

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ИМ.
А.Н. НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Попов Александр Юриевич

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

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата
химических наук

Москва 2021

Работа выполнена в лаборатории стереохимии сорбционных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

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

Официальные оппоненты:

Зубов Виталий Павлович, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии.

Дятлов Валерий Александрович, доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», профессор кафедры химической технологии пластических масс.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита состоится 25 ноября 2021 г. в 11 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.161.02 по присуждению учёной степени кандидата химических наук в ИНЭОС РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Вавилова д. 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИНЭОС РАН,

Автореферат разослан ____ _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.1.161.02,

кандидат химических наук

Беломоина Н.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Для анализа метаболома 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 на основе полимеров с молекулярными отпечатками. Существующие RAM-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. 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 РАМ было бы определения в крови пациентов фенолкарбоновых кислот (ФКК) – биомаркеров сепсиса¹, с помощью ТФЭ сверхсшитым полистиролом. Сепсис является ведущей причиной летальности в отделениях интенсивной терапии, 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/л¹ 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.

Цель работы заключается в разработке новых сверхсшитых полистирольных РАМ 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.
- Оптимизированы условия дополнительной 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.

¹ Beloborodova N. V. и др. Normal level of sepsis-associated phenylcarboxylic acids in human serum // Biochemistry (Moscow). 2015. Т. 80. № 3. С. 374–378.

- 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 низкомолекулярным органическим 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.

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.

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, опубликованных в журналах перечня 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, подготовке докладов и выступлениях на конференциях.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения,

заклучения 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы изложены основные теоретические аспекты пробоподготовки биологических жидкостей с помощью ТФЭ. Приведены основные типы сорбентов ограниченного доступа, и собраны данные по синтезу и свойствам сверхсшитых полистирольных сорбентов, подходящих для ТФЭ. В обзоре обсуждены причины следующих необычных свойств сверхсшитого полистирола: большой свободный объём доступный для сорбатов (пористость), способность набухать в полярных и не полярных газообразных и жидких средах, способность сорбировать ароматические соединения из неполярных сред, гемосовместимость, химическая и термическая стабильность.

Экспериментальная часть

В этой части описаны условия синтеза и способы исследования сверхсшитых сорбентов, методы сорбционных экспериментов и протокол определения ФКК в сыворотке крови человека.

Результаты и их обсуждение

Синтез узкодисперстных сферических частиц полимерного сорбента со средним диаметром от 30 до 80 мкм был осуществлён в две стадии: радикальная суспензионная полимеризация стирола и дивинилбензола, вторичная сшивка сополимера с получением сверхсшитого полистирола.

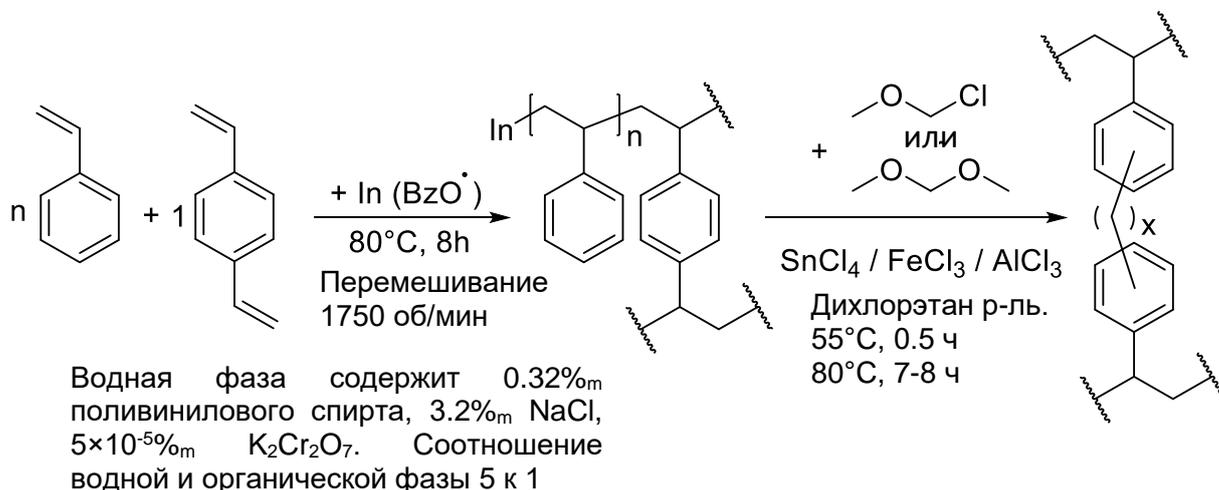


Схема 1. Синтез сверхсшитого полистирола

Синтез гелевых сополимеров стирола с дивинилбензолом

Определены необходимые условия для успешного синтеза требуемых исходных частиц гелевого сополимера, важнейшие из которых: использование центробежной мешалки с правильным соотношением

размеров мешалки и реакционной колбы, отсутствие вибрации установки, равномерный прогрев реакционной массы с свободным пространством над ней. В оптимальных условиях были получены сферические гранулы сополимера стирола с 0.5, 0.7, 1, 2 и 3 мол. % ДВБ, со средними диаметрами в диапазоне от 60 до 70 мкм (Рис. 1) и низкой полидисперсностью.

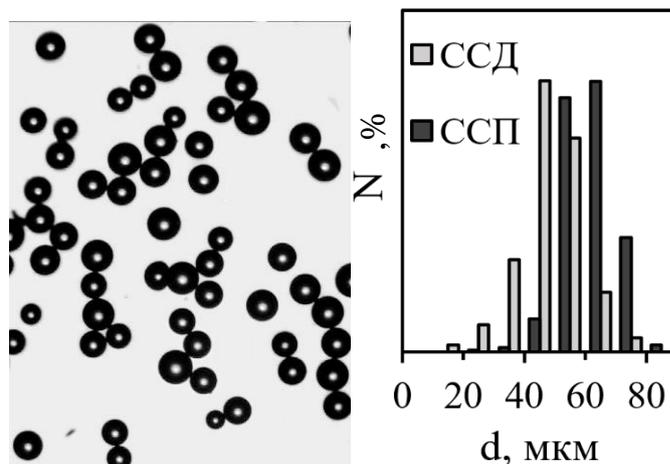


Рис 1 Микрофотография частиц исходного гелевого сополимера стирол-ДВБ (ССД) с 2% ДВБ и распределение по размеру частиц ССД и сверхсшитого продукта (ССП)

Оптимизация условий синтеза сверхсшитого полистирола

В качестве альтернативны монохлордиметиловому эфиру (МХДЭ) были протестированы диметоксиметан и CHCl_3 . В качестве замены классического катализатора, дорогого хлорного олова, были испытаны более дешевые и активные катализаторы FeCl_3 и AlCl_3 . Степени сшивки $X = 100, 200, 300$ и 400% соответствуют реакции 1 основомоль полистирола с 0.5, 1, 1.5, 2 молями эфира, при котором каждое фенильное кольцо оказывается связанным с соседними фенилами одним, двумя, тремя и четырьмя метиленовыми группами соответственно.

