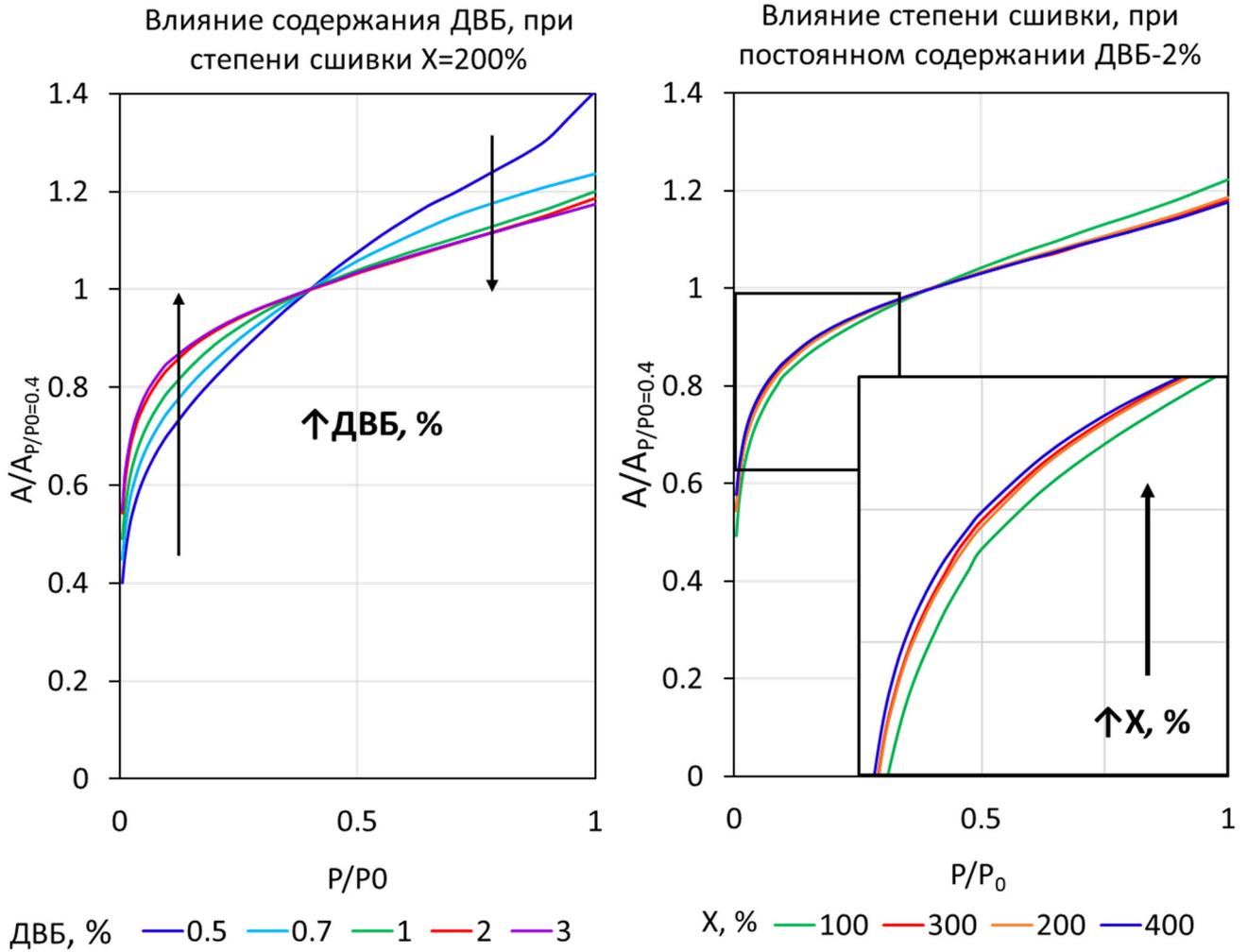


Рисунок 21. Нормированные изотермы адсорбции азота

На Рисунке 21А представлены нормализованные изотермы, полученные для ряда сорбентов со степенью сшивки $X=200\%$ но полученные из сополимеров с разным содержанием ДВБ. Видно, что при повышении содержания ДВБ крутизна изотермы в области низкого давления растёт, т.е. изотерма становится более выпуклой, что однозначно говорит об увеличении адсорбционного потенциала. Учитывая сходную химическую структуру этих сорбентов, можно заключить, что основной вклад в увеличение адсорбционного потенциала вносит уменьшение среднего размера пор (по мере увеличения доли ДВБ. в исходном сополимере) Данный вывод согласуется с увеличением крутизны изотермы в области высокого давления при уменьшении содержания ДВБ, что соответствует заполнению более крупных пор чем те, что заполняются при $P/P_0 < 0.4$.

Аналогичное построение для сорбентов синтезированных на основе форполимера с 2% ДВБ, но разной степенью сшивки представлено на Рисунке 21Б. Как можно видеть, изотермы в целом аффинны, а адсорбционный потенциал при увеличении степени сшивки увеличивается незначительно. Из-за того, что эта серия сорбентов имеет разное среднее число заместителей в ароматическом ядре, мы не можем утверждать о равенстве адсорбционных потенциалов, поэтому на основании изотермы невозможно сделать вывод об относительном изменении размера пор в этом ряду.

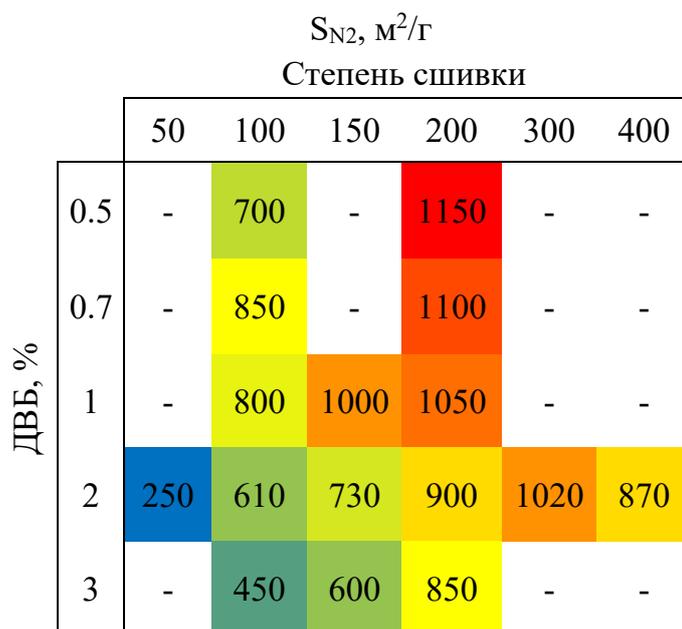


Рисунок 22. Тепловая карта S_{N_2} синтезированных сеток.

Помимо суммарного объема пор и качественной информации о размере пор, из изотермы адсорбции азота можно рассчитать кажущуюся удельную поверхность. На Рисунке 22 приведена тепловая карта рассчитанных методом БЭТ величин кажущейся внутренней удельной поверхности синтезированных образцов. В целом, при постоянной степени дополнительной сшивки S_{N_2} уменьшается с ростом содержания ДВБ в исходном сополимере. Если же один и тот же сополимер сшивать разным количеством МХДЭ, от 50% до 300%, удельная поверхность возрастает, но затем немного снижается при увеличении степени сшивки до 400%. По всей видимости, такая сетка становится очень плотной, и часть её внутреннего объема уже оказывается недоступной для молекул азота. Заметим, что величины

S_{N_2} измерены для образцов в сухом состоянии, и они не могут быть непосредственно использованы для объяснения наблюдаемых закономерностей в изменении сорбционных свойств набухших в растворителе сорбентов.

3.5 Закономерности набухания полученных сорбентов

Все синтезированные сверхсшитые сорбенты при внесении их в любой органический растворитель набухают, т.е. увеличивают свой объём. Что касается воды, то она напрямую гидрофобные полимеры не смачивает. Однако это препятствие можно обойти, если полимеру дать набухнуть в растворителе, смешивающемся с водой (спирт, ацетон, диоксан и т.п.) а затем удалить этот растворитель избытком воды. При этом, полимер остается набухшим в воде. Существует 2 способа измерения набухания, объёмный метод, который отражает изменение объёма полимера, и весовой метод, который отражает объём поглощённого растворителя, который можно интерпретировать как объём пустот (пор) полимера (Рисунок 23). Эти два метода дают одинаковые результаты для классических полимерных гелей, в т.ч. непористых ионитов.

На первый взгляд тенденции изменения объёмного и весового набухания ССП различны (Рисунок 23). Такое поведение можно легко объяснить, учитывая, что ССП содержит большой объём пор как в сухом, так и в набухшем состоянии. Весовое набухание можно интерпретировать, как объём пор полимера в набухшем состоянии, а объёмное набухание как увеличение объёма полимера при переходе из сухого в набухшее состояние. Действительно, увеличение объёма полимерных частиц меняется подобно увеличению объёма пор при набухании (стрелки Рисунок 23), поэтому оба метода измерений набухания согласуются.

Степени первичной и вторичной сшивки оказывают разное влияние на набухание полимеров в воде и толуоле. С повышением степени первичной сшивки набухание полимеров в толуоле уменьшается. Влияние этого фактора на набухание образцов в воде проявляется в меньшей мере. В свою очередь, повышение степени вторичной сшивки практически не оказывает влияния на объём поглощенного

толуола, но приводит к повышению объёма поглощенной воды и объёмной деформации образцов.

Наблюдаемые закономерности согласуются с предложенной моделью структуры ССП, в которой набухание определяется размером и степенью зацепления составляющих её макроциклов, а также внутренними напряжениями в полимере[1; 173].

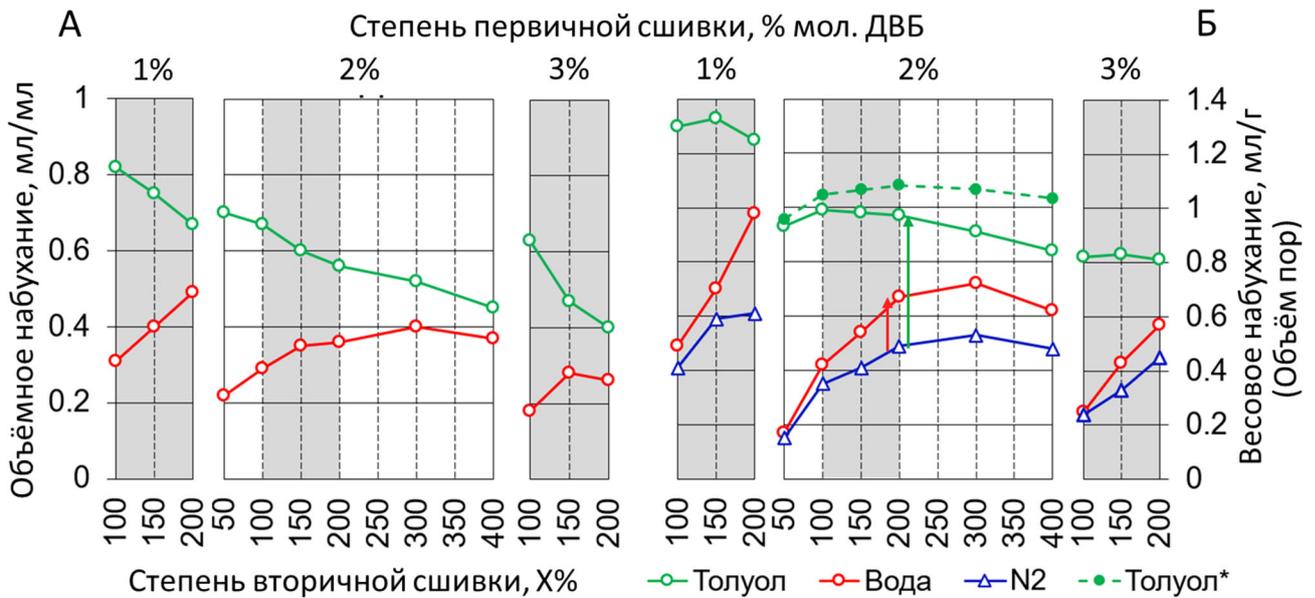


Рисунок 23. Степень набухания сверхсшитых сеток, измеренная объёмным¹ (А) и весовым² (Б) методом. Для сравнения приведена зависимость максимального объёма поглощённого N₂ сухим полимером.

* Набухание, пересчитанное на массу исходного сополимера.

Степень набухания в воде меньше, чем в толуоле, т.к. сила взаимодействия воды с гидрофобной полимерной сеткой слабее, чем с толуолом. Основным фактором, определяющим набухание ССП в воде, является величина внутренних напряжений в сетке. Чем больше в ССП жёстких мостиков-распорок, тем выше в ней внутренние напряжения, релаксация которых реализуется при набухании в воде. Как следствие, чем выше внутренние напряжения, тем больше воды поглощает сетка.

¹ Степень объёмного набухания = $(V_s - V_d)/V_d$, где V_s – объём набухшего полимера, V_d – объём сухого.

² Степень весового набухания = $(m_s - m_d)/(m_d \times \rho)$, где m_s – масса набухшего полимера, m_d – масса сухого полимера, ρ – плотность растворителя.

Набухание в толуоле свидетельствует о максимально возможной объёмной деформации сетки, а поглощенный объём этого растворителя соответствует удерживаемому объёму ДХЭ по завершению реакции вторичной сшивки. Степень первичной сшивки, определяемая содержанием ДВБ в форполимере, предопределяет объём набухшей в ДХЭ сетки сополимера на момент начала и окончания реакции вторичной сшивки. Степень же вторичной сшивки в меньшей мере влияет на объём набухшей сетки, т.к. сверхсшитая сетка уже на ранних стадиях формирования становится очень жёсткой, и дальнейшее введение сшивок мало влияет на её конечный объём.

3.6 Исследование сорбционных свойств в статических условиях

Из имеющегося обширного собственного и литературного опыта способность поглощать малые молекулы не вызывает сомнений, поэтому в первую очередь мы определили сорбируют ли полученные сверхсшитые сорбенты белки. Наибольший интерес представляет адсорбция человеческого сывороточного альбумина, как основного белкового компонента крови. Альбумин имеет молекулярную массу 65 кДа и гидродинамический диаметр около 80 Å. В качестве модельного маленького белка был взят цитохром С, с молекулярной массой 12 кДа и гидродинамическим радиусом около 34 Å. Сорбцию белков проводили из 0.05M фосфатного (Na или K?) буферного раствора pH 6.9 с концентрацией аналита 0,1%. Лишь самые рыхлые сетки, синтезированные на основе сополимеров с 0.5, 0.7% ДВБ хорошо сорбируют небольшой Цитохром С, и сорбируют лишь незначительное количество ЧСА. Сорбция белков на более плотных сорбентах оказалась ниже чувствительности метода. Обратим внимание, что 0.7×100, сорбирует гораздо большее количество цитохрома чем похожий сорбент, но с большей степенью сшивки 0.7×200, что говорит о тенденции к уменьшению размера пор в набухшем состоянии с увеличением степени сшивки, несмотря на общий рост объёма пор. Этот вывод согласуется с полученным ранее при рассмотрении изотерм сорбции азота при 77К

Для сравнения в таблице приведена адсорбция тех же белков двумя промышленными сверхсшитыми сорбентами. Сорбент MN-200, который содержит как макро, так и микропоры, практически полностью сорбирует оба белка. Сорбент MN-270, который позиционируется производителем как микропористый, поглощает более 40% Цитохрома С, но только 5% более крупного белка ЧСА. Следовательно, оба промышленных сорбента не могут применяться как RAM. При этом полученные в этой работе сорбенты на основе сополимеров с 2 и 3% ДВБ, не сорбируют белки, и могут найти применение в качестве RAM.

Таблица 9. Сорбция веществ различной молекулярной массы.

	ЧСА	Цитохром С	В12
М, г/моль→	65×10^3	12×10^3	1.4×10^3
Сорбент↓	Сорбция, %		
MN-200	89	99	80
MN-270	5	44	67
0.5×100	9	98	94
0.5×200	4	65	100
0.7×100	2	96	96
0.7×200	<1	25	100
1×100	<1	3	95
1×150	<1	1	98
1×200	<1	<1	100
2×100	<1	<1	87
2×150	<1	<1	96
2×200	<1	<1	97
2×300	<1	<1	82
2×400	<1	<1	59
3×100	<1	<1	33
3×150	<1	<1	80
3×200	<1	<1	78

Серым цветом выделены полимеры, большинство пор которых не доступны для соответствующих сорбатов.

Чтобы сорбент нашёл свое применение для ТФЭ низкомолекулярных метаболитов из биологических жидкостей сорбент должен не сорбировать белки, но сорбировать достаточно крупные молекулы метаболома. В качестве возможного

крупного анализа мы выбрали цианокобаламин (витамин В12) с молекулярной массой 1355 г/моль и протестировали его сорбцию на полученных сорбентах. Все сорбенты отлично сорбируют В12, $\geq 80\%$, лишь 2 сорбента, 2×400 и 3×100 относительно плохо сорбируют этот витамин, 65 и 33% соответственно. Из анализа изотерм известно, что 2×400 вероятно обладает самыми малыми порами в сухом состоянии, и набухает в воде незначительно, поэтому можно предположить, что низкую сорбцию В12 обеспечивает ситовой эффект. Сорбент 3×100, сорбирует витамина В12 меньше, чем сорбенты 3×150 и 3×200, которые вероятно имеет поры меньшего размера в сольватированном водой состоянии, поэтому низкую сорбцию витамина можно объяснить самым низким суммарным объёмом пор сорбента 3×100 в набухшем состоянии среди всех синтезированных сеток.

Из этого эксперимента можно заключить, что наиболее перспективны сверхсшитые RAM на основе сополимера с 2% ДВБ, действительно, сорбенты на основе сополимера с 1% поглощают небольшой белок Цитохром С, и не могут рассматриваться как полноценные RAM, а сорбенты с 3% ДВБ, обладают пониженной пористостью и плохо сорбируют крупный потенциальный анализит – В12.

Следующим шагом было пилотное сравнение сорбционных свойств полученных сорбентов по отношению к малым молекулам. Мы изучили сорбцию пентоксифиллина (лекарственный препарат, улучшающий периферическое кровоснабжение), пиридоксина (витамин В6) и аскорбиновая кислоты из индивидуальных 10^{-2} М водных растворов. Все сорбенты в приведённых условиях практически полностью сорбируют пентоксифиллин, $<95\%$ (<211 мг/г), что говорит о высокой доступности пор полученных сорбентов для молекулы пентоксифиллина. Исключение составляет сорбент 3×100, который поглощает лишь 87% препарата

Таблица 10. Сорбция некоторых фармпрепаратов различной гидрофильности.

