



УДК 544.022.554 + 544.723.212; 66.095.262-911.48

Синтез и адсорбционные свойства сорбентов ограниченного доступа на базе сверхсшитого полистирола

Попов А.Ю., Блинникова З.К., Цюрупа М.П., Даванков В.А.

ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Поступила в редакцию 31.01.2017 г.

Разработаны особые условия суспензионной сополимеризации стирола с дивинилбензолом, позволяющие уменьшить размер гранул до 30-60 мкм и существенно сузить распределение гранул по диаметру. Полученный в этих условиях сополимер с 0.7% дивинилбензола был сшит монохлордиметилэфиром до степени сшивания 100 и 200%. Сорбенты в статических условиях извлекают 83-95% фенолкарбоновых кислот из водного разбавленного подкисленного раствора. Десорбция кислот щелочным метанолом близка к 100%. Сорбенты не поглощают альбумин. Принадлежность сорбентов к классу материалов ограниченного доступа продемонстрирована также на примере полного разделения методом ВЭЖХ смеси плазмы, лекарства Амперозид, его метаболита и родственных соединений, при этом белки плазмы не удерживались и выходили с мертвым объемом.

Ключевые слова: материал ограниченного доступа, сверхсшитый полистирол, суспензионная сополимеризация, адсорбция, фенолкарбоновые кислоты.

Synthesis and adsorption properties of restricted access sorbents based on hypercrosslinked polystyrene

Popov A.Yu., Blinnikova Z.K., Tsyurupa M.P., Davankov V.A.

Nesmeyanov-Institute of Organoelement Compounds RAS, Moscow

Currently solid-phase extraction (SPE) is actively employed to analyze medicinal compounds both in waste waters and physiological liquids, mostly plasma and serum. Industrial hypercrosslinked polystyrene sorbents used in the analyses, in most cases have a wide particle size distribution of 40 to 14 μ . They provide high recoveries of medicines thereby increasing the accuracy of analyses. However, the modern tendency to decrease analyses time and miniaturize embodiment requires the application of sorbents with spherical beads of 30-60 μ and sufficiently narrow bead size distribution. It proved to be possible to prepare such beads by suspension copolymerization of styrene and divinylbenzene on the implementation of some specific conditions. First of all, it should be noted that not only an intensive agitation of reaction mixture, but also the type of the stirrer (we use a centrifugal one), the form of vessel and the ratio of their sizes are very important. To avoid the formation of particulate, it is necessary to minimize the volume of a free space over the reaction mixture and realize its appropriate heating. It is also important to eliminate any vibration of equipment. Taking into account all aforementioned requirements and using the speed of stirrer of 1750 rpm, we prepared styrene-0.7% divinylbenzene copolymer with desirable type of beads. Then, the copolymer was crosslinked with monochlorodimethyl ether to 100 and 200% crosslinking density via Friedel-Crafts reaction. The resulting sorbents possessed high specific inner surface of 1200 and 1500 m^2/g , respectively. Under static conditions, 0.125 g sorbent extracts 83 to 95% phenylcarboxylic acids (markers of sepsis) from 10 mL aqueous 10^{-4} M solution acidified to pH 4. The sorbent with 100% bridges absorbs 95% of globular protein Cytochrome C from 0.88 g/L solution in phosphate buffer with pH 6.86. However, the increase in crosslinking degree till 200% diminishes the adsorption capacity down to 25%. Importantly, both sorbents do not take up the major blood protein, albumin. This fact allows the assignment of hypercrosslinked sorbents to the family of re-

stricted access materials. However, contrary to well-known materials based on silica gels, the hypercrosslinked polystyrene is more universal and its synthesis is simpler. Direct chromatographic experiment showed that under HPLC conditions, the column packed with a hypercrosslinked polystyrene sorbent is capable of separating into the individual components the mixture of plasma, the drug Amperozide, its metabolite and related compounds, at that plasma is not retained by the sorbent; it leaves the column with a void volume.