Активность систем катализатор - сшивающий агент тестировали на гранулах макропористого сополимера, содержащего 7 мол. % ДВБ ($d=200-1000$ мкм). Критерием успешно прошедшей реакции служила величина кажущейся внутренней удельной поверхности (S_{Ar} , $\text{м}^2/\text{г}$), для исходного ССД $S_{Ar}=50$ $\text{м}^2/\text{г}$. Для сравнения был получен ССП по классическому пути (Табл. 1, № 1), его $S_{Ar}=700$ $\text{м}^2/\text{г}$.

Таблица 1. Загрузки реагентов, S_{Ar} и степень разрушения гранул ССП на основе макропористого ССД с 7% ДВБ.

№	Моль сшивающего агента на основомоль ССД		Моль катализатора на моль сшивающего агента		$S_{Ar}, \text{м}^2/\text{г}$	Разрушение гранул
1	0.5	МХДЭ	1	SnCl_4	700	нет
2	1	CHCl_3	1	SnCl_4	50	нет
3	1	CHCl_3	1	FeCl_3	170	слабое
4	~10 (раств-ль)	CHCl_3	0.1	FeCl_3	150	слабое
5	1	CHCl_3	1	AlCl_3	500	сильное
6	1	CHCl_3	0.23+0.77	$\text{AlCl}_3+\text{FeCl}_3$	400	слабое
7	1	CHCl_3	0.77+0.23	$\text{AlCl}_3+\text{FeCl}_3$	650	сильное
8	0.5	$\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$	1	SnCl_4	80	нет
9	2.5	$\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$	2	SnCl_4	600	нет
10	0.5	$\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$	1	FeCl_3	750	слабое

Хлороформ оказался не активным сшивающим агентом, сверхсшитый продукт с достаточно высокой поверхностью $S_{Ar}=650 \text{ м}^2/\text{г}$ удаётся получить с использованием большого количества активных катализаторов (Табл. 1, № 3-7). Диметоксиметан также не эффективен в качестве сшивающего агента (Табл. 1, № 8-10).

В любом случае для интенсивной сшивки макропористого сополимера хлороформом или диметоксиметаном требуется большое количество активных катализаторов, что приводит к разрушению гранул сорбента. Данные системы также оказались неприменимы для структурирования гелевого сополимера с 0.7% ДВБ, сшивка которого должна привести к требуемому нанопористому сорбенту.

На рис. 2 хорошо заметно разрушение гранул при использовании CHCl_3 и диметоксиметана (Табл 1, № 5, 10). Для получения качественных гранул высокопористого сорбента на основе сополимера с 0.7% ДВБ оптимально использование 0.3 молей FeCl_3 на моль монохлордиметилового эфира, в этом случае гранулы не разрушаются и обладают высокой пористостью, $S_{Ar}\sim 1000 \text{ м}^2/\text{г}$.

Полученные на первой стадии гелевые сополимеры стирола с 0.5 – 3 мол. % ДВБ были сшиты на 50 - 400% в найденных оптимальных условиях (Табл. 2). Конверсия МХДЭ, измеренная по содержанию непрореагировавшего эфира в дихлорэтаноле после завершения реакции, для большинства сорбентов превышает 98%, а содержание остаточного хлора незначительно. Следовательно, реальная степень сшивки сорбентов близка к номинальной.

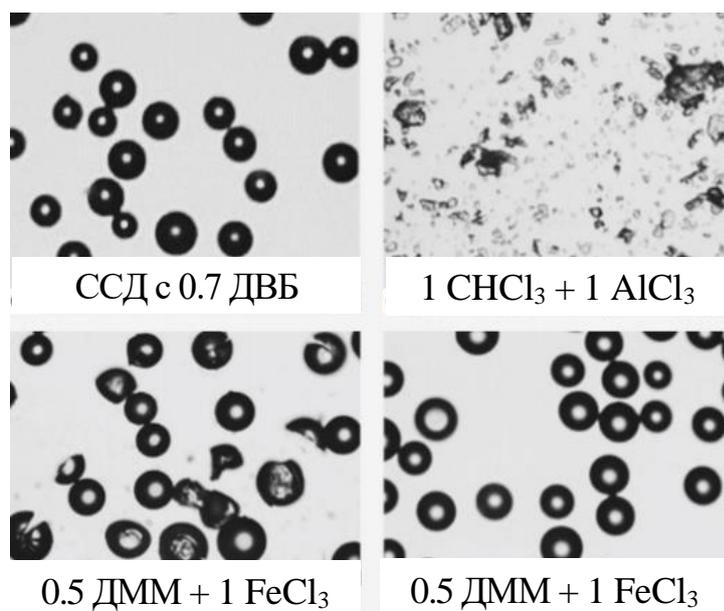


Рис. 2. Микрофотографии исходного сополимера и ССП на его основе при разных системах сшивающий реагент - катализатор