	Пентокси- филлин	Пиридоксин	Витамин С
LogP	0.29	-0.7	-1.85
M, г/моль→	278	196	176
Сорбент↓	Сорбция, %		
MN-200	95		67
1×100	99	59	37
1×150	99	55	37
1×200	99	57	34
2×100	98	47	33
2×150	100	55	34
2×200	99	56	34
2×300	100	59	40
2×400	95	57	45
3×100	87	47	36
3×150	98	48	33
3×200	99	49	37

Пиридоксин в тех же условиях сорбируется значительно хуже, т.к. он обладает большей гидрофильностью чем пентоксифиллин ($\text{LogP} = -0.7$ и 0.29 , соответственно). Сорбция пиридоксина незначительно падает при увеличении содержания ДВБ в прекурсор, и растёт с увеличением степени сшивки. Сорбция аскорбиновой кислоты, $\text{LogP} = -1.85$, в этих условиях ещё ниже, примерно одинакова для всех сорбентов и составляет 33-40%. Интересно, что в тех же условиях промышленный сорбент MN-200 поглощает 87% кислоты. Вероятно, такая высокая сорбция полярной молекулы может быть объяснена наличием в промышленном сорбенте полярных групп, на что указано в нескольких работах [287; 288].

Вполне естественно, что сорбция органических соединений на гидрофобном ССП из водных растворов зависит от гидрофобности сорбатов. Для исследования этой зависимости была измерен весовой коэффициент распределения аналита между фазой раствора и сорбента в статических условиях для веществ различной гидрофобности. На Рисунок 24 по оси X отложен десятичный логарифм

измеренного весового коэффициента распределения, а по оси Y LogP сорбатов. Как видно из графика, эффективность сорбции на сорбенте 2×200 хорошо коррелирует с гидрофобностью сорбатов, и на 2-3 порядка выше, чем эффективность сорбции с помощью октанола-1. При увеличении гидрофильности сорбатов сорбция на ССП падает медленнее, чем LogP сорбатов, что указывает на дополнительные к гидрофобным взаимодействиям сорбат-сорбент и позволяет использовать ССП для ТФЭ высокополярных соединений.

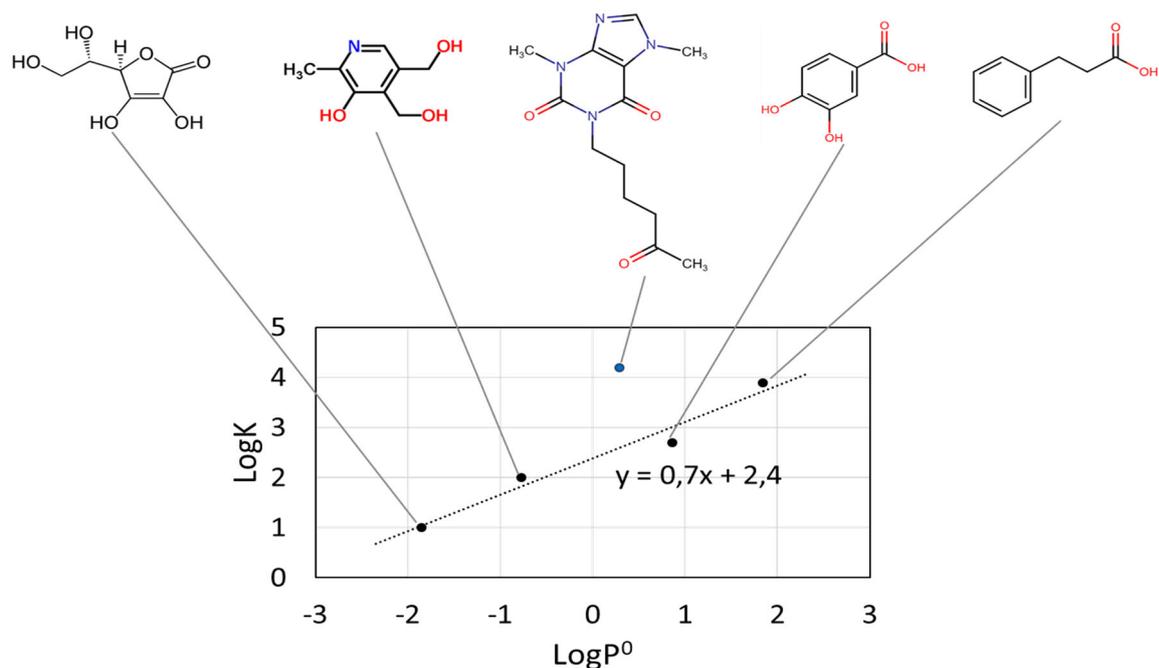


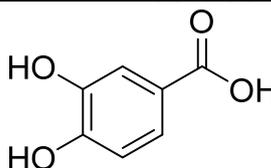
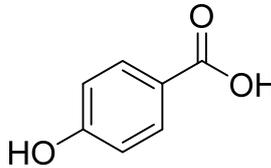
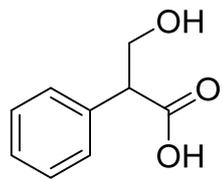
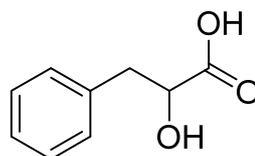
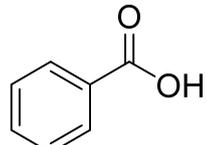
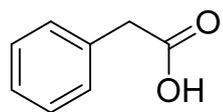
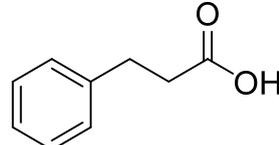
Рисунок 24. Зависимость коэффициента распределения сорбент-раствор от гидрофобности сорбатов. Сорбция нейтральной формы сорбата из раствора с концентрацией вещества 0.5 г/л в буфере необходимого рН.

3.7 Изучение сорбции ФКК в статических условиях

Особый интерес представляет сорбция фенолкарбоновых кислот на полученных новых сорбентах. Эти кислоты являются метаболитами двух аминокислот, фенилаланина и тирозина, которые играют регуляционную роль в организме человека. Нормальный суммарный уровень фенолкарбоновых кислот в сыворотка крови здоровых людей составляет примерно 12 мкМ, а нижний предел составляет 3 мкМ [286]. При острых воспалительных заболеваниях, особенно сепсисе, общий уровень кислот увеличивается в несколько раз, а баланс между

отдельными кислотами также меняется [4; 289–292]. В этой работе, в качестве модельных ФКК, было выбрано семь кислот (Таблица 11), 4 из которых ранее предлагалось использовать в качестве биомаркеров сепсиса [4; 289; 292].

Таблица 11. Фенилкарбоновые кислоты, используемые в этой работе. Полуужирным шрифтом отмечены потенциальные ранние маркеры сепсиса.

Название кислоты	Сокращение	Структура
3,4-дигидроксibenзойная к.	ДГБК	
4-гидроксibenзойная к.	ГБК	
3-гидрокси-2-фенилпропионовая к. (тропическая кислота)	ТК	
2-гидрокси-3-фенилпропионовая к. (β-фенилмолочная кислота)	ФМК	
бензойная к.	БК	
фенилуксусная к.	ФУК	
3-фенилпропионовая к.	ФПК	

В первую очередь была изучена групповая сорбция 6 ФКК в статических условиях из буферного раствора pH 4, содержащего каждую кислоту в концентрации 5×10^{-4} М. Результаты хроматографического определения сорбции приведены Таблица 12. Сорбенты 1×100, 2×100 - 2×300 способны адсорбировать в статических условиях из модельного раствора смеси ФКК более 99% наиболее гидрофобной 3-фенилпропионовой кислоты. Даже поглощение наиболее

гидрофильной 3,4-дигидроксibenзойная кислоты очень высоко, и составляет от 78% до 87%. Адсорбция других кислот находится между сорбцией наиболее полярной, и наиболее гидрофобной кислоты.

Таблица 12. Сорбция ФКК, %, из смешанного раствора, содержащего каждую кислоту в концентрации 5×10^{-4} М.

Кислота	LogP	Сорбенты					
		1×200	2×100	2×150	2×200	2×300	2×400
ДГБК	0.86	82.0	77.7	78.4	81.3	85.4	86.7
ГБК	1.18	92.0	91.5	92.2	92.0	90.5	89.6
ТК	1.53	92.6	94.8	94.7	91.8	90.1	86.3
ФМК	1.89	91.6	94.5	93.9	92.9	91.5	89.9
БК	1.87	96.9	98.3	98.0	96.6	95.6	93.5
ФПК	1.98	99.6	99.8	99.7	99.5	99.1	98.4

На Рисунке 25 результаты рассматриваемого сорбционного эксперимента представлены как логарифм весового распределения, делённый (нормированный) на LogP собрата. Изучая сорбцию в таком представлении, можно сделать некоторые выводы относительно не гидрофобной составляющей взаимодействия сорбат-сорбент.

Из литературы известно, что вторичная сила, определяющая сорбцию на ССП, в большинстве случаев является π - π взаимодействием. Например, вклад π – π взаимодействия при удерживании замещённых бензолов и полиароматических углеводородов на сверхсшитой полистирольной хроматографической фазе был изучен в работах Сычёва и соавт. [293; 294]. В этих работах методом факторного анализа они показали, что в режиме обращено-фазовой хроматографии указанных соединений основной вклад в их удерживание вносит гидрофобность соединения, а в условиях нормально-фазовой хроматографии основной вклад даёт π – π взаимодействие, причем сила π – π взаимодействия тем сильнее, чем более сильные электроноакцепторные или электронодонорные заместители связаны с ароматическим ядром аналита, такой режим разделения авторы назвали квази-нормальным. Иными словами, в неводной среде, когда невозможно гидрофобное взаимодействие, сила взаимодействия аналит-ССП определяется различием в их электронных плотностях. Это явно указывает на образование π -комплексов с

переносом заряда между ароматическими системами ССП и ароматического сорбата.

Вклад π - π взаимодействия в удерживание так-же значителен в водно-органических средах [295–298]. Кроме того, в работе [299] была изучена сорбция ряда разнообразных ароматических и полиароматических соединений из водно-органических сред, на специфических сорбентах - сверхсшитых микросферах, с номинальными степенями сшивки 300, 400 и 500%. Авторы пришли к выводу о схожей селективности этих 3х сорбентов. Отметим, что гелевые микросферы полученные осадительной полимеризацией, по-видимому, значительно отличаются от геля, полученного суспензионным методом, кроме того, для сверхсшитых микросфер доступны только изотермы адсорбции азота, но нет важной информации о набухании. Поэтому мы не можем перенести эти данные об адсорбции из водно-органических сред, на адсорбцию из водных растворов для наших полимеров. Подтверждение локализованной адсорбции так-же получено в [300; 301]. Таким образом, ранее было подробно изучено влияние структуры сорбата на силу π – π взаимодействия, но не структуры сорбента (степени сшивки).

Возвращаясь к графику на Рисунке 25, можно заметить, что нормированный коэффициент распределения тем выше, чем больше полярных заместителей в ароматическом ядре, что полностью согласуется с вышесказанным [293; 294]. Кроме того, удерживание полярной ДГБК растёт с увеличением степени сшивки, а удерживание не полярной ФПК падает в том же ряду. Это говорит об усилении вклада π - π взаимодействия в сорбционный потенциал при увеличении степени сшивки сорбента, т.е. при увеличении числа замещений в ароматических ядрах сорбента. Можно заметить, что в рассматриваемых условиях сорбент 1×200, обладает схожей селективностью, что и сорбент 2×200, несмотря на различный объём пор этих сорбентов в сольватированном состоянии. Иными словами, селективность сорбции определяется именно химической структурой сверхсшитого сорбента.

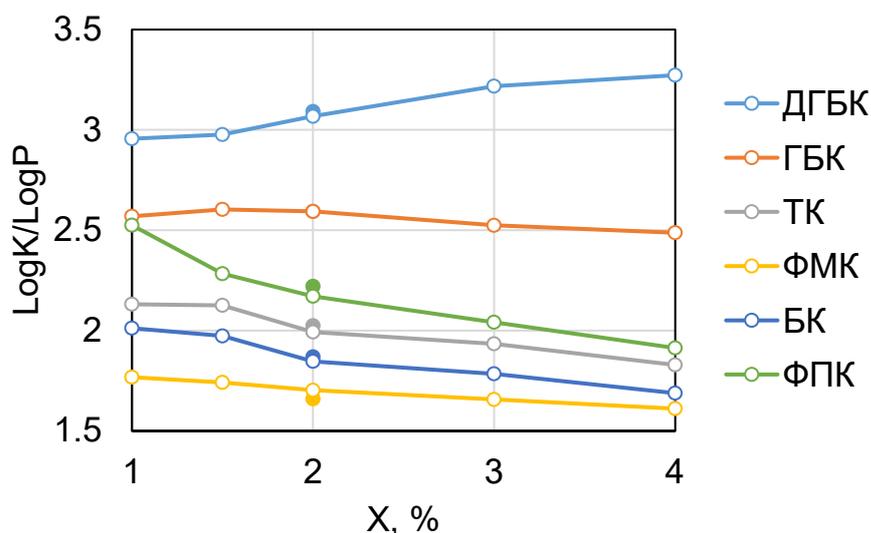


Рисунок 25. Зависимость нормированного на гидрофильность логарифма распределения кислот от степени сшивки сорбента. Проколотые метки – ряды сорбентов на основе сополимера с 2% ДВБ, закрашенные метки - 1×200

Эффективность процедуры ТФЭ ФКК зависит не только от величины их сорбции, но и от полноты десорбции этих кислот из матрицы ССП. В таблице 13 приведён результат эксперимента по последовательной статической сорбции 3,4-дигидроксибензойной кислоты и её десорбции небольшим количеством подщелочённого метанола. Сорбция является полностью обратимой, а степень извлечения для всех сорбентов варьируется от 77 до 84%. Для большинства сорбентов, степень экстракции остаётся неизменной при переходе от водного к белковому раствору ДГБК, что позволяет использовать эти сорбенты как RAM. Исключение составляют лишь сорбенты MN-270 и 1×100, степень извлечения на которых падает в присутствии белка. Вероятная причина в том, что эти сорбенты не являются RAM, а следовательно, сорбируют ЧСА, который может дополнительно удерживать аналит.

Таблица 13. Степень экстракции, %, индивидуальной 3,4-дигидроксибензойной кислоты 10^{-4} М из водного и белкового раствора с рН 4.

Сорбент	Водный раствор			Раствор с ЧСА 40г/л. Степень экстракции, %
	Сорбция, %	Десорбция, %	Степень экстракции, %	
MN-270	85	95	81	74
1×100	83	99	83	70
1×150	88	96	84	80
1×200	87	95	83	81
2×100	81	97	79	74
2×150	87	96	84	82
2×200	85	97	83	83
3×100	79	98	78	-
3×150	87	95	82	-
3×200	86	95	81	-

3.8 Изучение сорбции ФКК в динамических условиях

Для ТФЭ ФКК были собраны и упакованы самодельные миниатюрные патроны из полиэтиленовых трубок совместимые с разъёмом *Luer* (Рисунок 26). Патрон с внутренним диаметром 4 мм, вмещал 30 мг сорбента, при этом высота патрона варьировалась от 5,6 до 6 мм в зависимости от насыпной плотности сорбента. Перед всеми экспериментами патрон кондиционировали последовательно 5 мл ацетона, 2 мл метанола, 5 мл чистой воды Milli-Q, и 2 мл подкисленной воды с помощью шприцевого насоса или мэнифолда. Сорбция ФКК проводилась из подкисленного раствора с рН 4 для подавления диссоциации ФКК

В ходе предварительных экспериментов было выяснено что оптимальная скорость потока пробы составляет 0.5 мл/мин (Рисунок 27), при большей скорости значительно падает объём проскока, а при меньшей объём проскока растёт незначительно, но значительно увеличивается время экстракции. Заметим, что несмотря на кажущуюся маленькую объёмную скорость перфузии раствора, в

маленьком патроне это соответствует высокой линейной скорости потока, а время контакта каждой порции раствора с сорбентом составляет не более 6 секунд.

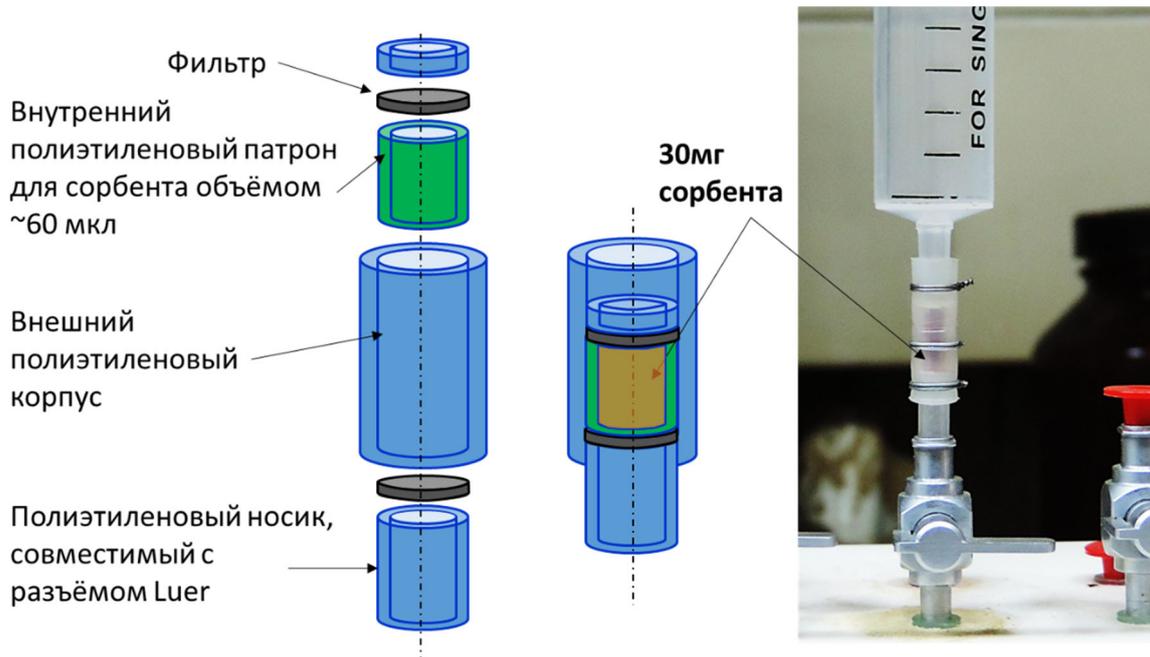


Рисунок 26. Устройство самодельных микропатронов для ТФЭ

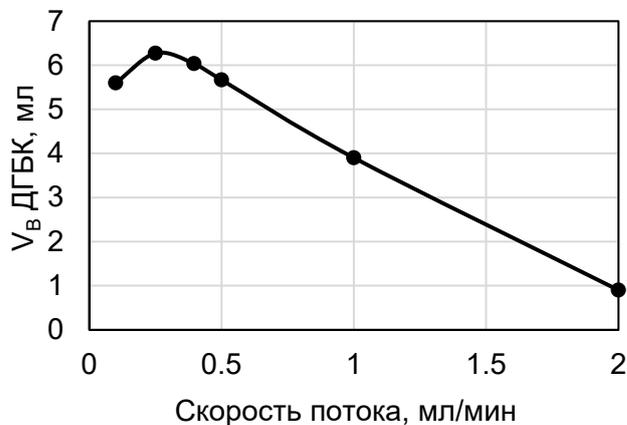


Рисунок 27. Зависимость объёма проскока ДГБК из раствора 5×10^{-5} М, рН 4 на патроне с сорбентом 2×150 от скорости потока

Для изучения особенностей сорбции ФКК на миниатюрных патронах были получены кривые проскока двух кислот, самой гидрофильной - ДГБК и самой гидрофобной – ФПК, из индивидуальных подкисленных растворов рН 4 с концентрацией кислот 5×10^{-5} М и 5×10^{-4} М. Кривы проскока представлены на Рисунке 28. Мы приняли в качестве уровня проскока $C/C_0 = 3\%$, что соответствует примерно 1% потерянного аналита (потерянный аналит рассчитывался интегрированием кривой проскока). Дрейф сигнала может привести к сильной

ошибке в определении объёма проскока на такой низкой концентрации аналита. Поэтому был принят ряд экспериментальных мер для снижения дрейфа, все эксперименты были продублированы, а точность регистрации кривой прорыва была проверена независимым методом. Кривые проскока воспроизводились на одном патроне с точностью $\pm 5\%$, а на разных патронах, упакованных одним сорбентом $\pm 10\%$.