Keywords: restricted access materials, hypercrosslinked polystyrene, suspension copolymerization, adsorption, phenylcarboxylic acids.

Введение

В настоящее время в медицине, ветеринарии, спорте очень востребованы быстрые, точные и воспроизводимые методы количественного анализа лекарственных веществ в таких сложных по составу физиологических жидкостях, как плазма и сыворотка крови, моча, слюна, молоко или лимфа. Такие методы необходимы также для анализа пищевых продуктов и напитков. Основная проблема этих анализов состоит в том, что малые молекулы анализируемых лекарств присутствуют в матрице в очень низкой концентрации на фоне высокой концентрации крупных молекул белков, ферментов и ДНК. Высокомолекулярные соединения сильно осложняют применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или газовой хроматографии для идентификации и количественного определения целевых соединений. Поэтому прежде чем использовать хроматографические методы, образец подвергается многостадийной пробоподготовке. Она включает удаление белков, центрифугирование, жидкость-жидкостную экстракцию, упаривание растворителя досуха, растворение остатка в подвижной фазе (если для анализа используется ВЭЖХ), фильтрование раствора и, наконец, ввод аликвоты раствора в аналитическую хроматографическую колонку. Очевидно, однако, чем больше манипуляций прделывается с образцом, тем выше вероятность его дополнительного загрязнения или частичной потери летучих компонентов. Кроме того, целевые компоненты могут теряться в процессе осаждение белков физиологического раствора.

Чтобы устранить указанные недостатки, Пинкертон [1] предложил новую стационарную фазу для ВЭЖХ, которую он назвал «материал ограниченного доступа» (Restricted access material, RAM). Пинкертон модифицировал 5 мкм частицы пористого силикагеля с порами 80-100 Å таким образом, что внешняя поверхность этих частиц стала гидрофильной (она была покрыта OH или NH₂ группами), тогда как стенки внутренних пор приобрели гидрофобные свойства. Крупные молекулы типа белков или ферментов не удерживаются на внешней поверхности частиц и не могут диффундировать внутрь частицы по стерическим причинам. Поэтому они выходят из колонки с межгранульным объемом. Напротив, малые молекулы лекарств легко мигрируют в поры и разделяются там на индивидуальные компоненты по обращено-фазовому механизму. Они выходят из колонки позднее белков плазмы или сыворотки. В настоящее время разработаны разнообразные способы придания гидрофильных свойств внешней поверхности силикагеля и иных (чаще всего гидрофобных) свойств внутренней поверхности пор, и фирма Regis выпускает многие типы RAM колонок [2]. Надо отметить, однако, что синтез RAM многостадийен и трудоемок.

Сверхсшитый полистирол микропористой структуры также можно рассматривать как материал ограниченного доступа, поскольку поры в сорбентах в несколько раз меньше пор в силикагельных RAM, они не превышают 1.5-3 нм в диаметре. Несомненно, сверхсшитый полистирол как сорбент ограниченного доступа интересен в качестве стационарной фазы для ВЭЖХ, но он также представляет интерес как RAM-сорбент для прекоцентрирования лекарств и других малых молекул при ана-

лизе физиологических жидкостей с использованием твердофазной экстракции (ТФЭ). Эффективность применения промышленных сверхсшитых полистирольных сорбентов с размером частиц, как правило, 40-140 мкм для концентрирования микропримесей разнообразных органических соединений давно доказана [3,4]. Тем не менее, современная тенденция к уменьшению времени анализа и связанной с этим миниатюризации аппаратного оформления ТФЭ ставит перед исследователями задачу разработки простого метода синтеза сферических гранул сорбентов диаметром порядка 30-60 мкм и достаточно узким распределением по размеру гранул. Такие частицы, с одной стороны, не должны создавать значительного сопротивления потоку жидкости, а с другой стороны, частицы малого размера должны способствовать хорошей кинетике процессов адсорбции и десорбции анализируемых соединений.