Исследование структуры сорбентов с помощью ИК-спектроскопии

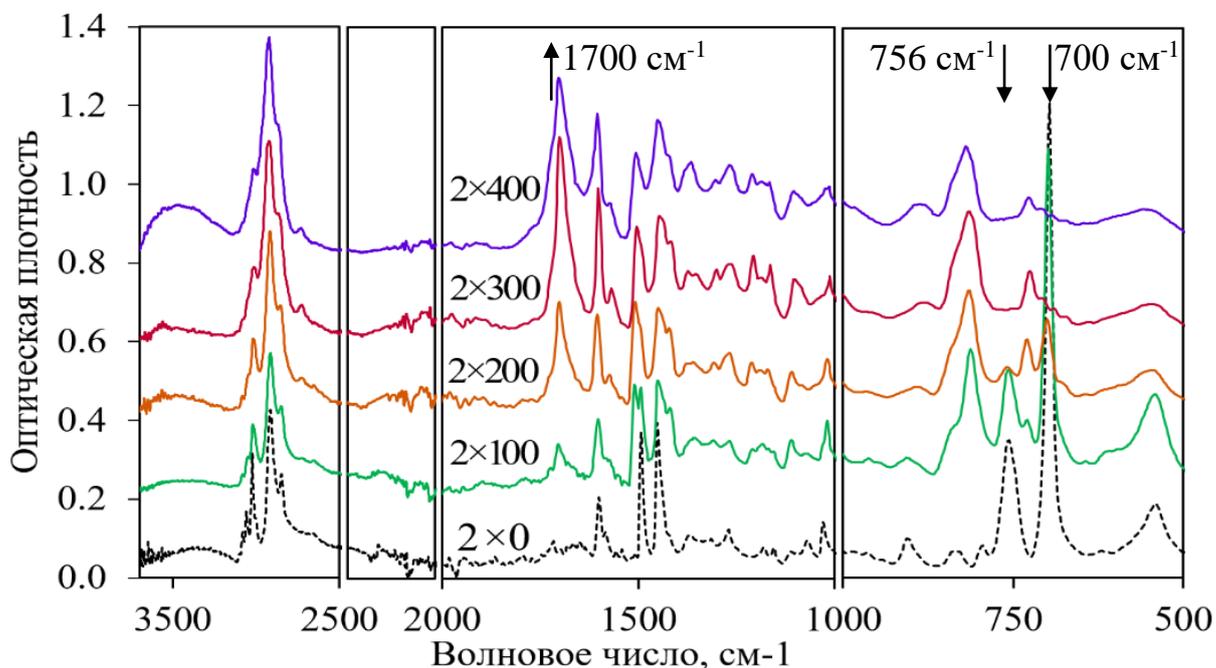


Рис. 3. ИК спектры ССП на основе сополимеров с 2% ДВБ.

При степени сшивки 100 – 200% на ИК спектре ССП (Рис. 3) присутствуют полосы 700 и 756 см^{-1} , соответствующие скелетным колебаниям незамещённых фенилов. Если среднее число введённых мостиков соответствует количеству

используемого эфира, то наличие незамещённых фенилов говорит о присутствии в структуре полимера полизамещённых фенилов, что указывает на статистический характер распределение сшивок в полимере. Также с увеличением степени сшивки растёт интенсивность специфической для ССП полосы 1700 см^{-1} .

Изучение пористости полученных сорбентов

Объём пор полимера был оценён как объём адсорбированного азота при $p/p_0 \rightarrow 1$ (W_{N_2}). Также объём пор сухого полимера был оценён исходя из кажущейся (определённой по насыпному весу) и скелетной (Ван-дер-Ваальсовой²) плотности³ (W_V). Для большинства исследованных структур W_V оказался выше W_{N_2} (Табл. 2), из-за недоступности всего меж цепного объёма для молекул азота. Однако с повышением пористости разница между значениями W_V и W_{N_2} уменьшается. Обе оценки объёма пор показывают тенденцию роста с увеличением степени дополнительной сшивки и с уменьшением содержания ДВБ в исходном гелевом сополимере.

По классификации ИЮПАК изотермы адсорбции при 77К на полученных сорбентах относятся к Ib типу (Рис. 4). Крутой подъём изотермы при низком относительном давлении говорит о наличии большого объёма микропор.

Качественная информация о пористой структуре сорбентов получена с помощью α_s метода Синга. В соответствии с α_s методом изотермы

Таблица 2. Пористость сорбентов.

Сорбент*	$N_{CA}/N_{ССД}$	$S_{N_2}, \text{ м}^2/\text{Г}$	Cl, %	$W_V, \text{ мл/Г}$	$W_{N_2}, \text{ мл/Г}$
0.5×100	0.5	700	0.6	0.53	0.46
0.5×200	1	1150	-	0.85	0.83
0.7×200	1	1100	2.0	0.67	0.66
1×100	0.5	800	0.7	0.53	0.41
1×200	1	1050	1.8	0.62	0.61
2×50	0.33	250	0.2	0.44	0.15
2×100	0.5	610	0.9	0.51	0.35
2×200	1	900	2.3	0.54	0.49
2×300	1.5	1020	2.7	0.57	0.53
2×400	2	870	3.2	0.56	0.48
3×100	0.5	450	1	0.46	0.24
3×200	1	850	2.4	0.52	0.45

$N_{CA}/N_{ССД}$ – моль СА на основомоль ССД

*Сорбент зашифрован как:

%мол. ДВБ в ССП × степень втор. сшивки, X%

² Аскадский А.А., Матвеев Ю.И. Химическое строение и физические свойства полимеров. Москва: Химия, 1983. 248 р.

³ $W = \rho_{app}^{-1} - \rho_m^{-1}$: ρ_{app} - кажущаяся плотность, ρ_m – истинная

были нормированы на величину адсорбции при относительном давлении 0.4. Относительное расположение нормированных изотерм не зависит ни от закона адсорбции, ни от суммарного объёма пор, а определяется только адсорбционным потенциалом (Рис. 4).

С повышением содержания ДВБ при постоянной степени сшивки крутизна (выпуклость к оси Y) нормированной изотермы в области низкого давления растёт (Рис. 4А), т.е. увеличивается адсорбционный потенциал. Так как эти сорбенты обладают сходной химической структурой, то увеличение потенциала говорит об уменьшении среднего размера пор (по мере увеличения доли ДВБ в исходном сополимере).

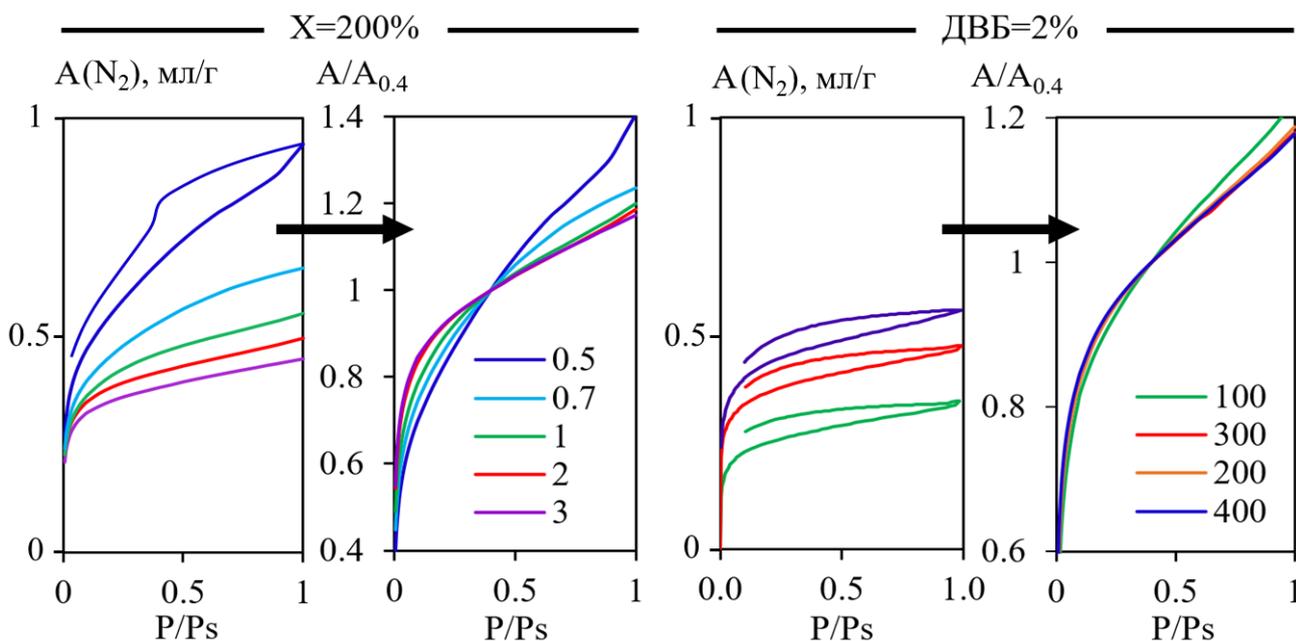


Рис. 4. Изотермы адсорбции азота и нормированные изотермы при 77 К.