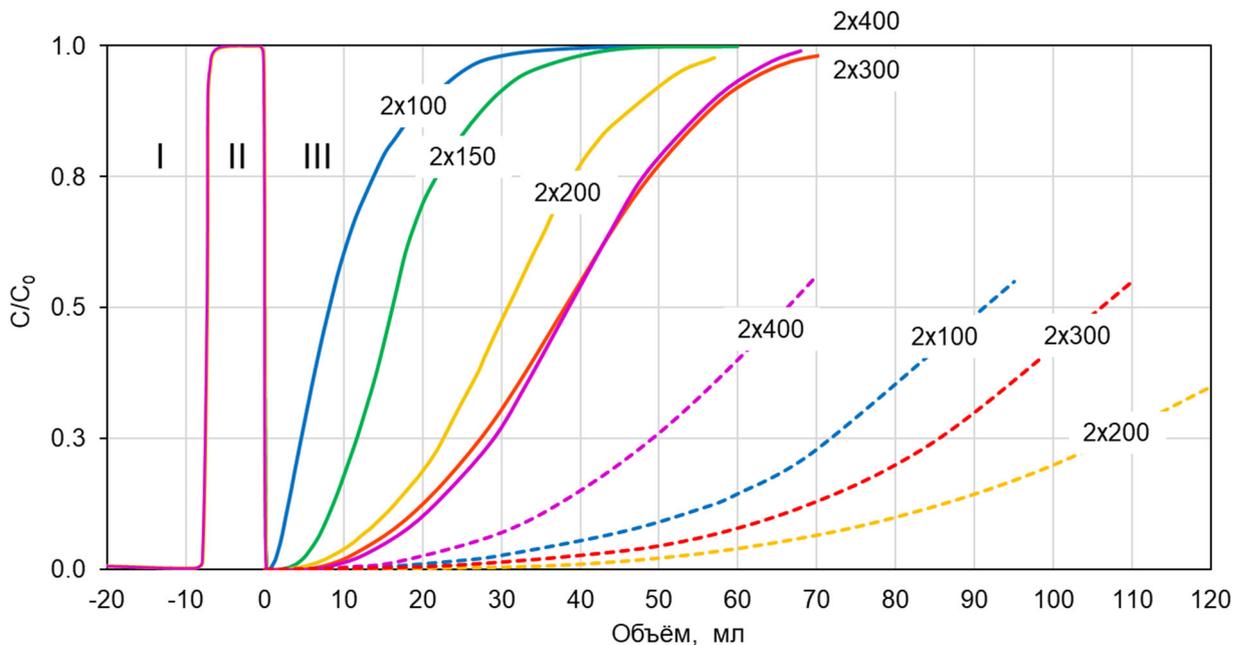


Рисунок 28. Кривые проскока 5×10^{-5} М ДГБК (сплошные линии) и 5×10^{-4} М ФПК (пунктирные линии) на патронах упакованных по 30 мг сорбентов. Зона I – уравновешивание патрона базовым раствором pH 4 без добавления кислот; зона II – раствор кислоты, подаваемый напрямую в детектор; зона III – подключение патрона.

Хорошо видно, что объёмы прорыва ДГБК и ФПК зависят от степени дополнительной сшивки сорбента, однако, как и в случае статического эксперимента, зависимости удерживания от степени сшивки различна для двух кислот. Объём проскока V_B гидрофильной ДГБК постепенно увеличивается от 1,6 до 12,6 мл при увеличении плотности сшивки сети ССП со 100 до 400% (Рисунок 28. и Таблица 14). Объём проскока ФПК в тех же условиях, возрастает с 54 до 78 мл при повышении степени сшивки со 100% до 200%, дальнейшее повышение степени сшивки до 400% приводит к падению объёма проскока до 43 мл.

Противоположные тенденции в поведении этих двух кислот можно объяснить, если учесть, что сорбционная ёмкость на микропористом полимере в первую очередь определяется объёмом пор, который меняется в ССП в зависимости от набухания, а во вторую очередь от силы взаимодействия сорбент-сорбат. Из разбавленного раствора полярной кислоты в патроне сорбировалось <10 мг/г 3,4-дигидроксibenзойной кислоты. Вероятно, что такая низкая величина сорбции не приводит к значительному набуханию сетки сорбента. Поэтому неудивительно, что удерживание ДГБК увеличивается симбатно объёму пор сорбента, который ранее был измерен по воде. Наглядно это ситуация представлена на Рисунке 15, на котором закономерность изменения объёма проскока наложена на закономерность изменения объёма пор сорбента. Аномально сильное удерживание ДГБК на сорбенте 2×400 вероятно связано со вторым фактором, определяющим сорбцию, а именно при увеличении степени сшивки увеличивается сила π - π взаимодействия с полярной ДГБК. Удерживание ФПК намного выше, и в этом случае сорбент может набухать, а его реальный объём пор будет находиться в диапазоне между начальным объёмом пор в воде и максимально возможным объёмом пор набухшего ССП, что соответствует величине весового набухания в толуоле.

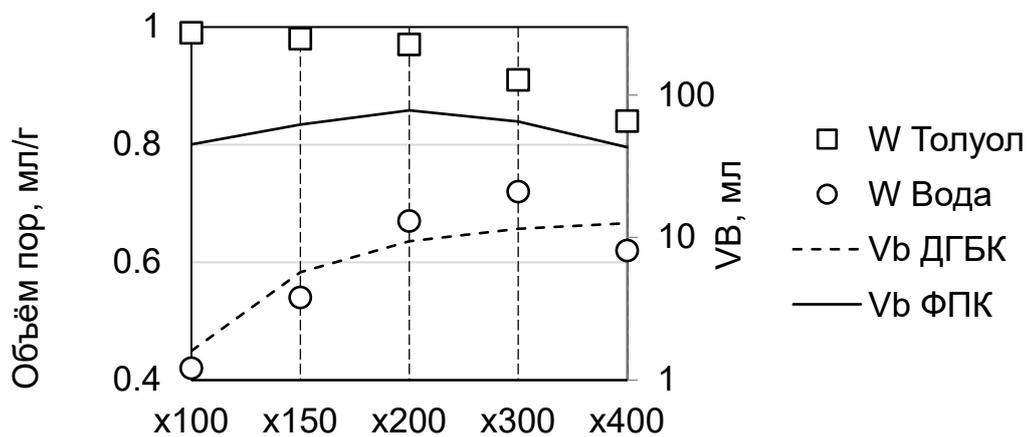


Рисунок 29. Сравнение зависимостей весового набухания (объёма пор) и логарифма объёма проскока от степени сшивки сорбента.

Стоит заметить, что как объём проскока, так и объём удерживания значительно меняется при изменении концентрации вещества. На Рисунке 30.

изображена зависимость объёма удерживания от концентрации ДГБК. В целом, эта зависимость является аналогом изотермы адсорбции в статических условиях. В билогарифмических координатах зависимость удерживания от концентрации линейна, что соответствует модели изотермы адсорбции Френдлиха которая также линейна в билогарифмических координатах [302]. Чем выше степень сшивки сорбента, тем быстрее увеличивается объём удерживания при снижении концентрации. Это соответствует тому, что при увеличении степени сшивки увеличивается крутизна изотермы сорбции в области низких концентраций, т.е. сила взаимодействия сорбента с ДГБК увеличивается в ряду увеличения степени сшивки.

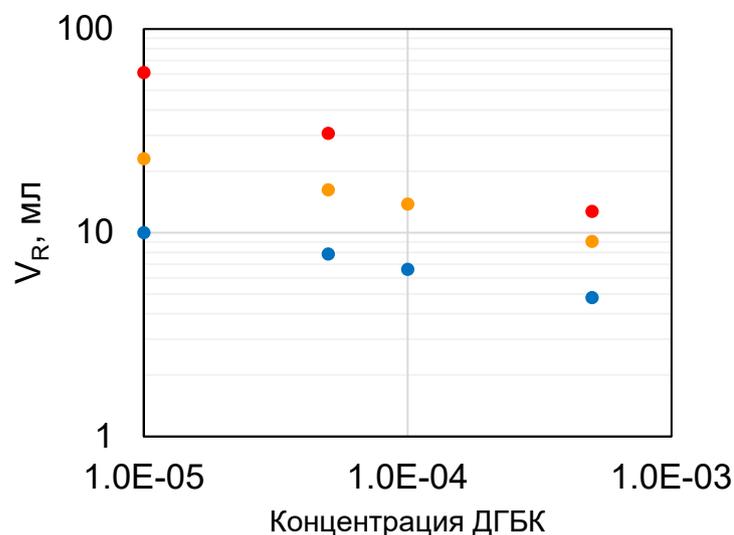


Рисунок 30. Зависимость объёма удерживания ($C/C_0=0.5$) ДГБК от концентрации кислоты в растворе.

Следующим этапом работы было изучение десорбции ФКК на собранных патронах. Десорбцию проводили метанолом, т.к. этот растворитель оказался оптимальным для разделения ФКК на хроматографической колонке С-18. Наиболее эффективным элюентом для ФКК оказался метанол с добавлением 2% концентрированного водного аммиака. Аммиак превращает нейтральные ФКК в более гидрофильные анионы, тогда как метанол нарушает их гидрофобные взаимодействия с полистиролом.

На Рисунке 31 показано содержание ДГБК и ФПК (процент от количества адсорбированных кислот) в последовательных 100 мкл фракциях сточного элюента. Как видно, первые 100 мкл подщелоченного метанола удаляет адсорбированные ДГБК и ФПК практически полностью. Интересно, что ДГБК легко удаляется с сорбентов 2×200 и 2×300, тогда как десорбция этой кислоты с других сорбентов менее эффективна. Для десорбции более гидрофобной ФПК требуется больший объём щелочного метанола. Сорбент 2×400 меньше всего набухает в метаноле, и обладает самой густой сеткой, вероятно поэтому десорбция ФПК затруднена с этого сорбента.

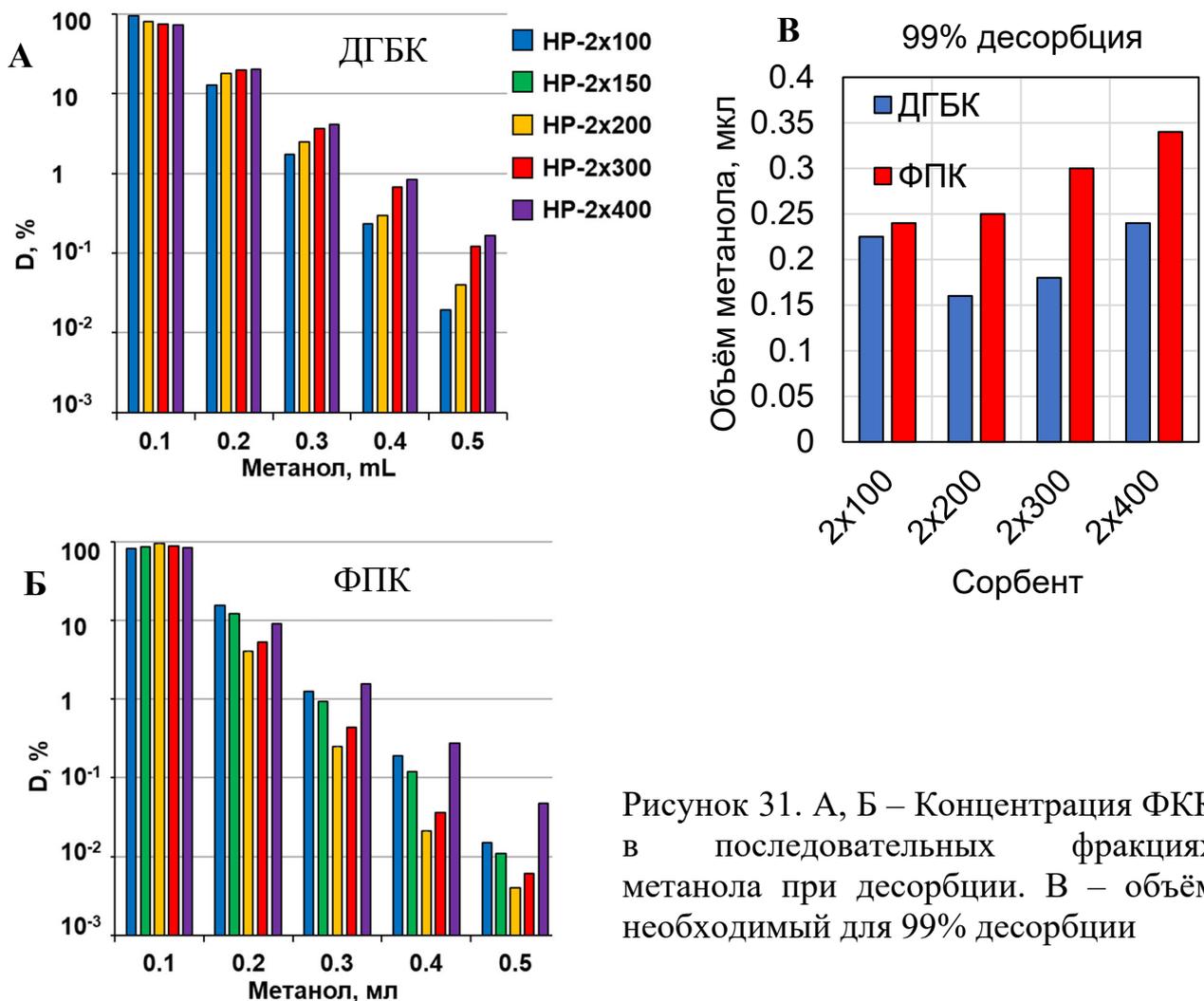


Рисунок 31. А, Б – Концентрация ФКК в последовательных фракциях метанола при десорбции. В – объём необходимый для 99% десорбции

На Рисунке 32 изображен результат аналогичного эксперимента проведённого для раствора альбумина на сорбенте 2×200. Альбумин не сорбируется, поэтому в первых 100 мкл воды концентрация альбумина в тысячу

раз меньше, чем в исходном растворе альбумина, 40 г/л. При промывке патрона 500 мкл воды, концентрация альбумина на выходе из патрона становится ниже LOD используемого нами спектрофотометрического метода. Мы считаем, что для промывки патрона от альбумина, и вероятно других белков, достаточно 500 мкл воды, тогда остаточная концентрация альбумина составляет <0.1 мг/л, что не мешает хроматографическому определению ФКК.

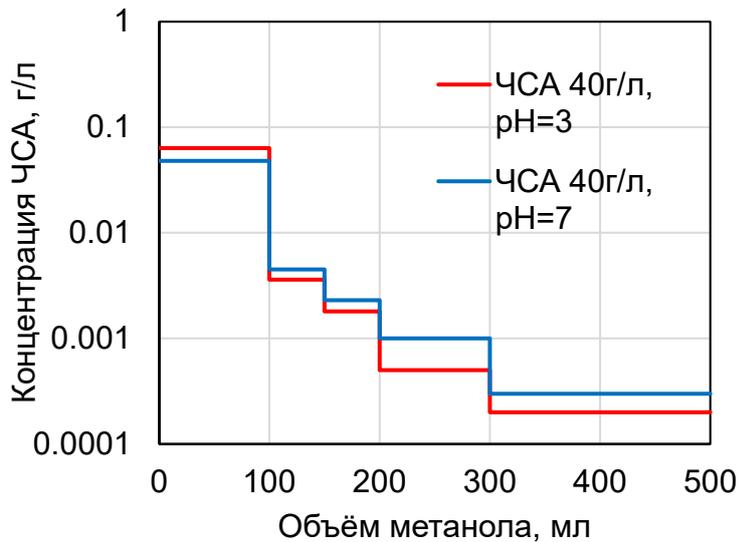


Рисунок 32. Концентрация вымываемого с патрона альбумина в последовательных фракциях воды.

В Таблице 14 суммированы результаты изучения ТФЭ ДГБК и ФПК в динамических условиях. По всей видимости, сорбент 2×200 представляет собой наиболее эффективный РАМ для концентрирования ФКК, поскольку он демонстрирует приемлемо большой объем прорыва гидрофильной ДГБК (9,4 мл) и приемлемо малый объем метанола необходимый для 99% десорбции гидрофобной ФПК ($V_D=250$ мкл). Таким образом, в данных условиях сорбент 2×200 потенциально позволяет концентрировать смесь ФКК в 38 раз. Последнее значение представляет собой соотношение объема прорыва ДГБК к объему метанола, требуемого для десорбции ФПК

Таблица 14. Сводная таблица результатов сорбционного и десорбционного эксперимента.