В данной статье обсуждаются условия проведения суспензионной сополимеризации стирола с ДВБ, позволяющие получить желаемые гранулы, а также способность сверхсшитых сорбентов на их основе обратимо поглощать фенолкарбоновые кислоты, которые являются маркерами сепсиса.

Эксперимент

Синтез сополимера стирола с 0.7% дивинилбензола. 0.47 г стабилизатора суспензии Gashenol GM-14 (поливиниловый спирт) растворяют в 140 см³ воды при 60°C и перемешивании. К раствору добавляют 4.62 г NaCl, 0.0252 г K₂Cr₂O₇ и органическую фазу, представляющую собой раствор 20 см³ стирола, 0.32 см³ 80% дивинилбензола и 0.73 г 75% перекиси бензоила. Полимеризацию ведут при 80 °С в течение 8 часов при постоянной скорости перемешивания центробежной мешалкой 1750 об/мин. Образовавшиеся гранулы отфильтровывают, тщательно промывают горячей водой от стабилизатора, мокрым просевом через сито с размером ячеек 20 мкм удаляют возможную примесь мелких частиц. Гранулы переносят на фильтр, промывают ацетоном, этиловым спиртом и водой. Сушат сначала на воздухе, а затем в сушильном шкафу при 50-60°C. Выход сополимера 16.1 г (87.5%)

Синтезы монохлордиметилового эфира и монодисперсных микросферических гранул сополимера стирола с 0.5% ДВБ подробно описаны в [5].

Сшивание сополимеров стирола с ДВБ проводили аналогично методике [6].

Адсорбция фенолкарбоновых кислот. 0.125 г сверхсшитого сорбента помещают в плоскодонную колбу и смачивают 0.3-0.4 см³ метанола. Затем к полимеру добавляют 10 см³ 10⁻⁴ М водного раствора фенолкарбоновой кислоты с рН 4. Смесь встряхивают в шейкере при 23 °С в течение 3 часов. Гранулы быстро отфильтровывают, концентрацию оставшейся в равновесном растворе кислоты определяют спектрофотометрическим методом на спектрофотометре UNICO 2800 UV/VIS (США). Адсорбцию рассчитывают как разницу между введенным и оставшимся количеством кислоты, отнесенную к навеске сорбента.

Адсорбцию белков, Цитохрома С и альбумина (ЧСА) изучали аналогичным образом, используя растворы с концентрацией Цитохрома С 0.877 г/дм³ и альбумина 40 г/дм³ в фосфатном буфере с рН 6.86.

Десорбция фенолкарбоновых кислот. Отфильтрованные в предыдущем эксперименте гранулы помещают в небольшую колбу, добавляют 3 см³ метанола, содержащего одну каплю концентрированного водного аммиака. Смесь энергично встряхивают вручную в течение 15 мин, гранулы отфильтровывают и концентрацию десорбированной кислоты в растворе определяют также спектрофотометрически.

Кажущуюся внутреннюю удельную поверхность (S , м²/г) сорбентов определяли методом тепловой десорбции аргона на приборе «Цвет 211» (Россия) и рассчитывали по теории БЭТ, используя уравнение Темкина, который привел уравнение БЭТ к виду, позволяющему рассчитать емкость монослоя, измеряя величину адсорбции при одном значении относительного давления сорбата.

Обсуждение результатов

Способы получения сополимеров стирола с ДВБ в виде сферических гранул хорошо известны. Эмульсионная полимеризация, осадительная полимеризация и метод зародышей позволяют получить монодисперсные микрогранулы сополимеров размером не более 10-15 мкм. Напротив, традиционный суспензионный способ проведения сополимеризации приводит к получению достаточно крупных гранул с широким разбросом по размеру от 0.1 до 1.2 мм (полученные таким способом гранулы сополимеров стирола с ДВБ используются во всем мире для крупнотоннажного синтеза ионообменных смол). Тем не менее, нам удалось значительно уменьшить размер гранул и сократить их разброс, соблюдая определенные условия суспензионной сополимеризации.