Нормированные изотермы сорбентов, синтезированных на основе форполимера с 2% ДВБ и имеющих разную степень вторичной сшивки, в целом аффинны, что указывает на схожесть адсорбционного потенциала. Однако вывод о независимости размера пор от степени вторичной сшивки сделать нельзя, т.к. в этом ряду уровень взаимодействия азота с сорбентом может быть разным из-за разного числа заместителей в ароматических ядрах сорбента.

Рассчитанная из изотермы адсорбции азота по методу БЭТ удельная поверхность (S_{N_2}) при постоянной степени дополнительной сшивки уменьшается с ростом содержания ДВБ в исходном сополимере. Если один и тот-же исходный

сополимер сшивать разным количеством МХДЭ, то при повышении степени сшивки от 50% до 300% S_{N_2} увеличивается, но затем уменьшается вместе с снижением объёма пор при увеличении степени сшивки до 400%.

Заметим, что величины S_{N_2} сухого сорбента не могут быть непосредственно использованы для объяснения сорбционных свойствах набухающих в растворителе сорбентов.

Закономерности набухания полученных сорбентов

Синтезированные сверхсшитые сорбенты способны набухать в органических растворителях и воде (Рис. 5А). Весовым методом измеряли массу поглощённого растворителя и рассчитывали его объём, который являлся оценкой объёма пор полимера в набухом состоянии (Рис. 5Б). Результаты двух способов измерения согласуются, так как увеличение объёма полимерных частиц меняется подобно увеличению объёма пор при набухании (стрелки Рис.5Б).

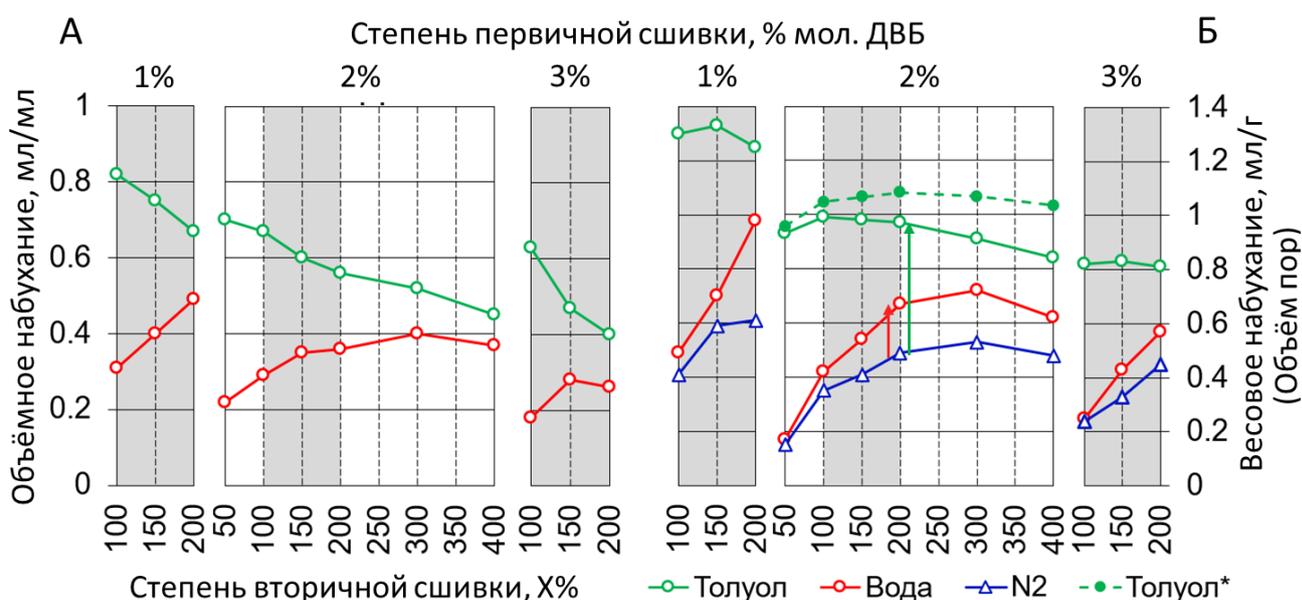


Рис. 5. Степень набухания сверхсшитых сеток, измеренная объёмным⁴ (А) и весовым⁵ (Б) методом. Для сравнения приведена зависимость максимального объёма поглощённого N_2 сухим полимером.

* Набухание, пересчитанное на массу исходного сополимера.

⁴ Степень объёмного набухания = $(V_s - V_d)/V_d$, где V_s – объём набухшего полимера, V_d – объём сухого.

⁵ 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.

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 полимере⁶.

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.

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. свёрхсшитая сетка уже на ранних стадиях формирования становится очень жёсткой, и дальнейшее введение сшивок мало влияет на её конечный объём.

⁶ Davankov V.A., Tsyurupa M.P. Macronet isoporous styrene copolymers: Unusual structure and properties // *Die Angew. Makromol. Chemie.* 1980. Vol. 91, № 1. P. 127–142.
Davankov V. A., Tsyurupa M. P. Hypercrosslinked polymeric networks and adsorbing materials: synthesis, properties, structure, and applications / Elsevier, 2011. 648 с

Исследование сорбционных свойств в статических условиях

Все эксперименты статической сорбции проводили в одинаковых условиях при комнатной температуре, встряхивая сосуд с 80 мг сорбента и 10 мл раствора собрата в течение 4 часов. Была изучена сорбция человеческого сывороточного альбумина (ЧСА, $d \sim 80 \text{ \AA}$), как основного белкового компонента крови, и цитохрома С ($d \sim 35 \text{ \AA}$), как модели малых белков крови. Сверхсшитые сетки, полученные на основе сополимеров с 0.5 и 0.7% ДВБ, т.е. имеющие самую рыхлую структуру, хорошо сорбируют небольшой Цитохром С, но сорбируют лишь незначительное количество ЧСА (Табл. 3). Следует отметить, что сорбент 0.7×100, сорбирует гораздо большее количество Цитохрома С, чем сорбент с большей степенью дополнительной сшивки 0.7×200, что говорит о тенденции к уменьшению размера пор сольватированного полимера с увеличением степени вторичной сшивки, несмотря на рост общего объема пор.