		2×100	2×150	2×200	2×300	2×400
ДГБК 5×10 ⁻⁵ М	W _{H2O} , МЛ/Г	0.35	0.41	0.49	0.53	0.48
	W _{PhH} , МЛ/Г	0.99	0.98	0.97	0.91	0.84
	V _{cart.} , МКЛ	69	71	75	80	75
	V _B , (V _B /V _{cart})	МЛ 1.6 (23)	5.7 (80)	9.4 (125)	11.5 (145)	12.6 (168)
	A _{max} , МГ/Г	2.52	5.47	8.36	10.1	11.1
	V _D , (V _B /V _D)	МКЛ 230 (7)	210 (27)	160 (59)	180 (64)	240 (53)
ФПК *	V _B , (V _B /V _{cart})	МЛ 45 (780)	62 (870)	78 (1000)	65 (750)	43(570)
ФПК 5×10 ⁻⁴ М	V _B , (V _B /V _{cart})	МЛ 31 (449)		55(733)	39(400)	20(276)
	V _D , (V _B /V _D)	МЛ/Г 240 (129)		250 (220)	300 (130)	340 (59)
	A _{max} , МГ/Г	229		331	267	166

* концентрация ФПК 5×10⁻⁵М

3.9 ВЭЖХ анализ раствора смеси фенилкарбоновых кислот

Перед тем как приступить к определению ФКК в крови, процедуру ТФЭ отработали на модельном растворе, содержащего альбумин в физиологической концентрации 40 г/л и 7 ФКК в концентрации 1×10⁻⁷М, что несколько ниже нормального уровня кислот в сыворотке. В предварительном эксперименте была проведена ТФЭ из раствора медицинского ЧСА 40 г/л без добавления ФКК. Хроматографический анализ показал, что метанольный экстракт не содержит ЧСА, но загрязнен многими низкомолекулярными примесями, часть из которых может является ФКК (Рисунок 33). Для точного измерения степени извлечения ФКК раствор ЧСА был очищен с помощью сорбента 2×200 перед приготовлением модельного раствора, содержащего ФКК.

Оптимальная процедура ТФЭ заключалась в следующем: к 10 мл модельного раствора ФКК 1×10⁻⁷М и ЧСА 40 г/л, добавляли 300 мкл уксусной кислоты, и пропускали через патрон с сорбентом 2×200 с помощью мэнифолда, поддерживая

примерную скорость потока 0.5 мл/мин. Затем патрон промывали 2×0.5 мл подкисленной уксусной кислотой воды (pH 4), подсушивали в токе воздуха в течении 5 минут, и десорбировали ФКК 250 мкл метанолом содержащего 2% концентрированного водного аммиака. Полученный экстракт разбавляли 250 мкл водного раствора трифторуксусной кислоты 2% об/об (таким образом состав анализируемого раствора соответствует составу элюента). В случае 100% экстракции, концентрирования ФКК в экстракте возрастёт в 20 раз относительно исходного раствора и должна составить 2×10^{-6} М. Поэтому в качестве раствора для получения эталонной хроматограммы был приготовлен раствор ФКК в элюенте с концентрацией 2×10^{-6} М.

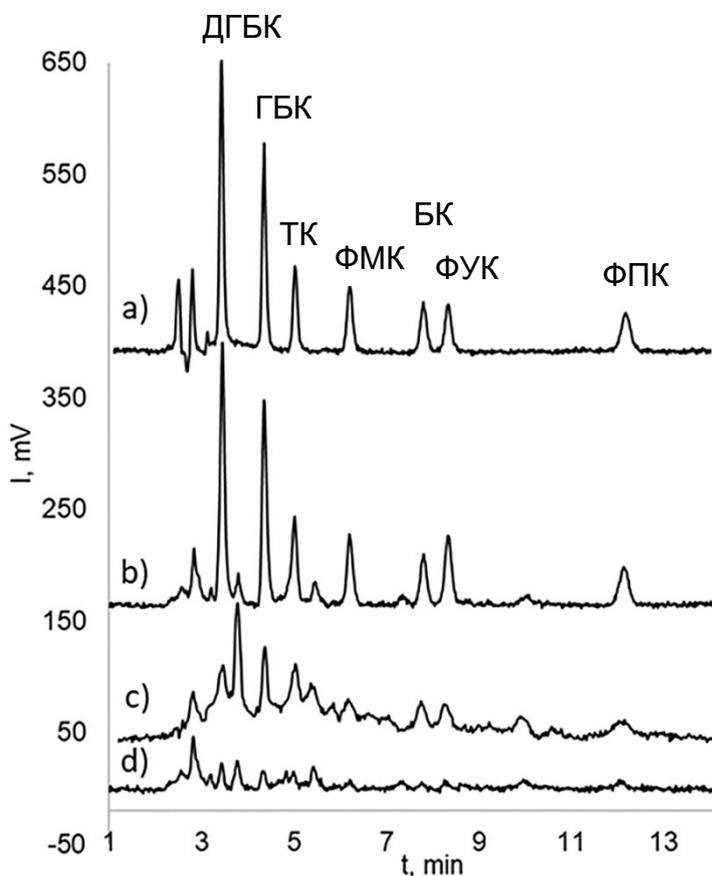


Рисунок 33. Хроматограммы полученные на колонке С-18 250×4 мм, в изократическом режиме, элюент MeOH : ACN : H₂O : ТФУ соответственно 50 : 5 : 45 : 0.001 об/об, скорость потока 0.7 мл/мин, детектор UV-VIS $\lambda=206$ нм. а) эталонным раствором ФКК 2×10^{-6} М; б) метанольный экстракт ФКК из модельного раствора ФКК на основе очищенного ЧСА; в) экстракт медицинского ЧСА, 40 г/л; д) экстракт очищенного ЧСА, 40 г/л.

Хроматограммы эталонного раствора и экстракта после ТФЭ модельного белкового раствора оказались практически идентичными. Отношение площади каждого пика хроматограммы экстракта и эталонной хроматограммы соответствует абсолютной степени извлечения ФКК из концентрированного раствора альбумина. Для сравнения был проведён аналогичный ТФЭ-ВЭЖХ

анализ водного раствора 10^{-7} М ФКК без добавления альбумина. В Таблица 15 приведены результаты анализа. Абсолютная степень извлечения всех тестируемых кислот близка к 100%, анализ воспроизводится с $SD < 5\%$. Формально определённое извлечение кислот из раствора альбумина несколько выше, чем из чистого водного раствора, причина в присутствии незначительного количества интерферирующих примесей в очищенном ЧСА.

Таблица 15. Степень извлечения ФКК из модельных растворов.

		10^{-7} М раствор ФКК	
		В воде	В ЧСА 40г/л
Кислоты	К'	Степень извлечения (SD), N=3	
ДГБК		93 (3)	94 (4)
ГБК		98 (4)	98 (3)
ТК		93 (2)	103 (4)
ФМК		96 (3)	101 (2)
БК		97 (2)	96 (3)
ФУК		98 (1)	105 (4)
ФПК		96 (2)	97 (3)

Важнейший вывод из проведенной выше серии экспериментов - синтезированный сорбент 2×200 представляет собой очень эффективную РАМ, которая исключает большие молекулы альбумина, но количественно сохраняет следы более мелких аналитов, как гидрофобных, так и гидрофильных. Дополнительно отметим, что этот тип РАМ может быть использоваться для эффективной очистки растворов отдельных белков от низкомолекулярных примесей.

3.10 Определение фенилкарбоновых кислот в крови человека

Предварительные эксперименты показали, что экстракты, полученные из сыворотки крови, содержат множество низкомолекулярных соединений, поэтому разделение ФКК и других компонентов на хроматографической фазе С-18 необходимо было использовать градиентное элюирование. Чтобы убедиться в том, что выбранные хроматографические пики действительно соответствуют ФКК, мы

использовали детектор с диодной матрицей, а также сравнили УФ-спектры определяемых соединений с УФ-спектрами пиков ФКК на эталонной хроматограмме. На Рисунке 34А представлена хроматограмма эталонного раствора ФКК с концентрацией 10^{-5} М, а на Рисунке 34D хроматограмма прямой инъекции разбавленной в 20 раз сыворотки крови донора. Образец сыворотки содержит множество компонентов, интерферирующих с ФКК, что делает невозможным прямое определение ФКК в нативной сыворотке. Поэтому мы разработали специальную процедуру ТФЭ-ВЭЖХ-ДМД определения ФКК в крови человека. Процедура включает следующие этапы:

- 1) Получение сыворотки. Кровь отбирали в вакуумную пробирку с активатором свёртывания и гелем. Сыворотку отделяли по стандартному протоколу [303].
- 2) К 2 мл сыворотки добавляли 2 мл воды для уменьшения вязкости раствора.
- 3) К полученным 4 мл раствора добавляли 50 мкл трифторуксусной кислоты для перевода в молекулярную форму ФКК.
- 4) К полученному раствору добавляли 100 мкл чистой воды или 100 мкл раствора смеси ФКК, для последующей калибровки методом добавок.
- 5) Пробу перколировали через патрон со скоростью ~ 0.5 мл/мин
- 6) Патрон промывали подкисленной водой (2×0.5 мл, pH 3).
- 7) Сорбент подсушивали в токе воздуха в течении 5 минут, для полного удаления межгранульной жидкости.
- 8) ФКК десорбировали с сорбента 250 мкл метанола с 2%v концентрированного аммиака.
- 9) Метанольный экстракт упаривали при 50°C .
- 10) Осадок перерастворили в 100 мкл воды содержащей 0.1%v трифторуксусной кислоты.

Пробу вводили в 20 мкл инжектор хроматографа. Разделение вели на колонке С-18 250x4 мм, в градиентном режиме с 10% до 70% АСN за 10 минут. Кислоты детектировали на $\lambda = 206$ и 254 нм. На Рисунок 34В изображена хроматограмма экстракта сыворотки крови, полученного с помощью описанной процедуры ТФЭ на миниатюрном

патроне с сорбентом 2×200. Судя по хроматограмме, полученный экстракт очищен не только от альбумина и других белков, но и от большинства мешающих компонентов. При этом в экстракте четко видны пики, время удерживания которых, соответствует времени удерживания ФКК в эталонном растворе.

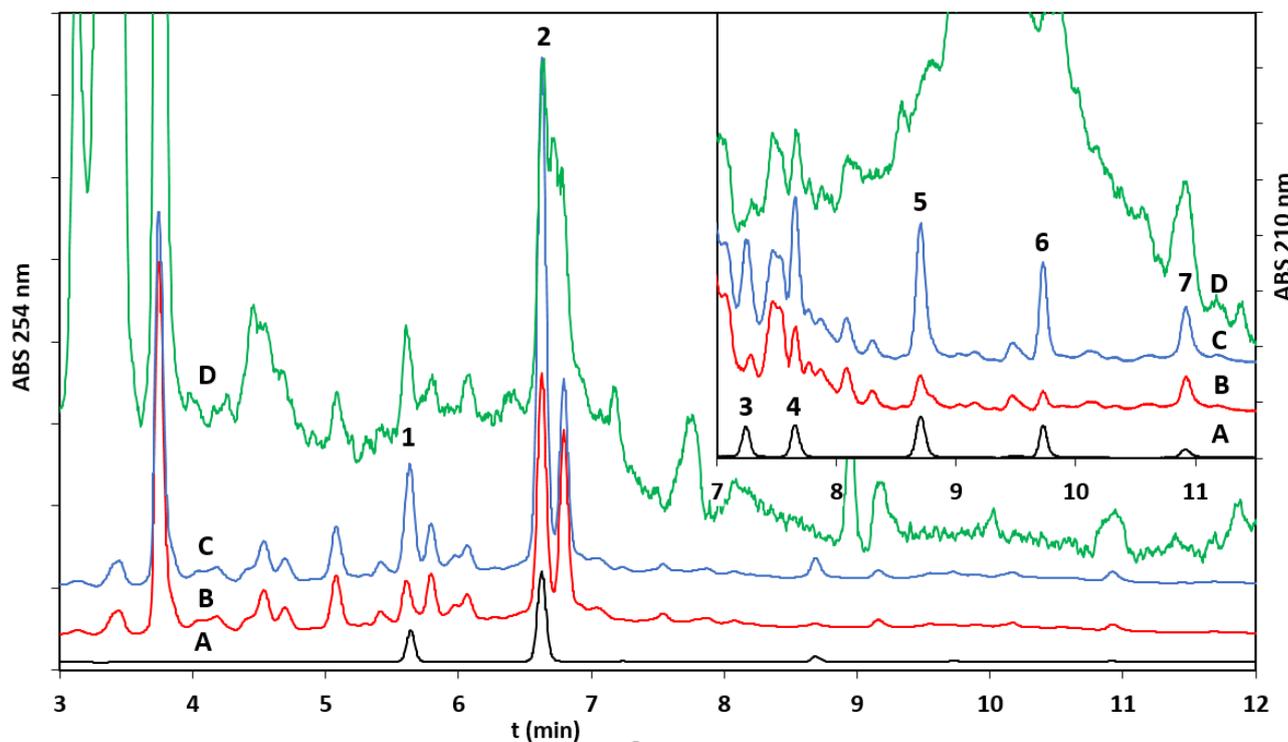


Рисунок 34. Хроматограммы полученные на колонке C-18 250x4 мм, в градиентном режиме, элюент А (H₂O : ТФУ 1 : 0.001 об./об.), В (АСN) 10→70% за 10 минут, скорость потока 1 мл/мин. А) эталонный раствор ФКК с концентрацией 1×10^{-5} М; В) метанольный экстракт сыворотки крови С) метанольный экстракт сыворотки крови с добавкой ФКК до концентрации 5×10^{-6} М; D) прямая инъекция разбавленной сыворотки крови. 1-ДГБК, 2-ГБК, 3-ТК, 4-ФМК, 5-БК, 6-ФУК, 7-ФПК.

На Рисунке 35 приведены УФ спектры, полученные в вершинах хроматографических пиков эталонного раствора ФКК (красная линия) и экстракта сыворотки крови (синяя линия). В целом УФ спектры совпадают, значит наблюдаемые пики на хроматограмме экстракта сыворотки крови, действительно являются пиками искомым ФКК.

Для оценки концентрации ФКК в сыворотке крови и степени их извлечения мы провели аналогичный анализ нескольких образцов сыворотки крови, в которые были внесены ФКК для увеличения их концентрации в пробу сыворотки на 5×10^{-7}

и 2×10^{-6} М. Такие концентрации охватывают всю шкалу медицински значимых уровней ФКК.

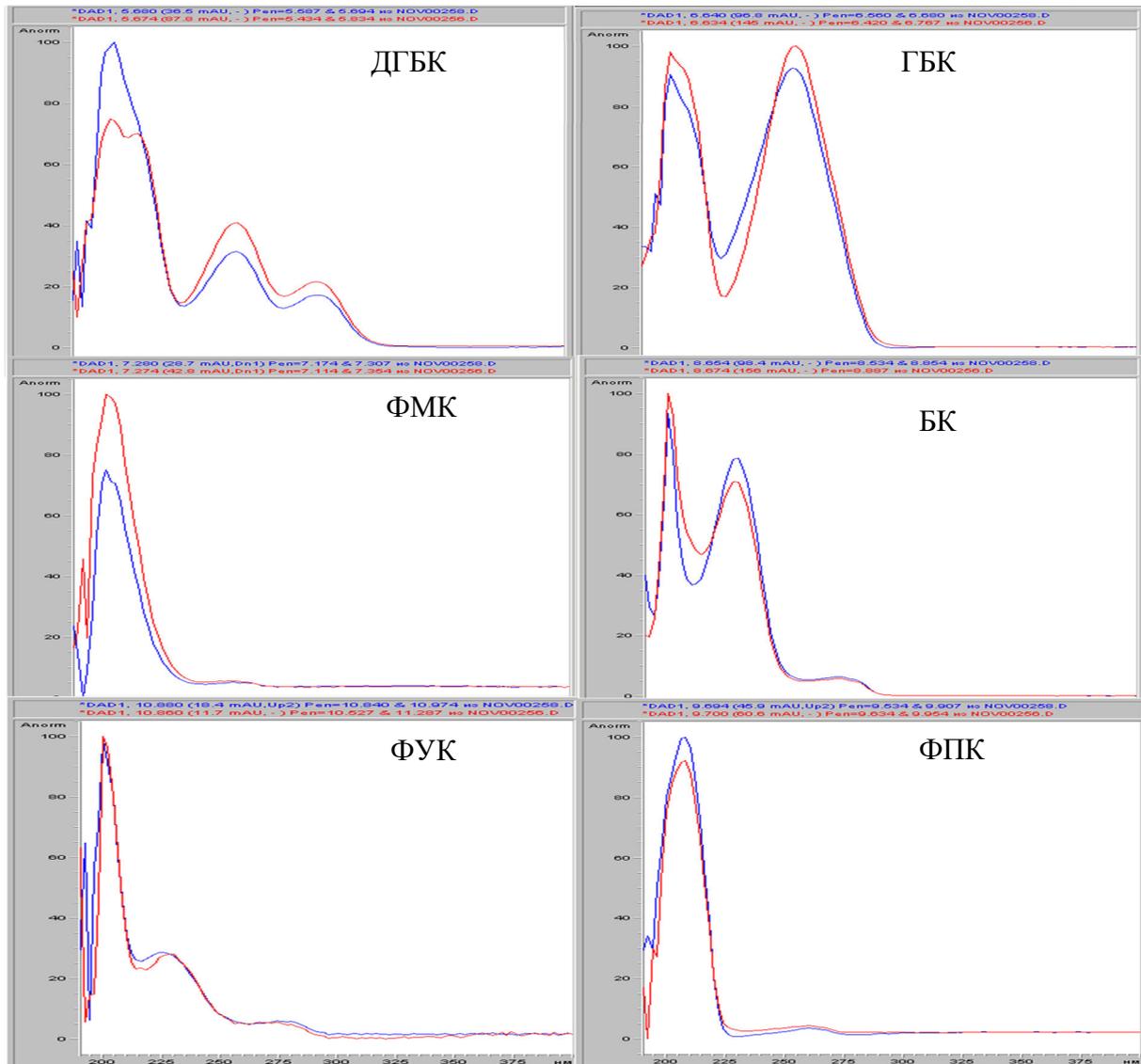


Рисунок 35. Сравнение УФ спектров, записанных в вершинах хроматографических пиков эталонного раствора ФКК (красная линия) и экстракта сыворотки крови (синяя линия) с одинаковым временем удерживания.

Концентрацию кислот в экстракте определили по площади хроматографических пиков, используя предварительно полученную калибровочную кривую с помощью прямых инъекций чистых растворов ФКК в хроматограф. На Рисунке 36 построен график результатов измерений в координатах введено-найдено, измерения хорошо ложатся на прямую линию ($R^2 > 0.99$). Наклон линейной регрессии соответствует степени извлечения, а пересечение с осью X показывает концентрацию ФКК в исходной сыворотке. С

помощью полученных данных также рассчитали предел детектирования (LOD) и предел количественного определения (LOQ) для предложенной аналитической процедуры. Все данные сведены в Таблица 16.