Для сравнения синтезированных сеток с существующими коммерческими сорбентами аналогичная сорбция была выполнена на бипористом MN200, который содержит макро и микропоры, и на MN270, который позиционируется производителем как микропористый. Макропоры MN200 удерживают как цитохром С, так и альбумин. “Микропористый” MN270 поглощает 44% Цитохрома С и 5% крупного ЧСА, что говорит о наличии в структуре мезопор, доступных для белков, а значит, оба промышленных сорбента не являются RAM.

Таблица 3. Сорбция, %, белков и низкомолекулярных соединений.

	М ×10 ² г/моль	MN200	MN270	0.5×100	0.5×200	0.7×100	0.7×200	1×100	1×200	2×100	2×200	2×400	3×100	3×200
ЧСА*	650	89	5	9	4	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Цитохром С*	120	99	44	98	65	96	25	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Витамин В12*	14	80	67	94	>99	99	>99	95	>99	87	97	59	33	78
Трентал**	2.8	95	99	-	>99	-	-	99	>99	98	99	95	87	99
Витамин В6**	2.0	-	59	-	54	-	-	57	55	47	56	57	47	49
Витамин С**	1.8	67	37	-	35	-	-	34	34	33	34	45	36	37

Серым выделены ячейки, где сорбция < 60% относительно сорбента 0.5×200

* С = 0.1 вес. %; ** С = 10⁻² М

Разрабатываемый RAM-сорбент должен хорошо удерживать разнообразные молекулы метаболома во всем диапазоне их молекулярного веса ($M < 1500$ г/моль). Практически все сорбенты, кроме 2×400 и 3×100 , хорошо сорбируют крупный цианокобаламин В12, $\geq 80\%$ (Табл. 3). Сорбенты 2×400 и 3×100 сорбируют В12 значительно хуже, вероятно из-за малого размера пор.

Все сорбенты практически полностью сорбируют пентоксифиллин (сосудистый препарат Трентал), более 95% (>211 мг/г), что говорит о высокой доступности пор полученных сорбентов для молекул массой ~ 300 г/моль. Пиридоксин (Витамин В6) 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 прекурсоре, и растёт с увеличением степени сшивки. Сорбция аскорбиновой кислоты ($\text{LogP} = -1.85$) в этих условиях ещё ниже, и примерно одинакова для всех сорбентов, 33-40%. Из статического сорбционного эксперимента можно заключить, что наиболее перспективны сверхсшитые RAM на основе сополимера с 2% ДВБ, они не поглощают белки, но сорбируют разнообразные аналиты, в т.ч. достаточно крупный витамин В12.

Сорбция на ССП из водных растворов зависит от гидрофобности сорбатов. На Рис. 6 представлена зависимость десятичного логарифма коэффициента сорбционного распределения различных сорбатов от величины их гидрофобности (LogP). Сорбция на полимере 2×200 коррелирует с гидрофобностью сорбатов, а тангенс угла наклона этой зависимости меньше единицы, что указывает на дополнительное к гидрофобному взаимодействие сорбат-сорбент.

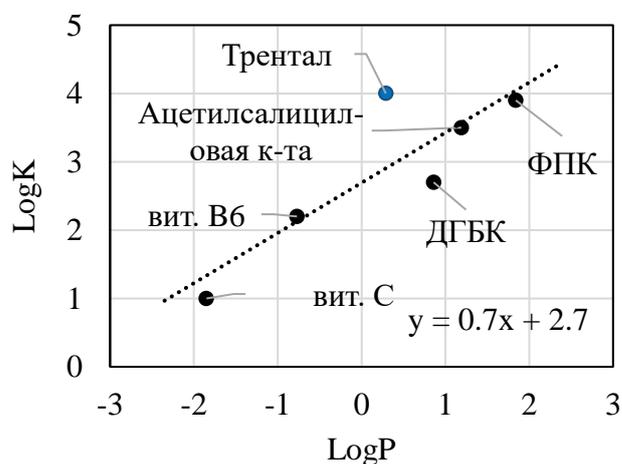


Рис. 6. Зависимость коэффициента распределения для молекулярной формы сорбата. $C_0 = 0.5$ г/л.

Изучение сорбции фенолкарбоновых кислот в статических условиях

Определение ФКК в сыворотке крови является трудной практической задачей. В данной работе была изучена твёрдофазная экстракция семи кислот, 4 из которых являются маркёрами сепсиса (Рис. 7. подчёркнуты). Результаты совместной сорбции шести ФКК в статических условиях из буферного раствора рН 3, содержащего кислоты в одинаковых концентрациях, приведены в Табл. 4.

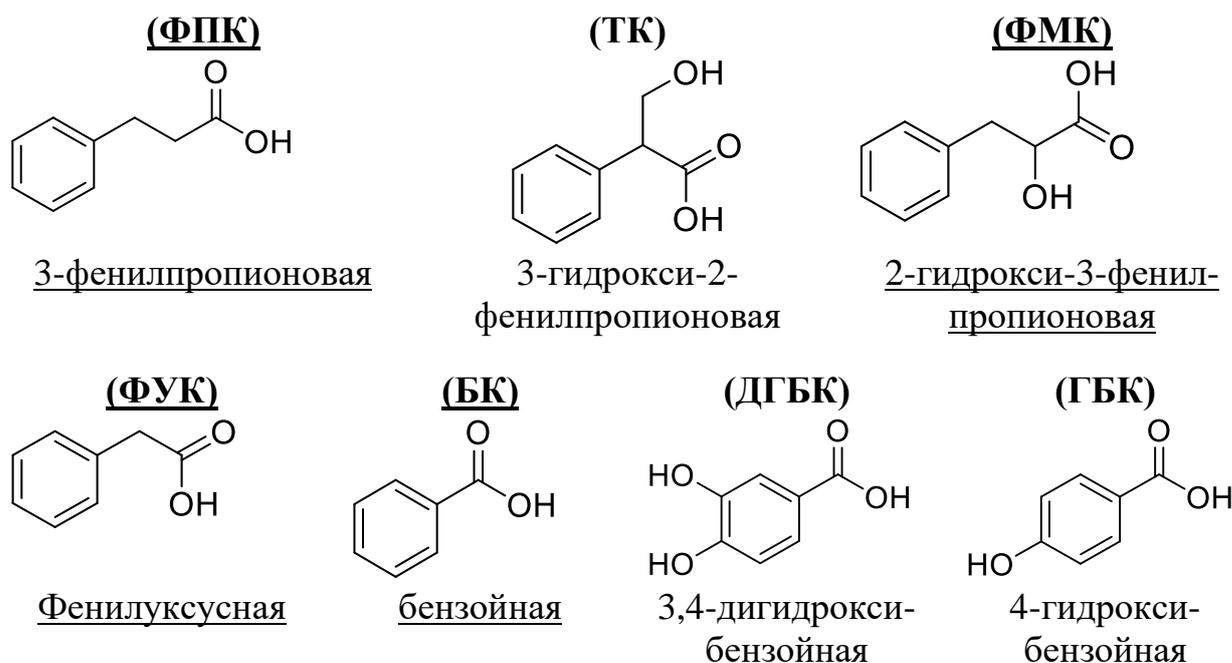


Рис. 7. Список определяемых в работе фенолкарбоновых кислот.

Сорбенты 1×100, 2×100 - 2×300 способны поглощать из модельной смеси кислот в этих условиях более 99% гидрофобной 3-фенилпропионовой кислоты. Поглощение наиболее гидрофильной, 3,4-дигидроксибензойной кислоты превышает 77%.

На Рис. 8. результаты этого сорбционного эксперимента представлены как “нормированный коэффициент весового распределения”: $(\text{Log}K - \text{Log}P) / \text{Log}K^7$, эта величина в первом приближении пропорциональна доле не гидрофобной составляющей в общем сорбционном потенциале. Нормированный коэффициент распределения тем выше, чем больше полярных заместителей в ароматическом ядре, что согласуется с известной склонностью сверхсшитого сорбента к π - π

⁷Коэффициент весового распределения сорбата в системе сорбент-раствор $K = (A/m_c) / C$ [мл/г], где A - сорбция мг, m_c - масса сорбента г, C - концентрация вещества в растворе мг/мл. P - коэффициент распределения сорбата в системе октанол - вода.

взаимодействиям с переносом заряда. Об усилении вклада не гидрофобного взаимодействия при увеличении числа замещений в ароматических ядрах сверхсшитой сетки свидетельствует рост удерживания гидрофильной ДГБК, и снижение удерживания гидрофобной ФПК в этом ряду. При этом сорбенты 1×200 и 2×200 с различной пористостью демонстрируют аналогичную сорбцию, следовательно, наблюдаемая зависимость объясняется именно химической структурой сорбента, а не удельной поверхностью или объёмом пор.

Таблица 4. Сорбция ФКК, %, из смешанного раствора, $C=5 \times 10^{-4}$ М.

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

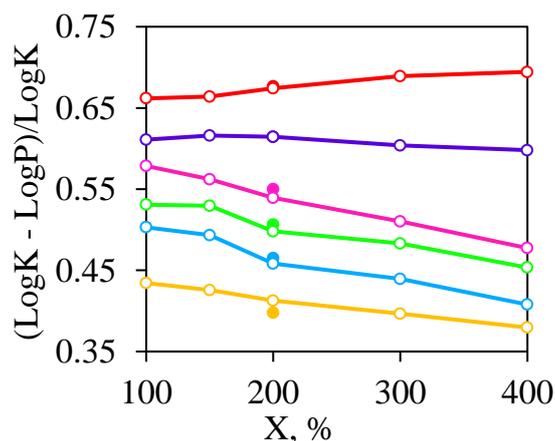


Рис. 8. Зависимость сорбции ФКК от степени сшивки сорбента. Цвета соответствуют Табл. 4.

В табл. 5 приведены результаты эксперимента по последовательной сорбции и десорбции ДГБК в статических условиях. Сорбция является полностью обратимой, а степень извлечения ($R=S \times D$) для всех сорбентов варьируется от 77 до 84%. В случае не РАМ-сорбентов, MN270 и 1×100, экстракция кислоты снижается в присутствии ЧСА, а для остальных сорбентов, не поглощающих альбумин, эффективность экстракции не изменяется в присутствии белка.

Таблица 5. Сорбция (S%), десорбция (D%) и извлечение (R%), ДГБК из водного и белкового ($C_{\text{ЧСА}}=40$ г/л) растворов.

Раствор Сорбент	Водный			+ЧСА
	S, %	D, %	R, %	R, %
MN-270	85	95	81	74
1×100	83	99	83	70
1×200	87	95	83	81
2×100	81	97	79	74
2×200	85	97	83	83
3×100	79	98	78	77
3×200	86	95	81	82

Сорбция из 10 мл 10^{-4} М раствора ДГБК с рН 3. Десорбция 500 мкл подщелоченного метанола.

Изучение сорбции фенолкарбоновых кислот в динамических условиях

Сорбенты по 30 мг были упакованы в небольшие патроны оригинальной конструкции ($id = 4$ мм), совместимые с разъёмом *Luer*. На Рис. 9 представлены кривые проскока самой гидрофильной (ДГБК) и самой гидрофобной (ФПК) кислоты среди исследуемых. Объём проскока (V_B) гидрофильной ДГБК постепенно увеличивается от 1,6 до 12,6 мл при увеличении плотности сшивки сетки ССП со 100 до 400% (Рис. 9. и Табл. 6). Объём проскока ФПК в тех же условиях возрастает с 54 до 78 мл при повышении степени сшивки со 100% до 200%, но дальнейшее повышение степени сшивки до 400% приводит к сильному падению объёма проскока до 43 мл.

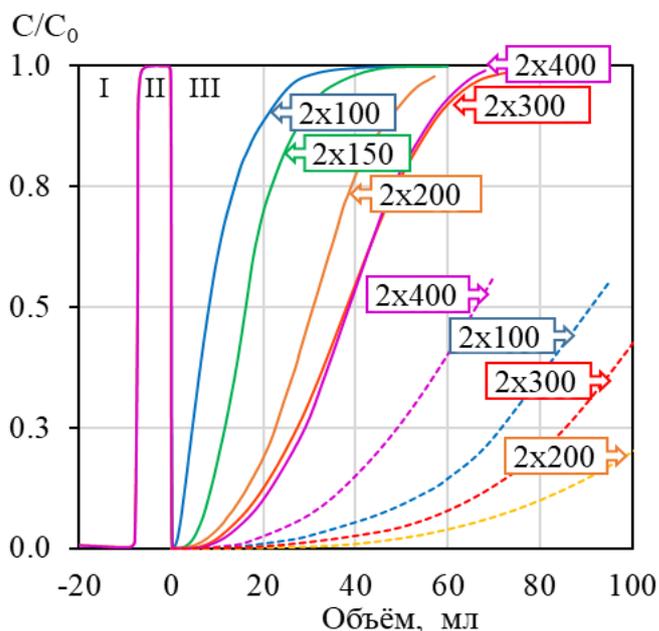


Рис. 9. Кривые проскока

5×10^{-5} М ДГБК (сплошные линии) и 5×10^{-4} М ФПК (пунктирные линии) из подкисленного раствора pH 4. Скорость потока 0.5 мл/мин. Зона I – уравнивание патрона базовым раствором pH 4 без добавления ФПК; зона II – раствор фенолпропионовой кислоты, подаваемый напрямую в детектор; зона III – подключение патрона и запись кривой проскока.