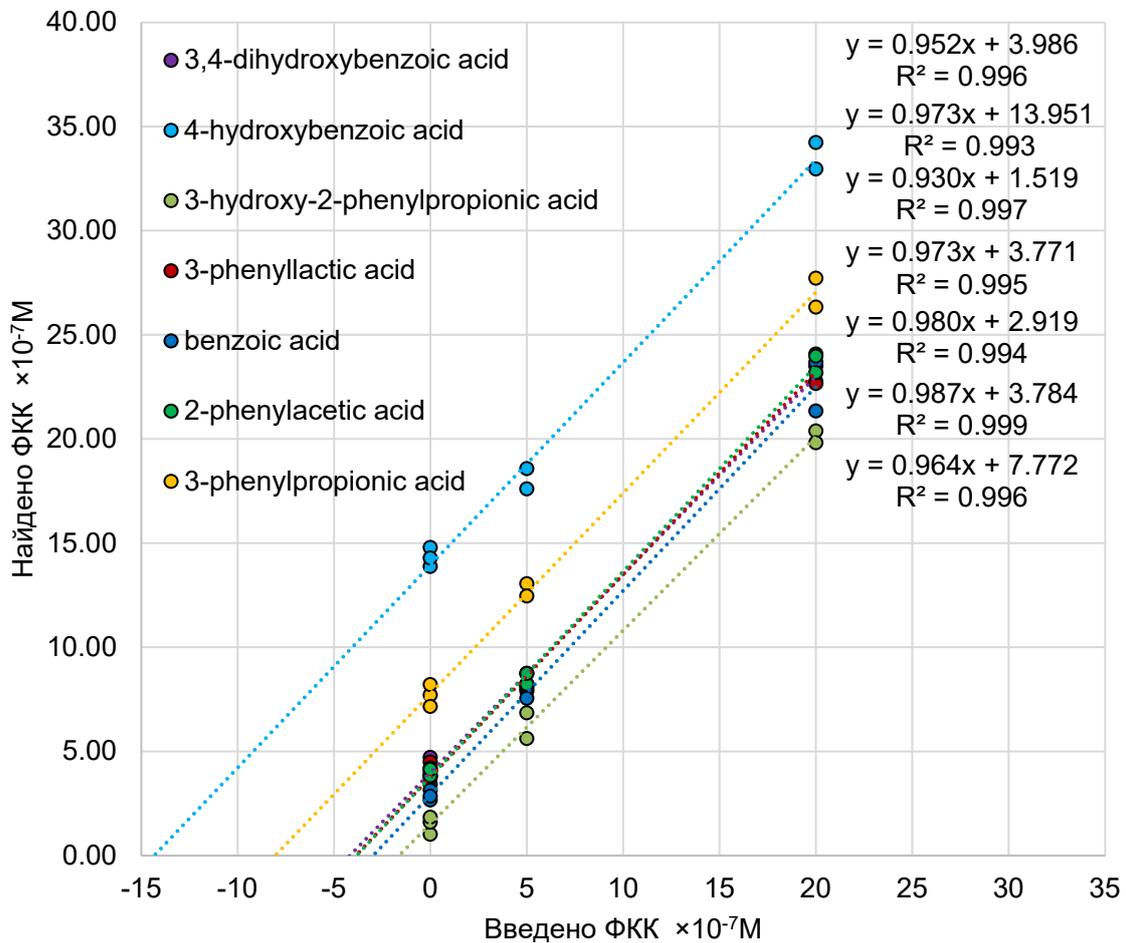


Рисунок 36. График введено-найдено для концентрации ФКК определяемой методом ТФЭ-ВЭЖХ-ДМД в сыворотке крови.

Таблица 16. Основные параметры разработанной аналитической процедуры.

ФКК	Добавлено ФКК, $\times 10^{-7}M$			R, % (SE)	LOD, $\times 10^{-7}M$	LOQ, $\times 10^{-7}M$
	0, (N=3)	5, (N=2)	20, (N=2)			
ДГБК	4.2 (0.5)	8.3 (0.6)	23.1 (0.5)	95 (3)	1.9	6.2
ГБК	14.3 (0.5)	18.1 (0.7)	33.6 (0.9)	97 (4)	2.5	8.5
ТК	1.5 (0.4)	6.2 (0.9)	20.1 (0.4)	93 (2)	1.7	5.9
ФМК	4.0 (0.6)	8.1 (0.1)	23.4 (1.1)	97 (3)	2.2.	7.4
БК	2.9 (0.2)	7.9 (0.5)	22.5 (1.6)	98 (5)	2.4	8.1
ФУК	3.9 (0.2)	8.5 (0.4)	23.6 (0.6)	99 (2)	1.2	3.8
ФПК	7.7 (0.6)	12.8 (0.4)	27.0 (1.0)	96 (3)	1.9	6.3

Разработанная в этой работе процедура ТФЭ ФКК из сыворотки крови с помощью миниатюрного патрона заполненного сверхсшитым полистирольным гидрофобным сорбентом 2×200 обеспечивает абсолютную степень извлечения > 93% для всех кислот. Кроме того, осуществленный анализ ТФЭ-ВЭЖХ-ДМД позволил полуколичественно определить концентрации ФКК в крови здорового донора, коим явился автор работы. Найденные концентрации кислот (Таблица 17) хорошо соотносятся с результатами независимых измерений методом газовой хроматографии в ФКК в сыворотке крови здоровых людей, которые приведены в базе данных человеческого метаболома (HMDB).

Таблица 17. Сравнение концентраций ФКК $\times 10^{-7}M$ в сыворотке крови здорового донора, найденные в этой работе и приведённые в базе данных человеческого метаболома (HMDB) [302].

	ДГБК	ГБК	ТК	ФМК	БК	ФУК	ФПК
HMDB	2.3	25	следы	6.3	2.7	5.3	5.5
Эта работа	3.3-4.9	12-15	<LOD	2.8-5.0	2.3-3.3	3.4-4.3	6.3-8.5

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, весь накопленный в литературе массив данных позволил нам предположить, что многие образцы сверхсшитого полистирола обладают комплексом свойств характерных для материалов ограниченного доступа. Такие материалы необходимы для эффективного анализа биологических жидкостей, в частности для определения концентрации маркёров сепсиса – фенилкарбоновых кислот. С целью создания сорбентов для экстракции ФКК были подобраны специальные условия суспензионной полимеризации стирола и ДВБ, позволяющие без специального рассеивания получить достаточно узкую фракцию частиц с $d=30-70$ мкм. Были подобраны реагенты и условия реакции получения сверхсшитого полистирола, приводящие к пористому продукту с низкой степенью разрушения гранул, большой удельной поверхностью, большим объёмом пор и хорошей способностью сорбировать разнообразные органические соединения, такие как некоторые витамины, фармакологические препараты и конечно, фенилкарбоновые кислоты.

Наиболее перспективные сорбенты были упакованы в миниатюрные экстракционные патроны по 30 мг и были протестированы в условиях сорбции и десорбции ФКК в динамическом режиме. Небольшой патрон, упакованный оптимальным сорбентом, в сочетании с ВЭЖХ, позволяет определить семь ФКК в сыворотке крови здорового донора, и их повышенный уровень в клинически важном диапазоне концентраций.

Весь комплекс проведённых исследований приводит нас к выводу, что синтезированные сверхсшитые полистирольные сорбенты могут быть с успехом использованы для анализа и других физиологически активных веществ в биологических жидкостях. Дальнейшим развитием этой работы может быть расширение аналитических применений полученных сорбентов. Кроме того, сорбенты с малым содержанием ДВБ и сорбирующие малые белки могут найти применение в протеомике, где концентрирование небольших белков остаётся трудной задачей.

Выводы:

- Впервые разработан сверхсшитый гидрофобный полистирольный сорбент ограниченного доступа (Restricted access material) для твёрдофазной экстракции из сыворотки крови фенолкарбоновых кислот - маркёров сепсиса. Новый сорбент получен сшиванием гелевого сополимера, содержащего 2% дивинилбензола, монохлордиметиловым эфиром на 200%.
- Определены условия суспензионной полимеризация стирола и дивинилбензола с получением гранул диаметром 70 ± 10 мкм и низкой полидисперсностью. Подобраны условия последующей сшивки сополимера монохлордиметиловым эфиром, катализируемой FeCl_3 , с получением нанопористого сверхсшитого полистирольного сорбента с высокой осмотической прочностью и удельной поверхностью >1000 м²/г.
- Показано, что уменьшение доли дивинилбензола в исходном сополимере приводит к увеличению размера пор и росту сорбции молекул с молекулярной массой ~ 1500 г/моль и более. Впервые показано, что при содержании 0.5% дивинилбензола в исходном сополимере сверхсшитый продукт эффективно сорбирует Цитохром С ($M=13$ кДа, $d \sim 35$ Å), но не сывороточный альбумин (65 кДа, $d \sim 80$ Å). При повышении содержания дивинилбензола до 2% сорбент не поглощает Цитохром С, но сорбирует низкомолекулярные соединения.
- Установлено, что с ростом степени дополнительной сшивки от 50% до 300% сополимера с 2% дивинилбензола, растут такие параметры сорбента как: удельная поверхность от 250 до 1020 м²/г, объём пор от 0.15 до 0.53 см³/г, набухание в воде от 0.18 до 0.73 см³/г. При этом набухание в толуоле меняется незначительно в интервале 0.93 - 0.91 см³/г.
- Разработан протокол количественного определения маркёров сепсиса в сыворотке крови в клинически важном диапазоне концентраций 10^{-7} - 10^{-5} М.

5. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ABS – величина оптического поглощения
- ACN – ацетонитрил
- c-SPE – картриджная твёрдофазная экстракция
- d – диаметр
- d-SPE – дисперсионная твёрдофазная экстракция
- IUPAC – Международный союз теоретической и прикладной химии
- LOD – предел детектирования
- LOQ – предел количественного определения
- MIP – молекулярно-отпечатанные полимеры
- MRAM – магнитные материалы ограниченного доступа
- MSPE – магнитная твёрдофазная экстракция
- NLDFT – теория не-локального функционала плотности (*Non-Local Density Functional Theory*)
- p/p_0 – давление относительно давления насыщенных паров
- R – степень извлечения (экстракции) (*recovery*)
- RAM – материалы ограниченного доступа (*Restricted access materials*)
- RAMIP – молекулярно-отпечатанные полимеры ограниченного доступа
- SPME – твёрдо-фазная микроэкстракция
- V – объём
- W – объём пор
- X – степень сшивки
- БЭТ – метод Brunauer–Emmett–Teller
- ВБХ – винилбензилхлорид
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГБК – 4-гидроксibenзойная кислота
- ГХ – газовая хроматография
- ДВБ – дивинилбензол
- ДГБК – 3,4-дигидроксibenзойная кислота

- ДМД – диодно-матричный детектор
ДММ – диметоксиметан
ДХЭ – дихлорметан
ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
ИК – инфракрасный
МС – масс-спектрометрия
МХДЭ – монохлордиметиловый эфир
НПВО – нарушенное полное отражение
ПС – полистирол
С – концентрация вещества
С-18 – октадецил силикагель
ССП – сверхсшитый полистирол
Ст – стирол
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ТК – 3-гидрокси-2-фенилпропионовая кислота
ТОЗМ – теория объёмного заполнения микропор
тфрис – трис-(гидроксиметил)аминометан
ТФУ – трифторуксусная кислота
ТФЭ – твёрдофазная экстракция
УФ – ультрафиолет
Ф-К – реакция Фриделя-Крафтца
ФКК – фенилкарбоновые кислоты
ФМК – 2-гидрокси-3-фенилпропионовая кислота
ФПК – 3-фенилпропионовая кислота
ФУК – фенилуксусная кислота
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davankov V.A. Hypercrosslinked polymeric networks and adsorbing materials : synthesis, properties, structure, and applications / V.A. Davankov, M.P. Tsyurupa. – Elsevier, 2011. – 648 с.
2. Turck C.W. Biomarkers for Psychiatric Disorders / C.W. Turck; ред. С. Turck. – Boston, MA: Springer US, 2009. – 129-162 с.
3. Russel J.A. The current management of septic shock. / J.A. Russel // *Minerva medica*. – 2008. – Т. 99. – № 5. – С. 431-58.
4. Involvement of Aromatic Metabolites in the Pathogenesis of Septic Shock / N. V. Beloborodova [и др.] // *SHOCK*. – 2018. – Т. 50. – № 3. – С. 273-279.
5. Wishart D.S. Advances in metabolite identification / D.S. Wishart // *Bioanalysis*. – 2011. – Т. 3. – № 15. – С. 1769-1782.
6. List of human blood components [Электронный ресурс]. – URL: https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_human_blood_components (дата обращения: 28.11.2019).
7. Айзман Р.И. Физиология человека / Р.И. Айзман, Н.П. Абаскалова, Н.С. Шульенина. – 2015. – 432 с.
8. Reference range and short- and long-term biological variation of interleukin (IL)-6, IL-17A and tissue necrosis factor-alpha using high sensitivity assays / J. Todd [и др.] // *Cytokine*. – 2013. – Т. 64. – № 3. – С. 660-665.
9. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018 / D.S. Wishart [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Т. 46. – № D1. – С. D608-D617.
10. Drouin N. Sample preparation for polar metabolites in bioanalysis / N. Drouin, S. Rudaz, J. Schappler // *The Analyst*. – 2018. – Т. 143. – № 1. – С. 16-20.
11. Kuehnbaum N.L. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era / N.L. Kuehnbaum, P. Britz-McKibbin // *Chemical Reviews*. – 2013. – Т. 113. – № 4. – С. 2437-2468.
12. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review / H.D. de Faria [и др.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2017. – Т. 959. – С. 43-65.
13. Metabolic profiling of serum samples by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock / B. Mickiewicz [и др.] // *Critical Care Medicine*. – 2014. – Т. 42. – № 5. – С. 1140-1149.
14. Systems level studies of mammalian metabolomes: The roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy / W.B. Dunn [и др.] // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Т. 40. – № 1. – С. 387-426.
15. Metabolomic investigation of human diseases biomarkers by CE and LC coupled to MS / A.Z. Buzatto [и др.] // *Electrophoresis*. – 2014. – Т. 35. – № 9. – С. 1285-1307.
16. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods / P.L. Kole [и др.] // *Biomedical Chromatography*. – 2011. – Т. 25. – № 1. – С. 199-217.

17. Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: Practical approaches to their elimination / J. Schuhmacher [и др.] // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2003. – Т. 17. – № 17. – С. 1950-1957.
18. Hagestam I.Helene. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography / I.Helene. Hagestam, T.C. Pinkerton // *Analytical Chemistry*. – 1985. – Т. 57. – № 8. – С. 1757-1763.
19. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography / N.M. Cassiano [и др.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2006. – Т. 384. – № 7-8. – С. 1462-1469.
20. Soltani S. Biological sample preparation: attempts on productivity increasing in bioanalysis / S. Soltani, A. Jouyban // *Bioanalysis*. – 2014. – Т. 6. – № 12. – С. 1691-1710.
21. Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report) / C. Poole [и др.]. – 2016. – Т. 88. – № 7. – С. 649-687.
22. Ellison S.L.R. Causes of error in analytical chemistry: results of a web-based survey of proficiency testing participants / S.L.R. Ellison, W.A. Hardcastle // *Accreditation and Quality Assurance*. – 2012. – Т. 17. – № 4. – С. 453-464.
23. Janák K. Determination of polychlorinated biphenyls in human blood by solid-phase extraction including on-column lipid decomposition / K. Janák, E. Jensen, G. Becher // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 1999. – Т. 734. – № 2. – С. 219-227.
24. The comparison of plasma deproteinization methods for the detection of low-molecular-weight metabolites by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy / C.A. Daykin [и др.] // *Analytical Biochemistry*. – 2002. – Т. 304. – № 2. – С. 220-230.
25. Burgess R.R. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. Т. 463 / R.R. Burgess. – 1. – Elsevier Inc., 2009. – 331-342 с.
26. Souverain S. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS / S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2004. – Т. 35. – № 4. – С. 913-920.
27. Hamidi S. Solid Phase Microextraction Techniques in Determination of Biomarkers / S. Hamidi, N. Alipour-Ghorbani, A. Hamidi // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2018. – Т. 48. – № 4. – С. 239-251.
28. Vinayavekhin N. Untargeted Metabolomics / N. Vinayavekhin, A. Saghatelian // *Current Protocols in Molecular Biology*. – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. – С. 1-24.
29. Microextraction Techniques in LC-MS Bioanalysis / M. Rodrigues [и др.] // *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. – Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2019. – С. 98-116.
30. Thurman E.M. Solid-Phase Extraction. Principles and Practice / E.M. Thurman, M.S. Mills; ред. J.D. Winefordner. – John Wiley & Sons, Inc., 1998. – 344 с.
31. Сычев К.С. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и твёрдофазной экстракции / К.С. Сычев. – Москва, 2006. – 167 с.

32. Макаревич Н.А. Теоретические Основы Адсорбции / Н.А. Макаревич, Н.И. Богданович. – Архангельск: САФУ, 2015. – 326 с.
33. Цизан Г.И. Сорбционное концентрирование микрокомпонентов в динамических условиях / Г.И. Цизан, М.А. Статкус. – Москва: Ленад, 2016. – 480 с.
34. Лейкин Ю.А. Физико-химические основы синтеза полимерных сорбентов : Учебник для высшей школы / Ю.А. Лейкин. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 413 с.
35. Карнаухов А.П. Адсорбция. Текстура дисперстных и пористых материалов / Карнаухов А.П. – Новосибирск: Наука, 1998. – 469 с.
36. Burns D.T. Use of the terms «recovery» and «apparent recovery» in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002) / D.T. Burns, K. Danzer, A. Townshend // *Pure and Applied Chemistry*. – 2003. – Т. 74. – № 11. – С. 2201-2205.
37. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food. EUR 28099 EN / T. Wenzl [и др.] // *European Union Reference Laboratory*. – 2016. – С. 52.
38. Xu Z. Mathematically modeling fixed-bed adsorption in aqueous systems / Z. Xu, J.G. Cai, B.C. Pan // *Journal of Zhejiang University: Science A*. – 2013. – Т. 14. – № 3. – С. 155-176.
39. Kataoka H. Analytical Methods and its pharmaceutical and biomedical applications / H. Kataoka, A. Ishizaki, K. Saito // *Analytical Methods*. – 2016. – Т. 00. – С. 1-16.
40. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases / E. Boyaci [и др.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – Т. 873. – С. 14-30.
41. High-throughput analysis using non-depletive SPME: Challenges and applications to the determination of free and total concentrations in small sample volumes / E. Boyaci [и др.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Т. 8. – № 1. – С. 1-10.
42. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis / É.A. Souza-Silva [и др.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2015. – Т. 71. – С. 224-235.
43. Souza-Silva É.A. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis / É.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2015. – Т. 71. – С. 236-248.
44. Дутов А.А. Биомедицинская хроматография / А.А. Дутов. – ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 312 с.
45. Microporous polymer based on the new compound “bi-(4-vinyl phenylquinoline) amide” for enrichment and quantitative determination of lamotrigine in rat and human serum / M. Guo [и др.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2019. – Т. 411. – № 15. – С. 3353-3360.
46. Clean-up, detection and determination of salbutamol in human urine and serum / M.I. Saleh [и др.] // *The Analyst*. – 2000. – Т. 125. – № 9. – С. 1569-1572.

47. Nano-MoO₃ for highly selective enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in in-tube solid-phase microextraction / S. Хан [и др.] // *Journal of Separation Science*. – 2019. – Т. 42. – № 21. – С. 3363-3371.
48. Atapattu S.N. Solid Phase Analytical Derivatization / S.N. Atapattu, J.M. Rosenfeld // *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. – Elsevier, 2018. – С. 1-7.
49. Souverain S. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: An attractive approach for biological fluids analysis / S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey // *Journal of Chromatography B*. – 2004. – Т. 801. – № 2. – С. 141-156.
50. Cook S.E. Characterization of internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography / S.E. Cook, T.C. Pinkerton // *Journal of Chromatography A*. – 1986. – Т. 368. – № С. – С. 233-248.
51. Haginaka J. Restricted-Access Media: Solid-Phase Extraction / J. Haginaka // *Encyclopedia of Separation Science*. – 2000. – № 1962. – С. 4087-4091.
52. Use of molecular imprinted polymers for the separation and preconcentration of organic compounds / S.G. Dmitrienko [и др.] // *Zhurnal Analiticheskoy Khimii*. – 2004. – Т. 59. – № 9. – С. 902-912.
53. Preparation of a Novel Restricted Access Material Combined to Core-Shell Magnetic Molecularly Imprinted Polymers for Determination of Dimethyl phthalate in Soils / H. Zuo [и др.] // *Soil and Sediment Contamination*. – 2019. – Т. 28. – № 6. – С. 529-546.
54. Synthesis of molecular imprinted polymers for selective extraction of domperidone from human serum using high performance liquid chromatography with fluorescence detection / S. Salehi [и др.] // *Journal of Chromatography B*. – 2016. – Т. 1027. – С. 165-173.
55. Restricted access molecularly imprinted polymers obtained by bovine serum albumin and/or hydrophilic monomers' external layers: A comparison related to physical and chemical properties / M.G. Santos [и др.] // *Analyst*. – 2015. – Т. 140. – № 22. – С. 7768-7775.
56. Restricted access magnetic imprinted microspheres for directly selective extraction of tetracycline veterinary drugs from complex samples / Y. Zhou [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2020. – Т. 1613. – С. 460684.
57. Рогожин С.В. Патент СССР № 299165 / С.В. Рогожин, В.А. Даванков, М.П. Цюрупа.
58. Tsyurupa M.P. Hypercrosslinked polymers: basic principle of preparing the new class of polymeric materials / M.P. Tsyurupa, V.A. Davankov // *Reactive and Functional Polymers*. – 2002. – Т. 53. – № 2-3. – С. 193-203.
59. Huang J. Hypercrosslinked Polymers: A Review / J. Huang, S.R. Turner // *Polymer Reviews*. – 2018. – Т. 58. – № 1. – С. 1-41.
60. Hypercrosslinked Polycondensation Networks: Copolymers of p-Xylylene Dichloride / Z.K. Blinnikova [и др.] // *Polymer Science, Series B*. – 2018. – Т. 60. – № 1. – С. 91-98.

61. Hydrogen storage in microporous hypercrosslinked organic polymer networks / C.D. Wood [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2007. – Т. 19. – № 8. – С. 2034-2048.
62. Microporous organic polymers synthesized by self-condensation of aromatic hydroxymethyl monomers / Y. Luo [и др.] // *Polymer Chemistry*. – 2013. – Т. 4. – № 4. – С. 1126-1131.
63. Tan L. Hypercrosslinked porous polymer materials: Design, synthesis, and applications / L. Tan, B. Tan // *Chemical Society Reviews*. – 2017. – Т. 46. – № 11. – С. 3322-3356.
64. A New Strategy to Microporous Polymers: Knitting Rigid Aromatic Building Blocks by External Cross-Linker / B. Li [и др.] // *Macromolecules*. – 2011. – Т. 44. – № 8. – С. 2410-2414.
65. One-pot synthesis of triptycene-based porous organic frameworks with tailored micropore environments for highly efficient and selective amine adsorption / H. Wang [и др.] // *Polymer Journal*. – 2016. – Т. 48. – № 7. – С. 787-792.
66. Knitting hypercrosslinked conjugated microporous polymers with external crosslinker / L. Tan [и др.] // *Polymer*. – 2015. – Т. 70. – С. 336-342.
67. Highly dispersed pd catalyst locked in knitting aryl network polymers for suzuki-miyaura coupling reactions of aryl chlorides in aqueous media / B. Li [и др.] // *Advanced Materials*. – 2012. – Т. 24. – № 25. – С. 3390-3395.
68. A magnetic knitting aromatic polymer as a new sorbent for use in solid-phase extraction of organics / T. Gao [и др.] // *Microchimica Acta*. – 2018. – Т. 185. – № 12. – С. 554.
69. Ruthenium coordinated with triphenylphosphine-hyper-crosslinked polymer: An efficient catalyst for hydrogen evolution reaction and hydrolysis of ammonia borane / C. Xu [et al.] // *Applied Surface Science*. – 2019. – Vol. 466. – Ruthenium coordinated with triphenylphosphine-hyper-crosslinked polymer. – P. 193-201.
70. Use of a hypercrosslinked triphenylamine polymer as an efficient adsorbent for the enrichment of phenylurea herbicides / X. Liang [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2018. – Т. 1538. – С. 1-7.
71. A hyper-cross linked polymer as an adsorbent for the extraction of chlorophenols / Y. Wang [et al.] // *Microchimica Acta*. – 2018. – Vol. 185. – № 2. – P. 108.
72. Triphenylamine-based hypercrosslinked organic polymer as adsorbent for the extraction of phenylurea herbicides / J. Wu [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2017. – Т. 1520. – С. 48-57.
73. Controlling electric double-layer capacitance and pseudocapacitance in heteroatom-doped carbons derived from hypercrosslinked microporous polymers / J.-S.M. Lee [et al.] // *Nano Energy*. – 2018. – Vol. 46. – P. 277-289.
74. Superacid-promoted synthesis of highly porous hypercrosslinked polycarbazoles for efficient CO₂ capture / X. Zhu [и др.] // *Chemical Communications*. – 2017. – Т. 53. – № 54. – С. 7645-7648.
75. Swellable functional hypercrosslinked polymer networks for the uptake of chemical warfare agents / C. Wilson [и др.] // *Polymer Chemistry*. – 2017. – Т. 8. – № 12. – С. 1914-1922.

76. Knitting N-doped Hierarchical Porous Polymers to Stabilize Ultra-small Pd Nanoparticles for Solvent-Free Catalysis / Y. Sun [и др.] // *Chemistry - An Asian Journal*. – 2017. – Т. 12. – № 23. – С. 3039-3045.
77. Kundu S.K. Novel nitrogen and sulfur rich hyper-cross-linked microporous poly-triazine-thiophene copolymer for superior CO₂ capture / S.K. Kundu, A. Bhaumik // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2016. – Т. 4. – № 7. – С. 3697-3703.
78. Highly Dispersed DPPF Locked in Knitting Hyper-Crosslinked Polymers as Efficient and Recyclable Catalyst / C. Tang [et al.] // *ChemistrySelect*. – 2018. – Vol. 3. – № 21. – P. 5987-5992.
79. Ben T. Porous aromatic frameworks: Synthesis, structure and functions / T. Ben, S. Qiu // *CrystEngComm*. – 2013. – Т. 15. – № 1. – С. 17-26.
80. Yuan Y. Porous Aromatic Frameworks as a Platform for Multifunctional Applications / Y. Yuan, G. Zhu // *ACS Central Science*. – 2019. – Т. 5. – № 3. – С. 409-418.
81. Design, preparation and application of conjugated microporous polymers / Q. Liu [и др.] // *Polymer International*. – 2014. – Т. 63. – № 3. – С. 381-392.
82. Silacyclobutane-functionalized cyclosiloxanes as photoactive precursors for high thermal stability, low dielectric constant and low dielectric loss polymers / W. Yuan [et al.] // *Journal of Applied Polymer Science*. – Vol. n/a. – № n/a. – P. 51376.
83. Loy D.A. Bridged Polysilsesquioxanes. Highly Porous Hybrid Organic-Inorganic Materials / D.A. Loy, K.J. Shea // *Chemical Reviews*. – 1995. – Т. 95. – № 5. – С. 1431-1442.
84. Preparation of POSS-based organic-inorganic hybrid mesoporous materials networks through Schiff base chemistry / Y. Qin [и др.] // *European Polymer Journal*. – 2011. – Т. 47. – № 5. – С. 853-860.
85. POSS-based microporous polymers: Efficient Friedel-Crafts synthesis, CO₂ capture and separation properties / J. Liu [и др.] // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2017. – Т. 250. – С. 203-209.
86. The influence of the dianhydride precursor in hyper-cross-linked hybrid polyPOSS-imide networks / S. Neyertz [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – Vol. 18. – № 41. – P. 28688-28703.
87. Two organic phase suspension polymerization for novel hypercrosslinked resin bead by polycondensation of CMB / L. Zhao [и др.] // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – 2013. – Т. 21. – № 4. – С. 447-452.
88. One-pot synthesis of pyridine-based ionic hyper-cross-linked polymers with hierarchical pores for efficient CO₂ capture and catalytic conversion / C. Liu [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2022. – Vol. 427. – P. 131633.
89. Pavlova L.A. The first representatives of hypercrosslinked hydrophilic networks: Alkylation and polymerization of 4-vinylpyridine in an ionic liquid / L.A. Pavlova, M. V. Pavlov, V.A. Davankov // *Doklady Chemistry*. – 2006. – Т. 406. – № 1. – С. 6-8.

90. One-pot solvothermal synthesis of hypercrosslinked porous ionic polymer and its catalytic activity / J. Xie [и др.] // *Kinetics and Catalysis*. – 2017. – Т. 58. – № 3. – С. 321-327.
91. Germain J. Hypercrosslinked polyanilines with nanoporous structure and high surface area: potential adsorbents for hydrogen storage / J. Germain, J.M.J. Fréchet, F. Svec // *Journal of Materials Chemistry*. – 2007. – Т. 17. – № 47. – С. 4989.
92. Adsorptivity of a Hyper Cross-Linked Ionic Polymer Poly(vinyl imidazole)-1,4-bis(chloromethyl)benzene for Thiophenic Sulfurs in Model Oil / J. Zhang [и др.] // *Energy & Fuels*. – 2016. – Т. 30. – № 6. – С. 5035-5041.
93. Davankov V.A. Macronet polysterene structures for ionites and method of producing same / V.A. Davankov, S. V. Rogoshin, M.P. Tsyurupa. – 1973.
94. Цюрупа М.П. Авторское свидетельство. Способ получения макросетчатых сополимеров стирола / М.П. Цюрупа. – СССР, 1969.
95. Arshady R. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey / R. Arshady // *Colloid & Polymer Science*. – 1992. – Т. 270. – № 8. – С. 717-732.
96. Цилипоткина М.В. Исследование пористой структуры макросетчатых сорбентов на основе полистирола / М.В. Цилипоткина, А.А. Тагер // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. – 1976. – Т. 12. – № 11. – С. 874-877.
97. Immunomagnetic sulfonated hypercrosslinked polystyrene microspheres for electrochemical detection of proteins / P. Álek [и др.] // *Journal of Materials Chemistry*. – 2011. – Т. 21. – № 38. – С. 14783-14792.
98. Davankov V.A. Macronet isoporous gels through crosslinking of dissolved polystyrene / V.A. Davankov, S. V. Rogoshin, M.P. Tsyurupa // *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*. – 1974. – Т. 47. – № 1. – С. 95-101.
99. Kolarz B.N. Hyper-crosslinked sorbents for hemoperfusion / B.N. Kolarz, D. Jermakowicz-Bartkowiak // *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. – 1995. – Т. 227. – № 1. – С. 57-68.
100. Phenol adsorption on α,α' -dichloro-p-xylene (DCX) and 4,4'-bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl (BCMBP) modified XAD-4 resins from aqueous solutions / J. Huang [и др.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – Т. 222. – С. 1-8.
101. Maya F. A new approach to the preparation of large surface area poly (styrene-co-divinylbenzene) monoliths via knitting of loose chains using external crosslinkers and / F. Maya, F. Svec // *Polymer*. – 2014. – Т. 55. – С. 340-346.
102. Effect of catalyst concentration and reaction time on one-step synthesized hypercrosslinked polyxylene / S.M. Lee [и др.] // *Macromolecular Research*. – 2014. – Т. 22. – № 5. – С. 481-486.
103. Multi-length scale porous polymer films from hypercrosslinked breath figure arrays / L. Ding [и др.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2016. – Т. 461. – С. 179-184.
104. Chaukura N. Conversion of post consumer waste polystyrene into a high value adsorbent and its sorptive properties for Congo Red removal from aqueous solution / N. Chaukura, B.B. Mamba, S.B. Mishra // *Journal of Environmental Management*. – 2017. – Т. 193. – С. 280-289.

105. Fabrication and adsorption performance for CO₂ capture of advanced nanoporous microspheres enriched with amino acids / H. Ouyang [и др.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2018. – Т. 532. – С. 433-440.
106. Cjurupa M.P. Synthese und einige physiko-chemische Eigenschaften makrovernetzter isoporöser Styrenpolymere mit Vernetzungsbrücken vom Diphenylmethantyp / M.P. Cjurupa, V. V. Lalaev, V.A. Davankov // *Acta Polymerica*. – 1984. – Т. 35. – № 6. – С. 451-455.
107. Regas F.P. Suspension crosslinking of polystyrene with friedel-crafts catalysts / F.P. Regas, C.J. Papadoyannis // *Polymer Bulletin*. – 1980. – Vol. 3. – № 5. – P. 279-284.
108. A green and low-cost strategy to synthesis of tunable pore sizes porous organic polymers derived from waste-expanded polystyrene for highly efficient removal of organic contaminants / A. Hu [и др.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2019. – Т. 370. – № February. – С. 251-261.
109. Verfahren zur vernetzung von vinylaromatischen polymeren / L. Feistel [и др.]. – GDR, 1980.
110. Urban J. Effect of hypercrosslinking conditions on pore size distribution and efficiency of monolithic stationary phases / J. Urban, V. Škeříková // *Journal of Separation Science*. – 2014. – Т. 37. – № 21. – С. 3082-3089.
111. Formation of Diphenyl Sulfoxide and Diphenyl Sulfide via the Aluminum Chloride-Facilitated Electrophilic Aromatic Substitution of Benzene with Thionyl Chloride, and a Novel Reduction of Sulfur (IV) to Sulfur (II) / X. Sun [и др.] // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. – 2010. – Т. 185. – № 12. – С. 2535-2542.
112. Solid-State ¹³C MAS NMR Studies of Hyper-Cross-Linked Polystyrene Resins / R. V. Law [и др.] // *Macromolecules*. – 1996. – Т. 29. – № 19. – С. 6284-6293.
113. Norman S.I. Removal of bitterness from citrus juices using a post-crosslinked adsorbent resin / S.I. Norman, R.T. Stringfield, C.C. Gopsil. – USA, 1989.
114. Dawson-Ekeland K.R. Decaffeination of Liquid Medium / K.R. Dawson-Ekeland, R.T. Stringfield. – 1989.
115. Рогожин С.В. Галогенметилирование сополимеров стирола с дивинилбензолом / С.В. Рогожин, В.В. Коршак, В.А. Даванков // *Высокомолекулярные соединения*. – 1966. – Т. 8. – № 7. – С. 1275-1278.
116. Вредные вещества в окружающей среде. Кислородсодержащие органические соединения. Часть I / ред. В.А. Филов. – НПО «Профессионал», 2007. – 404 с.
117. Chloromethylation of polystyrenes and styrene copolymers. Applications / M. Camps [и др.] // *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. – 1987. – Т. 27. – № 3-4. – С. 505-557.
118. A new chloromethylation method based on polystyrene-divinylbenzene / Y. Fu [и др.] // *Chemical Papers*. – 2019. – Т. 73. – № 9. – С. 2183-2188.
119. Rodrigo R. Preparation of chloromethylated and aminated gel-type poly(styrene-co -divinylbenzene) microparticles with controlled degree of functionalization / R. Rodrigo, C.A. Toro, J. Cuellar // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2013. – Т. 130. – № 6. – С. n/a-n/a.

120. Moulay S. Towards halomethylated benzene-bearing monomeric and polymeric substrates / S. Moulay // *Designed Monomers and Polymers*. – 2011. – Т. 14. – № 3. – С. 179-220.
121. Blanc Reaction of Aromatic Compounds Catalyzed by Ionic Liquids / Y. FANG [и др.] // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – 2008. – Т. 16. – № 3. – С. 357-360.
122. Determination of methylene bridge crosslinking in chloromethylated PS-DVB resins / G.L. Burnett [и др.] // *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. – 2016. – Т. 54. – № 13. – С. 1955-1960.
123. Influence of cross-linking rate on the structure of hypercrosslinked networks: Multiscale computer simulation / M.K. Glagolev [и др.] // *Polymer*. – 2016. – Т. 86. – С. 168-175.
124. Abbott L.J. Formation of Microporosity in Hyper-Cross-Linked Polymers / L.J. Abbott, C.M. Colina // *Macromolecules*. – 2014. – Т. 47. – № 15. – С. 5409-5415.
125. Kupgan G. NLDFT Pore Size Distribution in Amorphous Microporous Materials / G. Kupgan, T.P. Liyana-Arachchi, C.M. Colina // *Langmuir*. – 2017. – Т. 33. – № 42. – С. 11138-11145.
126. Synthesis of davankov-type hypercrosslinked resins using different isomer compositions of vinylbenzyl chloride monomer, and application in the solid-phase extraction of polar compounds / N. Fontanals [и др.] // *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. – 2005. – Т. 43. – № 8. – С. 1718-1728.
127. A gas-adsorbing porous aromatic hyper-cross-linked polymer and a method of preparing thereof / L. Marchese [и др.]. – 2016.
128. Grassie N. Friedel-Crafts crosslinking of polystyrene / N. Grassie, J. Gilks // *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. – 1973. – Т. 11. – № 7. – С. 1531-1552.
129. Grassie N. Thermal analysis of polystyrenes crosslinked by p-di(chloromethyl)benzene / N. Grassie, J. Gilks // *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. – 1973. – Т. 11. – № 8. – С. 1985-1994.
130. Rapid Generation and Control of Microporosity, Bimodal Pore Size Distribution, and Surface Area in Davankov-Type Hyper-Cross-Linked Resins / J. Ahn [и др.] // *Macromolecules*. – 2006. – Т. 39. – № 2. – С. 627-632.
131. Thiourea modified hyper-crosslinked polystyrene resin for heavy metal ions removal from aqueous solutions / Z. Yang [и др.] // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2018. – Т. 135. – № 1. – С. 45568.
132. On factors affecting the swelling ability of crosslinked polymers. Effect of the rate of crosslinking in the polymer solution / M.P. Tsyurupa [и др.] // *Polymer Science U.S.S.R.* – 1986. – Т. 28. – № 3. – С. 659-665.
133. Surface Properties of Hyper-Cross-Linked Polymeric Resins Using Inverse Gas Chromatography: Effect of Post-Cross-Linking Solvents / L. Jia [и др.] // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2015. – Т. 119. – № 37. – С. 21404-21412.
134. Preparation of uniform hypercrosslinked microspheres with large specific surface area / Q. Zhou [и др.] // *Advanced Materials Research*. – 2011. – Т. 239-242. – С. 1842-1845.