Противоположные тенденции изменения V_B для гидрофильной и гидрофобной кислоты можно объяснить тем фактом, что сорбция на микропористом полимере определяется объёмом пор и уровнем взаимодействия сорбент-сорбат. Сорбция полярной ДГБК мала (< 11.1 мг/г), и её удерживание увеличивается с ростом степени вторичной сшивки, т.к. в этом ряду растёт набухание (объём пор) в воде W_{H_2O} и сила взаимодействия полярной кислоты с сеткой сорбента. Сорбция ФПК в этих условиях высока (330 мг/г), в этом случае сетка может набухать (о чём говорит значительное увеличение противодавления патрона), а следовательно удерживание этой кислоты будет зависеть не столько от W_{H_2O} , а сколько от предельного объёма пор W_{Tot} .

Табл. 6. Результаты сорбционного эксперимента в динамических условиях.

	Сорбенты	2×100	2×150	2×200	2×300	2×400
ДГБК 5×10 ⁻⁵ М	V _B , мЛ (V _B /V _{cart})	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 , мкл (V _B /V _D)	230 (7)	210 (27)	160 (59)	180 (64)	240 (53)
ФПК*	V _B , мЛ (V _B /V _{cart})	45 (780)	62 (870)	78 (1000)	65 (750)	43(570)
ФПК 5×10 ⁻⁴ М	V _B , мЛ (V _B /V _{cart})	31 (449)		55(733)	39(400)	20(276)
	V _D , мкл (V _B /V _D)	240 (129)		250 (220)	300 (130)	340 (59)
	A _{max} , мг/г	229		331	267	166

* концентрация ФПК 5×10⁻⁵М

Десорбцию ФПК осуществляли метанолом с добавлением концентрированного водного аммиака (2 об. %. Десорбция ДГБК на 99% требует 230-160 мкл элюента (Табл. 6, V_D), а для десорбции ФПК требуется 240-340 мкл, т.е. эта кислота удерживается сильнее. Сорбент 2×200 показывает потенциально наибольший коэффициент концентрирования ФКК (V_B(ДГБК) / V_D(ФПК) = 38).

Для оценки остаточного удерживания альбумина на патроне, была проведена последовательная перфузия раствора 40 г/л ЧСА через сорбент 2×200 с последующей промывкой патрона водой. На Рис. 10 изображена концентрация вымываемого с патрона ЧСА. В первой 100 мкл фракции воды концентрация ЧСА в тысячу раз меньше, чем в исходном растворе. При промывке патрона 500 мкл воды, концентрация вымываемого альбумина падает ниже 0.1 мг/л, что не мешает последующему хроматографическому анализу.

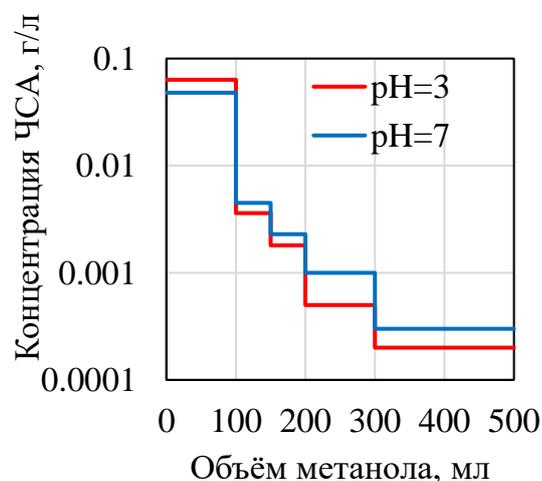


Рис. 10. Концентрация остаточного альбумина в воде.

ВЭЖХ определение фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови человека

Для определения ФКК в сыворотке крови была использована ВЭЖХ на фазе С-18 в сочетании с градиентным элюированием. Детектирование осуществляли с помощью диодноматричного детектора (ДМД), что позволило подтвердить

отнесение хроматографических пиков. На Рис. 11D изображена хроматограмма прямой инъекции разбавленной в 20 раз сыворотки крови донора. Образец сыворотки содержит множество компонентов, интерферирующих с ФКК, что делает невозможным прямое определение маркёров в нативной сыворотке с помощью ВЭЖХ.

Была разработана процедура ТФЭ, включающая получение 2 мл сыворотки из крови, её подкисление и разбавление в два раза с последующей перфузией пробы через микропатрон с сорбентом 2×200. После этого патрон промывали подкисленной водой (2×0.5 мл, pH 3), сушили в токе воздуха, затем ФКК элюировали 250 мкл подщелочённого метанола.