135. A newly synthesized N,O group modified hypercrosslinked resin with effective uptake towards polyphenols from aqueous media: behavior and mechanism / C. Xu [и др.] // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2019. – Т. 94. – № 1. – С. 276-287.
136. Mechanism of oxidative reaction in the post crosslinking of hypercrosslinked polymers / G. Meng [и др.] // *European Polymer Journal*. – 2007. – Т. 43. – № 6. – С. 2732-2737.
137. A formaldehyde carbonyl groups-modified self-crosslinked polystyrene resin: Synthesis, adsorption and separation properties / X. Li [и др.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2016. – Т. 500. – С. 1-9.
138. Фазовое расслоение в условиях синтеза сверхсшитых полистирольных сеток в среде циклогексана / М.П. Цюрупа [и др.] // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 1995. – Т. 37. – № 6. – С. 964-968.
139. Ghafari M. One-step hyper-cross-linking of porous styrenic polymers using dichloroalkane cross-linkers to maintain hydrophobicity / M. Ghafari, J.D. Atkinson // *Polymer*. – 2017. – Т. 116. – С. 278-286.
140. Transforming waste expanded polystyrene foam into hyper-crosslinked polymers for carbon dioxide capture and separation / Z. Fu [и др.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2017. – Т. 323. – С. 557-564.
141. Bevington J.C. 155. The cross-linking of vinyl polymers by Friedel-Crafts catalysts. Part I / J.C. Bevington, R.G.W. Norrish // *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. – 1948. – № 482. – С. 771-774.
142. A facile synthesis of hyper-cross-linked polystyrene resins for phenol removal / F. Li [et al.] // *Reactive and Functional Polymers*. – 2021. – Vol. 167. – P. 105018.
143. Msayib K.J. Inexpensive polyphenylene network polymers with enhanced microporosity / K.J. Msayib, N.B. McKeown // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2016. – Т. 4. – № 26. – С. 10110-10113.
144. Hou S. Effects of synthesis methodology on microporous organic hyper-cross-linked polymers with respect to structural porosity, gas uptake performance and fluorescence properties / S. Hou, S. Razzaque, B. Tan // *Polymer Chemistry*. – 2019. – Т. 10. – № 11. – С. 1299-1311.
145. Preparation of hyper-cross-linked hydroxylated polystyrene for adsorptive removal of methylene blue / F. Li [et al.] // *RSC Advances*. – 2021. – Vol. 11. – № 41. – P. 25551-25560.
146. Hradil J. Styrene-divinylbenzene copolymers post-crosslinked with tetrachloromethane / J. Hradil, E. Králová // *Polymer*. – 1998. – Т. 39. – № 24. – С. 6041-6048.
147. Novel adsorbents derived from recycled waste polystyrene via cross-linking reaction for enhanced adsorption capacity and separation selectivity of CO₂ / Z. Fu [и др.] // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. – 2019. – Т. 97. – № xxxx. – С. 381-388.
148. Chemical modification of Amberlite XAD-4 by carbonyl groups for phenol adsorption from wastewater / C. Li [и др.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – Т. 229. – С. 20-26.

149. Gadwdzik B. Modification of porous poly(styrene-divinylbenzene) beads by Friedel-Crafts reaction / B. Gadwdzik, J. Osypiuk // *Chromatographia*. – 2001. – Т. 54. – № 5-6. – С. 323-328.
150. Adsorptive removal of p -nitrophenol from water with mechano-synthesized porous organic polymers / H. Zeng [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2018. – Vol. 42. – № 24. – P. 20205-20211.
151. Lee J.-S.M. Five-Minute Mechano-synthesis of Hypercrosslinked Microporous Polymers / J.-S.M. Lee, T. Kurihara, S. Horike // *Chemistry of Materials*. – 2020. – Т. 32. – № 18. – С. 7694-7702.
152. Морфология макросетчатых изопористых полимеров стирола типа «стиросорб» / М.П. Цюрупа [и др.] // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 1985. – Т. 27. – № 2. – С. 339-345.
153. Tailoring the pore size of hypercrosslinked polymers / B. Li [и др.] // *Soft Matter*. – 2011. – Т. 7. – № 22. – С. 10910.
154. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report) / M. Thommes [и др.] // *Pure and Applied Chemistry*. – 2015. – Т. 87. – № 9-10. – С. 1051-1069.
155. Tsyurupa M.P. Porous structure of hypercrosslinked polystyrene: State-of-the-art mini-review / M.P. Tsyurupa, V.A. Davankov // *Reactive and Functional Polymers*. – 2006. – Т. 66. – № 7. – С. 768-779.
156. Mikhail R.S. Investigations of a complete pore structure analysis. I. Analysis of micropores / R.S. Mikhail, S. Brunauer, E.E. Bodor // *Journal of Colloid And Interface Science*. – 1968. – Т. 26. – № 1. – С. 45-53.
157. Horvath, G. and Kawazoe K. Method for calculation effective pore size distribution in molecular sieve carbon / K. Horvath, G. and Kawazoe // *J. Chem. Eng. Japan*. – 1983. – Т. 16. – № 12. – С. 470.
158. Hypercrosslinked polystyrene microspheres with ultrahigh surface area and their application in gas storage / Q. Liu [и др.] // *Materials Chemistry and Physics*. – 2017. – Т. 199. – С. 616-622.
159. Ethylene glycol dimethacrylate modified hyper-cross-linked resins: Porogen effect on pore structure and adsorption performance / T. Zhang [и др.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – Т. 339. – № January. – С. 278-287.
160. Zhou F. Alkoxy-Modified Hyper-Cross-Linked Polymers with Hierarchical Porosity and Their Adsorption of Salicylic Acid from Aqueous Solution / F. Zhou, R. Man, J. Huang // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2018. – Т. 57. – № 37. – С. 12420-12428.
161. Abbott L.J. Polymatic: A generalized simulated polymerization algorithm for amorphous polymers / L.J. Abbott, K.E. Hart, C.M. Colina // *Theoretical Chemistry Accounts*. – 2013. – Т. 132. – № 3. – С. 1-19.
162. Positron annihilation study of hyper-crosslinked sorbents / V.P. Shantarovich [и др.] // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2003. – Т. 68. – № 3-4. – С. 639-641.
163. Positron annihilation in polymers with highly developed specific surface / V.P. Shantarovich [и др.] // *Materials Science Forum*. – 2004. – Т. 445-446. – С. 346-348.

164. Positron annihilation study of hyper-crosslinked sorbents / V.P. Shantarovich [и др.] // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2003. – Т. 68. – № 3-4. – С. 639-641.
165. Пастухов А.В. Физико-химические свойства и структурная подвижность сверхсшитых полистиролов : PhD Thesis / А.В. Пастухов. – ИНЭОС РАН, 2008.
166. Investigation of the properties of hypercrosslinked polystyrene as a stationary phase for high-performance liquid chromatography / N.A. Penner [и др.] // *Chromatographia*. – 1999. – Т. 50. – № 9-10. – С. 611-620.
167. Water in nanopores of hypercrosslinked hydrophobic polystyrene at low temperatures / A. V. Pastukhov [и др.] // *Doklady Physical Chemistry*. – 2006. – Т. 411. – № 1. – С. 305-308.
168. NMR investigation of the porosity of hypercrosslinked polystyrene and the properties of water confined in its nanopores / Т.А. Babushkina [и др.] // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2012. – Т. 86. – № 10. – С. 1588-1594.
169. Dynamic properties of water in swollen hypercrosslinked polystyrenes, according to NMR relaxation and diffusion data / Т.А. Babushkina [и др.] // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2015. – Т. 89. – № 8. – С. 1414-1418.
170. Davankov V.A. Unusual mobility of hypercrosslinked polystyrene networks: Swelling and dilatometric studies / V.A. Davankov, A. V. Pastukhov, M.P. Tsyurupa // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2000. – Т. 38. – № 11. – С. 1553-1563.
171. Physicochemical and adsorption properties of hypercross-linked polystyrene with ultimate cross-linking density / M.P. Tsyurupa [и др.] // *Journal of Separation Science*. – 2014. – Т. 37. – № 7. – С. 803-810.
172. Hypercrosslinked polystyrene: The first nanoporous polymeric material / M.P. Tsyurupa [и др.] // *Nanotechnologies in Russia*. – 2009. – Т. 4. – № 9-10. – С. 665-675.
173. Davankov V.A. Macronet isoporous styrene copolymers: Unusual structure and properties / V.A. Davankov, M.P. Tsyurupa // *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. – 1980. – Т. 91. – № 1. – С. 127-142.
174. Solid-state ^{13}C -NMR analysis of hypercrosslinked polystyrene / R. Joseph [и др.] // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1997. – Т. 35. – № 4. – С. 695-701.
175. Даванков В.А. Сверхсшитые полистирольные сорбенты. Структура, свойства, применение / В.А. Даванков, М.П. Цюрупа. – Saarbrücken, Deutschland: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 76 с.
176. Rasouli S. A deep insight into the polystyrene chain in cyclohexane at theta temperature: molecular dynamics simulation and quantum chemical calculations / S. Rasouli, M.R. Moghbeli, S.J. Nikkhah // *Journal of Molecular Modeling*. – 2019. – Т. 25. – № 7.
177. Gus'kov V.Yu. Application of the LSER method for investigation of intermolecular interactions of porous polymer surface with organic molecules / V.Yu. Gus'kov, F.K. Kudasheva, O.S. Mozgovoi // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. – 2013. – Т. 49. – № 6. – С. 639-641.

178. Gus'kov V.Y. Surface polarity of porous polymers at different coverages / V.Y. Gus'kov, A.G. Ganieva, F.K. Kudasheva // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2016. – Т. 133. – № 44. – С. 1-7.
179. Adsorption characteristics of pentane, hexane, and heptane: Comparison of hydrophobic hypercrosslinked polymeric adsorbent with activated carbon / J. Wu [и др.] // *Journal of Chemical and Engineering Data*. – 2012. – Т. 57. – № 12. – С. 3426-3433.
180. Long C. Adsorption of n-hexane vapor by macroporous and hypercrosslinked polymeric resins: Equilibrium and breakthrough analysis / C. Long, W. Yu, A. Li // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – Т. 221. – С. 105-110.
181. Prediction of the breakthrough curves of VOC isothermal adsorption on hypercrosslinked polymeric adsorbents in a fixed bed / J. Wu [и др.] // *RSC Advances*. – 2016. – Т. 6. – № 34. – С. 28986-28993.
182. Removal of benzene and methyl ethyl ketone vapor: Comparison of hypercrosslinked polymeric adsorbent with activated carbon / C. Long [и др.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2012. – Т. 203-204. – С. 251-256.
183. The prediction of adsorption isotherms of ester vapors on hypercrosslinked polymeric adsorbent / L. Wu [и др.] // *Frontiers of Environmental Science and Engineering*. – 2016. – Т. 10. – № 3. – С. 482-490.
184. Binary adsorption equilibrium and breakthrough of toluene and cyclohexane on macroporous and hypercrosslinked polymeric resins / Q. Shi [и др.] // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2018. – Т. 271. – № May. – С. 73-82.
185. Characterization of hydrophobic hypercrosslinked polymer as an adsorbent for removal of chlorinated volatile organic compounds / C. Long [и др.] // *Environmental Science and Technology*. – 2011. – Т. 45. – № 10. – С. 4506-4512.
186. Veverka P. Influence of hypercrosslinking on adsorption and absorption on or in styrenic polymers / P. Veverka, K. Jeřábek // *Reactive and Functional Polymers*. – 2004. – Т. 59. – № 1. – С. 71-79.
187. Tsyurupa M.P. Hypercrosslinked polystyrene networks with ultimate degrees of crosslinking and their sorption activity / M.P. Tsyurupa, Z.K. Blinnikova, V.A. Davankov // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2010. – Т. 84. – № 10. – С. 1767-1771.
188. Huang J. Equilibria and kinetics of phenol adsorption on a toluene-modified hypercross-linked poly(styrene-co-divinylbenzene) resin / J. Huang, R. Deng, K. Huang // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – Т. 171. – № 3. – С. 951-957.
189. Проскурина Н.А. Сверхсшитый полистирол как материал для твёрдофазной экстракции : PhD Thesis / Н.А. Проскурина. – ИНЭОС РАН, 2009.
190. Use of the hyper-crosslinked polystyrene sorbents «Styrosorb» for solid phase extraction of phenols from water / M.P. Tsyurupa [и др.] // *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. – 1995. – Т. 352. – № 7-8. – С. 672-675.
191. Васяров Г.Г. Инструкция по применению Аналитического комплекта «Фенолы» / Г.Г. Васяров. – Москва, 2005.
192. Microporous hypercrosslinked polystyrene Styrosorb as a restricted access packing in sample clean-up for high performance liquid chromatography. Part I: Evaluation

- of restricted access properties / M. Beth [и др.] // *Chromatographia*. – 1993. – Т. 36. – № 1. – С. 351-355.
193. Lailiang O. Macroporous Polystyrene Adsorbent Resin and Its Application in Hemoperfusion / O. Lailiang // *Hemoperfusion, Plasmapheresis and Other Clinical Uses of General, Biospecific, Immuno and Leucocyte Adsorbents*. – 2017. – Т. 4. – С. 471-514.
194. Prospects for the application of biporous sorbents based on hypercrosslinked styrene polymers for the prevention and treatment of systemic purulent-septic complications / N.Y. Anisimova [и др.] // *Nanotechnologies in Russia*. – 2012. – Т. 7. – № 5-6. – С. 318-326.
195. Гемосовместимость наносорбентов на основе сверхсшитых полимеров стирола серии стиросорб / Н.Ю. Анисимова [и др.] // *Российский Биотерапевтический Журнал*. – 2012. – Т. 1. – № 11. – С. 23-27.
196. Urban J. Efficient Separation of Small Molecules Using a Large Surface Area Hypercrosslinked Monolithic Polymer Capillary Column / J. Urban, F. Svec, J.M.J. Fréchet // *Analytical Chemistry*. – 2010. – Т. 82. – № 5. – С. 1621-1623.
197. Пробоподготовка для хроматографии - патроны Диапак [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.bcmst.ru/catalog/spe/DIAPAK/>.
198. Adsorption of catecholamines from their aqueous solutions on hypercrosslinked polystyrene / V. V. Tolmacheva [и др.] // *Reactive and Functional Polymers*. – 2018. – Т. 131. – № June. – С. 56-63.
199. Сорбция водорастворимых витаминов на сорбентах различной природы Sorption of water-soluble vitamins in various sorbents / С.Н. Ланин [и др.]. – 2015. – С. 179-195.
200. Determination of polyaromatic hydrocarbons in fat-containing food using selective solid-phase extraction / N. Proskurina [и др.] // *Sorption and chromatographic processes*. – 2009. – С. 167-176.
201. Карцова Л.А. Использование Сверхсшитого Полистирола Как Сорбента Для Твердофазной Экстракции При Анализе Лекарств В Биологических Объектах Методом Высокоэффективной Тонкослойной Хроматографии / Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, Е.В. Обьедкова // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2010. – Т. 10. – № 1. – С. 5-14.
202. ISOLUTE® ENV+ SPE Columns and Well Plates [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.biotage.com/isolute-env>.
203. Monitoring of aromatic monosulfonic acids in coastal waters by ion-pair liquid chromatography followed by electrospray-mass spectrometric detection / M.C. Alonso [и др.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2002. – Т. 21. – № 10. – С. 2059-2066.
204. Voisin A. Separation study of organic bases on new polymeric stationary phases under basic conditions / A. Voisin, A. Thienpont, V. Héroguez // *European Polymer Journal*. – 2012. – Т. 48. – № 1. – С. 228-234.
205. DOWEX™ OPTIPORE™ SD-2 Adsorbent. Polymeric Adsorbent for Sucrose and Other Sweetener Applications [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Dowex-Optipore-SD-2-L.pdf>.

206. Pavlinov S.A. An Investigation of the Solid-Phase Extraction for Determination of Propranolol and Its Metabolites Using High Performance Liquid Chromatography / S.A. Pavlinov, V.K. Piotrovskii // *Химико-фармацевтический журнал*. – 1990. – Т. 24. – № 2. – С. 174-176.
207. Hypercrosslinked strong cation-exchange polymers for selective extraction of serum purine metabolites associated with gout / Y. Xu [и др.] // *Talanta*. – 2016. – Т. 151. – С. 172-178.
208. Hypercrosslinked strong anion-exchange polymers for selective extraction of fluoroquinolones in milk samples / X. Liang [и др.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – Т. 166. – С. 379-386.
209. Pautova A.K. Microextraction of aromatic microbial metabolites by packed hypercrosslinked polystyrene from blood serum / A.K. Pautova, P.D. Sobolev, A.I. Revelsky // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2020. – Т. 177. – С. 112883.
210. Facile synthesis of magnetic hypercrosslinked polystyrene and its application in the magnetic solid-phase extraction of sulfonamides from water and milk samples before their HPLC determination / V. V. Tolmacheva [и др.] // *Talanta*. – 2016. – Т. 152. – № 2. – С. 203-210.
211. ВЭЖХ определение малонового диальдегида в плазме и слюне с очисткой дериватов на сверхсшитом полистироле (Purosep-270) / А.А. Дутов [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2018. – Т. 18. – № 1. – С. 73-82.
212. Экстракционные технологии для клинического ВЭЖХ анализа прогестерона, 17 α - гидроксипрогестерона и синтетических прогестинов в сыворотке крови / А.А. Дутов [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2014. – Т. 14. – № 2. – С. 324-331.
213. ВЭЖХ анализ дегидроэпиандростерона сульфата в сыворотке крови с твердофазной экстракцией на сверхсшитом полистироле (purosep-200) / А.А. Дутов [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2014. – Т. 60. – № 6. – С. 651-654.
214. Covaci A. Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry / A. Covaci, S. Voorspoels // *Journal of Chromatography B*. – 2005. – Т. 827. – № 2. – С. 216-223.
215. Multi-length scale porous polymer films from hypercrosslinked breath figure arrays / L. Ding [и др.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2016. – Т. 461. – С. 179-184.
216. Comparison of different solid-phase extraction materials for the determination of fluoroquinolones in chicken plasma by LC-MS/MS / F. Janusch [и др.] // *Journal of Chromatography B*. – 2014. – Т. 951-952. – № 1. – С. 149-156.
217. Improved determination of femtogram-level organic explosives in multiple matrices using dual-sorbent solid phase extraction and liquid chromatography-high resolution accurate mass spectrometry / R.C. Irlam [и др.] // *Talanta*. – 2019. – Т. 203. – № December 2018. – С. 65-76.

218. Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background / K. Goempel [и др.] // *Archives of Toxicology*. – 2017. – Т. 91. – № 11. – С. 3551-3560.
219. Cohen A.S. Automated Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination of N-methyl-2-pyrrolidone and its Metabolites in Urine and Plasma / A.S. Cohen, B.A.G. Jönsson // *Chromatographia*. – 2007. – Т. 65. – № 7-8. – С. 407-412.
220. Drug Screening Using Microextraction in a Packed Syringe (MEPS)/Mass Spectrometry Utilizing Monolithic-, Polymer-, and Silica-Based Sorbents / Z. Altun [и др.] // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2006. – Т. 29. – № 6. – С. 829-839.
221. Aromatic aldehydes as selective fluorogenic derivatizing agents for α -dicarbonyl compounds. Application to HPLC analysis of some advanced glycation end products and oxidative stress biomarkers in human serum / M.H. El-Maghrabey [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2018. – Vol. 158. – P. 38-46.
222. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites in pig serum / U. Brezina [и др.] // *Mycotoxin Research*. – 2014. – Т. 30. – № 3. – С. 171-186.
223. Azzouz A. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry / A. Azzouz, A.J. Rascón, E. Ballesteros // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2016. – Т. 119. – С. 16-26.
224. Ahmad S.M. High throughput bar adsorptive microextraction: A novel cost-effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples / S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira // *Talanta*. – 2019. – Т. 199. – № January. – С. 195-202.
225. Magnetic beads as an extraction medium for simultaneous quantification of acetaminophen and structurally related compounds in human serum / C. Bylda [и др.] // *Drug Testing and Analysis*. – 2015. – Т. 7. – № 6. – С. 457-466.
226. Determination of the total content of some sulfonamides in milk using solid-phase extraction coupled with off-line derivatization and spectrophotometric detection / S.G. Dmitrienko [и др.] // *Food Chemistry*. – 2015. – Т. 188. – С. 51-56.
227. Using Hypercrosslinked Polystyrene for the Multicomponent Solid-Phase Extraction of Residues of 63 Veterinary Preparations in Their Determination in Chicken Meat by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry / A.O. Melekhin [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 76. – № 8. – P. 946-959.
228. Šafaříková M. Magnetic solid-phase extraction / M. Šafaříková, I. Šafařík // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 1999. – Т. 194. – № 1-3. – С. 108-112.

229. Vasconcelos I. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices / I. Vasconcelos, C. Fernandes // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2017. – Т. 89. – С. 41-52.
230. Room-temperature synthesis of core-shell structured magnetic covalent organic frameworks for efficient enrichment of peptides and simultaneous exclusion of proteins / G. Lin [и др.] // *Chemical Communications*. – 2017. – Т. 53. – № 26. – С. 3649-3652.
231. Magnetic solid-phase extraction using magnetic hypercrosslinked polymer for rapid determination of illegal drugs in urine / Q. Gao [и др.] // *Journal of Separation Science*. – 2011. – Т. 34. – № 21. – С. 3083-3091.
232. Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review / G. Islas [и др.] // *International Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. – Т. 2017. – С. 1-16.
233. Dybowski M.P. Application of the QuEChERS procedure for analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its metabolites in authentic whole blood samples by GC-MS/MS / M.P. Dybowski, A.L. Dawidowicz // *Forensic Toxicology*. – 2018. – Т. 36. – № 2. – С. 415-423.
234. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles / E. Baltussen [и др.] // *Journal of Microcolumn Separations*. – 1999. – Т. 11. – № 10. – С. 737-747.
235. Sánchez-Rojas F. A Review of Stir Bar Sorptive Extraction / F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J.M. Cano-Pavón // *Chromatographia*. – 2008. – Т. 69. – № S1. – С. 79-94.
236. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions / A. Prieto [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Т. 1217. – № 16. – С. 2642-2666.
237. Kassem M.G. Stir bar sorptive extraction for central nervous system drugs from biological fluids / M.G. Kassem // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2011. – Т. 4. – № 1. – С. 25-35.
238. Stir bar sorptive extraction-LC-MS for the analysis of fluoxetine in plasma / C. Fernandes [и др.] // *Chromatographia*. – 2006. – Т. 64. – № 9-10. – С. 517-521.
239. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids / J.P. Lambert [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – Т. 1075. – № 1-2. – С. 43-49.
240. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications / É.A. Souza-Silva [и др.] // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2015. – Т. 71. – С. 249-264.
241. Gonçalves A. Variations in headspace microextraction procedures and current applications in bioanalysis / A. Gonçalves, E. Gallardo, M. Barroso // *Bioanalysis*. – 2015. – Т. 7. – № 17. – С. 2235-2240.
242. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection / R. López [и др.] // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2007. – Т. 846. – № 1-2. – С. 298-305.

243. Serum levels of organochlorine pesticides in the general population of Thessaly, Greece, determined by HS-SPME GC-MS method / M. Koureas [и др.] // *Environmental Research*. – 2016. – Т. 148. – С. 318-321.
244. Recent advances in in vivo spme sampling / N. Riboni [и др.] // *Separations*. – 2020. – Т. 7. – № 1.
245. In vivo solid-phase microextraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring blood eicosanoids time profile after lipopolysaccharide-induced inflammation in Sprague-Dawley rats / V. Bessonneau [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – Т. 1424. – С. 134-138.
246. Medtere A.S. Aplicação de carvões ativados para revestimento externo de micro-colectores usados como método para extracção vestigial de substâncias polares / A.S. Medtere. – Portugal, 2009.
247. Abdel-Rehim M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry / M. Abdel-Rehim // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2004. – Т. 801. – № 2. – С. 317-321.
248. Trajan Scientific and Medical™ MEPS BINs for XCHANGE/eVol Syringes [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.fishersci.se/shop/products/meps-bins-xchange-evol-syringes-12/p-7114334>.
249. Sample Prep SPME-TDAS/SPDE [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.chromtech.de/Autosampler-PAL-Systems-Sample-Preparation/Sample-Prep-SPME-TDAS/SPDE>.
250. Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology | Bioanalysis [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio.12.139?src=recsys&journalCode=bio> (дата обращения: 07.06.2021).
251. Abdel-Rehim M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis : Extraction Techniques / M. Abdel-Rehim // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217. – № 16. – P. 2569-2580.
252. Li W. Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis / W. Li, W. Jian, Y. Fu // *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. – 2019. – С. 1-30.
253. Waters sorbent selection guide [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/> (дата обращения: 15.08.2020).
254. Bielicka-Daszkiewicz K. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents / K. Bielicka-Daszkiewicz, A. Voelkel // *Talanta*. – 2009. – Т. 80. – № 2. – С. 614-621.
255. Sigmaaldrich catalog. Spin columns [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=spin+column&interface=All> (дата обращения: 15.08.2020).
256. Walker J.M. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology. Forensic DNA Typing Protocols / J.M. Walker; ред. W. Goodwin. – 2. – Lancashire , UK: Humana Press, 2016.

257. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics / N. Ali [и др.] // BioMed Research International. – 2017. – Т. 2017. – С. 1-13.
258. Micro solid-phase extraction (pipette tip and spin column) and thin film solid-phase microextraction: Miniaturized concepts for chromatographic analysis / S. Seidi [и др.] // TrAC - Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – Т. 118. – С. 810-827.
259. Monolithic spin column: A new extraction device for analysis of drugs in urine and serum by GC/MS and HPLC/MS / A. Namera [и др.] // Journal of AOAC International. – 2011. – Т. 94. – № 3. – С. 765-774.
260. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I) / A. Andrade-Eiroa [и др.] // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – Т. 80. – С. 641-654.
261. Simultaneous Determination of Cyclosporine A, Tacrolimus, Sirolimus, and Everolimus in Whole-Blood Samples by LC-MS/MS / M. Karapirli [и др.] // The Scientific World Journal. – 2012. – Т. 2012. – С. 1-8.
262. Pocerull E. Improvement of on-line solid-phase extraction for determining phenolic compounds in water / E. Pocerull, R.M. Marcé, F. Borrull // Chromatographia. – 1995. – Т. 41. – № 9-10. – С. 521-526.
263. Quinn H.M. WO97/16724 / H.M. Quinn, J.J. Takarewski. – 1997.
264. Zeng H. The investigation and the use of high flow column-switching LC/MS/MS as a high-throughput approach for direct plasma sample analysis of single and multiple components in pharmacokinetic studies / H. Zeng, J.T. Wu, S.E. Unger // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2002. – Т. 27. – № 6. – С. 967-982.
265. A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system / M. Háková [и др.] // Analytica Chimica Acta. – 2018. – Т. 1023. – С. 44-52.
266. Rabek J.F. Experimental Methods in Polymer Chemistry / J.F. Rabek. – First Printing edition. – Wiley Interscience, 1980.
267. Бухнова Н.Е. Определение удельной поверхности твёрдых тел методом тепловой десорбции / Н.Е. Бухнова, А.П. Карнаухов. – АН СССР, Сибирское отделение, Новосибирск: Наука, 1965.
268. Буянова Н.Е. Методы исследования катализаторов и каталитических реакций / Н.Е. Буянова, Г.Б. Гулкова, А.П. Карнаухов // Кинетика и катализ. – 1965. – № 6. – С. 1085.
269. Krivenek M. / M. Krivenek // Chemicke Listy. – 1962. – Т. 56. – С. 1350.
270. Quantachrome Instruments. NOVA®-e Series Models 25 and 26 NovaWin/NovaWin-CFR GAS SORPTION SYSTEM OPERATING MANUAL / Quantachrome Instruments. – Quantachrome Instruments, 2012.
271. ISO 15901. Pore size distribution and porosity of solid materials by mercury porosimetry and gas adsorption. – 2007. – С. 27.
272. Разработка И Адаптация К Условиям Клинической Лаборатории Методик Газохроматографического Определения Фенилкарбоновых Кислот В

- Сыворотке Крови / В.В. Мороз [и др.] // Журнал Аналитической Химии. – 2015. – Т. 70. – № 4. – С. 418-425.
273. Robin M.B. Method of producing uniform polymer beads / M.B. Robin, E. Park. – 1975. – Вып. 19.
274. Preparation and application of new monosized polymer particles / J. Ugelstad [и др.] // Progress in Polymer Science. – 1992. – Т. 17. – № 1. – С. 87-161.
275. Лабораторная техника органической химии. – Кеил, Б. – Москва: Мир, 1966. – 751 с.
276. Тёмкин М.И. / М.И. Тёмкин // Журнал Физической Химии. – 1955. – Т. 29. – С. 1610.
277. Ion Exchange for Industry / K. Ando [и др.]; ред. M. Streat. – Chichester: Ellis Horwood, 1988. – 279-284 с.
278. Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption - BET method (ISO 9277:2010(E)) // Reference number ISO. – 2010. – Т. 9277. – № 9277. – С. 30 pp.
279. Hubbard K.L. The preparation and characteristics of poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene), including Ambeflite XAD-4. Styrenic resins with pendant vinylbenzene groups / K.L. Hubbard, J.A. Finch, G.D. Darling // Reactive and Functional Polymers. – 1998. – Т. 36. – № 1. – С. 17-30.
280. Bartholin M. Styrene-divinylbenzene copolymers, 3. Revisited IR analysis / M. Bartholin, G. Boissier, J. Dubois // Die Makromolekulare Chemie. – 1981. – Т. 182. – № 7. – С. 2075-2085.
281. On the nature of «functional groups» in non-functionalized hypercrosslinked polystyrenes / М.Р. Тsyurupa [и др.] // Reactive and Functional Polymers. – 2012. – Т. 72. – № 12. – С. 973-982.
282. On the origin of absorbance band around 1700 cm⁻¹ in FTIR spectra of hypercrosslinked polystyrene / М.Р. Тsyurupa [и др.] // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. – 2014. – Т. 50. – № 1. – С. 59-63.
283. Аскадский А.А. Химическое строение и физические свойства полимеров / А.А. Аскадский, Ю.И. Матвеев. – Москва: Химия, 1983. – 248 с.
284. Privalko V.P. On the Molecular Packing Density in Crystalline Polymers / V.P. Privalko // Polymer Journal. – 1975. – Vol. 7. – № 2. – P. 202-206.
285. Jeromenok J. Restricted access: On the nature of adsorption/desorption hysteresis in amorphous, microporous polymeric materials / J. Jeromenok, J. Weber // Langmuir. – 2013. – Т. 29. – № 42. – С. 12982-12989.
286. Parfitt G.D. The analysis of the nitrogen adsorption isotherms of microporous materials / G.D. Parfitt, K.S.W. Sing, D. Urwin // Journal of Colloid And Interface Science. – 1975. – Т. 53. – № 2. – С. 187-193.
287. Penner N.A. Anion-exchange ability of neutral hydrophobic hypercrosslinked polystyrene / N.A. Penner, P.N. Nesterenko // Analytical Communications. – 1999. – Т. 36. – № 5. – С. 199-201.
288. Zhu Q. Adsorption of pyridine from aqueous solutions by polymeric adsorbents MN 200 and MN 500. Part 2: Kinetics and diffusion analysis / Q. Zhu, G.D. Moggridge, C. D'Agostino // Chemical Engineering Journal. – 2016. – Т. 306. – С. 1223-1233.

289. Normal level of sepsis-associated phenylcarboxylic acids in human serum / N.V. Beloborodova [и др.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2015. – Т. 80. – № 3. – С. 374-378.
290. Participation of aromatic microbial metabolites in the development of severe infection and sepsis. / N.V. Beloborodova [и др.] // *Anesteziologiya i Reanimatologiya*. – 2017. – Т. 61. – С. 202-208.
291. Serum Levels of Mitochondrial and Microbial Metabolites Reflect Mitochondrial Dysfunction in Different Stages of Sepsis / N. Beloborodova [и др.] // *Metabolites*. – 2019. – Т. 9. – № 10. – С. E196.
292. Vladimirovna B.N. Interaction of Host-Microbial Metabolism in Sepsis / B.N. Vladimirovna // *Sepsis* / ed. V. Kumar. – InTech, 2017.
293. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material / V.A. Davankov [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – Т. 987. – № 1-2. – С. 67-75.
294. Elucidation of retention mechanisms on hypercrosslinked polystyrene used as column packing material for high-performance liquid chromatography / C.S. Sychov [и др.] // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – Т. 1030. – № 1-2. – С. 17-24.
295. Закономерности сорбции некоторых ароматических гетероциклов из растворов на нанопористом верхшшитом полистироле / Б.Р. Сайфутдинов [и др.] // *Журнал Физической Химии*. – 2010. – Т. 84. – № 9.
296. Джабиева С.А.К. Закономерности сорбции производных бензотриазола на сверхшшитом полистироле и октадецилсиликагеле / С.А.К. Джабиева, С.В. Курбатова // *Бутлеровские чтения*. – 2014. – Т. 37. – № 2. – С. 18-24.
297. Закономерности сорбции производных 1,2,3,4-тетрагидрохинолина из водно-ацетонитрильных растворов на неполярных сорбентах / Н.А. Некрасова [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2016. – Т. 16. – № 2. – С. 154-162.
298. Saifutdinov B.R. Thermodynamic characteristics of the adsorption of 1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4,5-tetrazines from methanol and water-methanol solutions onto hypercrosslinked polystyrene / B.R. Saifutdinov, V.A. Davankov, M.M. Il'in // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2017. – Vol. 91. – № 3. – P. 577-580.
299. Selective adsorption of organic compounds from solutions on hyper-cross-linked polystyrenes with ultimate degrees of cross linking / B.R. Saifutdinov [и др.] // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. – 2015. – Т. 51. – № 6. – С. 957-963.
300. Wu D. Retention mechanism of hypercrosslinked polystyrene silica hybrid phase in normal phase chromatography / D. Wu, G.K. Nedev, C.A. Lucy // *Journal of Chromatography A*. – 2014. – Т. 1370. – № May. – С. 50-55.
301. New insight in adsorption of pyridine on the two modified adsorbents types MN200 and MN500 by means of grand canonical ensemble / B. Mohamed [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2018. – Vol. 263. – P. 413-421.
302. HMDB. Browsing metabolites [Электронный ресурс]. – URL: <https://hmdb.ca/metabolites>.

303. Система для взятия венозной крови VACUETTE® ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ [Электронный ресурс]. – URL: https://omb.ru/upload/iblock/d52/instrukciya_po_vzyatiu_venoznoi_krovi_Vacuette.pdf.

7. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Попов А.Ю., Блинникова З.К., Цюрупа М.П., Даванков В.А. Синтез и адсорбционные свойства сорбентов ограниченного доступа на базе сверхсшитого полистирола // Сорбционные и хроматографические процессы – 2017. – №17. – С. 183–190.
2. Попов А.Ю., Блинникова З.К., Цюрупа М.П., Даванков В.А. Синтез и физико–химические свойства сверхсшитых полистирольных материалов ограниченного доступа // Высокомолекулярные соединения, серия Б. – 2018. №60. – С. 408 – 415.
3. Popov A.Yu, Blinnikova Z.K., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Hypercrosslinked polymeric restricted access materials for analysis of biological fluids // Journal of Separation Science. – 2018. – №41. – С. 3301 – 3309.
4. Popov A.Yu, Blinnikova Z.K., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Trace enrichment of phenylcarboxylic acids from a model biological fluid and serum of human blood // Journal of Separation Science. – 2019. – №42. – С. 2706 – 2714.
5. Попов А.Ю., Блинникова З.К., Цюрупа М.П. Сверхсшитые полистирольные сорбенты ограниченного доступа для селективного извлечения лекарственных препаратов из физиологических жидкостей. // VII Всероссийская Каргинская конференция "Полимеры–2017", Москва, Россия. Сборник тезисов. – 2017. – С. 206.
6. Цюрупа М.П., Блинникова З.К., Попов А.Ю., Даванков В.А. Синтез и сорбционные свойства сверхсшитых полистирольных сорбентов ограниченного доступа // Кинетика и динамика обменных процессов. VI Всероссийский симпозиум. Сочи, Россия. Сборник тезисов. – 2017. – С. 39 – 41
7. Попов А.Ю., Блинникова З.К., Цюрупа М.П., Даванков В.А. Твёрдофазная экстракция фенолкарбоновых кислот с помощью сверхсшитых полистирольных сорбентов ограниченного доступа // Кинетика и динамика обменных процессов. VII Всероссийский симпозиум. Сочи, Россия. Сборник тезисов. – 2018. С. 25 – 26.