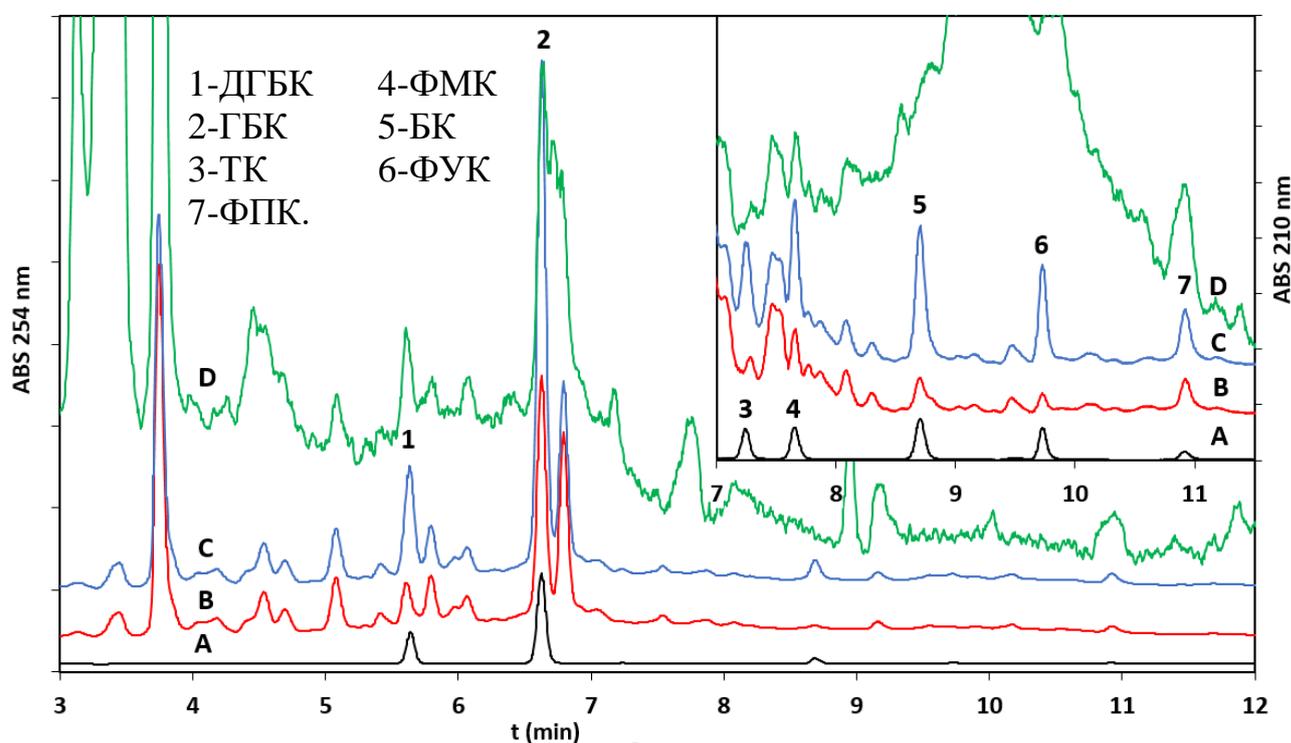


Рис. 11. Хроматограммы А) эталонного 1×10^{-5} М раствора ФКК; В) метанольного экстракта сыворотки крови; С) метанольного экстракта сыворотки крови с добавкой ФКК ($+5 \times 10^{-6}$ М); D) прямой инъекции разбавленной сыворотки крови. Колонка С-18 250×4 мм, градиент: элюент А (H₂O : ТФУ 1 : 0.001 об./об.), В (АСN), 10→70% за 10 минут, 1 мл/мин.

На Рис. 11В изображены хроматограммы экстрактов сыворотки крови ($\lambda = 206$ и 254 нм). Видно, что выделенный экстракт очищен не только от ЧСА и других белков, но и от многих других мешающих компонентов. Пики ФКК надёжно разрешены, что подтверждается сравнением УФ-спектров хроматограммы

эталонного раствора ФКК и хроматограммы экстракта сыворотки крови (Рис. 12).

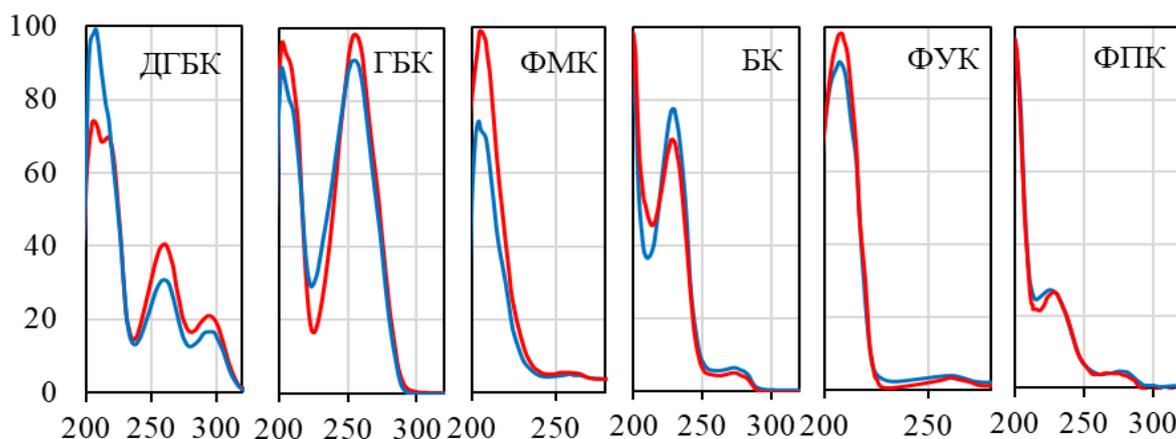


Рис. 12. Сравнение УФ спектров хроматографических пиков эталонного раствора ФКК (красная линия) и экстракта сыворотки крови (синяя линия).

Предварительную концентрацию кислот в экстракте определили по площади хроматографических пиков, используя калибровку по чистым растворам ФКК (Табл. 7 “найдено”). Линейная регрессия “введено-найдено” позволяет определить: стандартную ошибку анализа, степень извлечения и действительную концентрацию ФКК в сыворотке крови Табл. 7.

Табл. 7. Параметры разработанного анализа. В качестве референсных концентраций выступают значения из Human Metabolome Database⁸ (HMDB).

ФКК	Добавлено ФКК, $\times 10^{-7}$ М			R, % (SE)	LOD, $\times 10^{-7}$ М	LOQ, $\times 10^{-7}$ М	ФКК, $\times 10^{-7}$ М	
	0, (N=3) Найдено	5, (N=2) ФКК, $\times 10^{-7}$ М (SD)	20, (N=2)				Эта работа	HMDB
ДГБК	4.2 (0.5)	8.3 (0.6)	23.1 (0.5)	95 (3)	1.9	6.2	3.3-4.9	2.3
ГБК	14.3 (0.5)	18.1 (0.7)	33.6 (0.9)	97 (4)	2.5	8.5	12-15	25
ТК	1.5 (0.4)	6.2 (0.9)	20.1 (0.4)	93 (2)	1.7	5.9	следы	следы
ФМК	4.0 (0.6)	8.1 (0.1)	23.4 (1.1)	97 (3)	2.2	7.4	2.8-5.0	6.3
БК	2.9 (0.2)	7.9 (0.5)	22.5 (1.6)	98 (5)	2.4	8.1	2.3-3.3	2.7
ФУК	3.9 (0.2)	8.5 (0.4)	23.6 (0.6)	99 (2)	1.2	3.8	3.4-4.3	5.3
ФПК	7.7 (0.6)	12.8 (0.4)	27.0 (1.0)	96 (3)	1.9	6.3	6.3-8.5	5.5

Разработанная процедура ТФЭ обеспечивает абсолютную степень извлечения ФКК более 93%. Кроме того, осуществленный анализ ТФЭ-ВЭЖХ-

⁸ <https://hmdb.ca/>

ДМД позволил определить концентрации ФКК в крови здорового донора с достаточной для диагностики сепсиса точностью. Найденные концентрации кислот (Табл. 7) хорошо согласуются с результатами независимых измерений методом газовой хроматографии, которые приведены в базе данных человеческого метаболома (HMDB).

Основные результаты и выводы

- Впервые разработан сверхсшитый гидрофобный полистирольный сорбент ограниченного доступа (Restricted access material) для твердофазной 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 ($M=12$ 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.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

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. – Т.17 – №2. – 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. – Т.60 – №2. – 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. – Vol.41 – №16. – 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. – Vol.42 – №16. – 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" 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. 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. Сборник тезисов. – 2018. С. 25 – 26