Во-первых, желательно, чтобы форма колбы была яйцевидной или цилиндрической с небольшим зазором между мешалкой и стенками колбы. В своих экспериментах мы использовали центробежную мешалку [7]. По своей форме она представляет собой полый колокольчик с четырьмя боковыми отверстиями. При вращении мешалки центробежная сила засасывает реакционную смесь внутрь и выбрасывает ее через боковые отверстия, тем самым перемешивая систему в вертикальном направлении. Но мешалка перемешивает смесь и в горизонтальном направлении. В итоге в колбе возникает интенсивное турбулентное перемешивание двухфазной системы, так необходимое для предотвращения слипания гранул.

Во-вторых, чтобы избежать образования примеси в виде очень мелких частиц, необходимо свести к минимуму свободное пространство над реакционной массой и обеспечить его прогрев при температуре реакции. В колбе не должны присутствовать никакие другие элементы оборудования, кроме мешалки. Наконец, надо полностью устранить любую вибрацию установки. Соотношение объемов водной и органической фаз не должно быть ниже 3:1, желательно использовать соотношение 5:1 или даже 7:1.

Принимая во внимание все вышесказанное и используя скорость центробежной мешалки 1750 об/мин, мы получили желаемые сферические гранулы сополимера стирола с 0.7% ДВБ. На рис. 1 приведена их микрофотография. Как видно, гранулы довольно однородны по размеру, наименьшие из них имеют диаметр 30 мкм, а размер встречающихся крупных гранул составляет 60 мкм.

Полученный сополимер был сшит монохлордиметиловым эфиром в присутствии хлорного олова до степени сшивания 100 (МИх100/0.7) и 200% (МИх200/0.7). Степень сшивки означает, что теоретически в первом случае каждые два фенильных кольца полистирольных цепей соединены одной метиленовой группой, а во втором случае – каждые два фенила соединены двумя метиленовыми группами. Оба полимера практически не содержат остаточного хлора, а в растворителе после реакции обнаружены лишь следы сшивателя. Следовательно, реальная степень сшивки полимеров близка к расчетной. Оба сорбента имеют микропористую структуру (МИ). Кажущаяся внутренняя удельная поверхность МИх100/0.7 составляет 1200 м²/г, а МИх200/0.7 – 1500 м²/г.

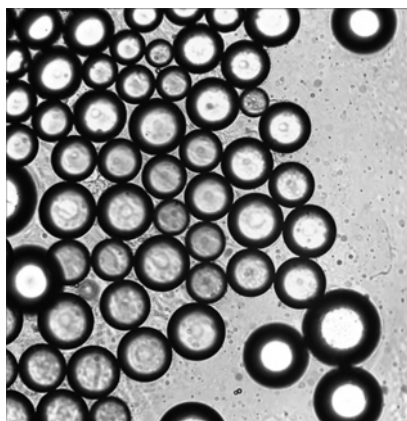


Рис. 1. Микрофотография гранул сополимера стирола с 0.7% ДВБ

Адсорбция фенолкарбоновых кислот на синтезированных сверхсшитых сорбентах исследовалась в статических условиях. Полученные результаты представлены на рис. 2. Там же приведена адсорбция фенолкарбоновых кислот на сорбенте МИх200/0.5, полученном шиванием монодисперсных 3.2 мкм микрогранул сополимера с 0.5% ДВБ а также МХДЭ на 200%. Как видно, даже в статических условиях все сорбенты извлекают из кислого водного раствора (рис. 2) от 83 до 95% фенолкарбоновых кислот и затем практически полностью отдают их при десорбции щелочным метанолом (рис. 3). Сверхсшитый сорбент МИх100/0.7 столь же хорошо поглощает малый глобулярный белок цитохром С с молекулярной массой 12 кДа и размером глобулы 3 нм, однако, сорбция его снижается всего до 25% с увеличением степени шивания полимера до 200%. Адсорбция фенолкарбоновых кислот на сорбентах с размером гранул 30-60 мкм практически не отличается от таковой на микросферических частицах сорбента МСх200/0.5. Важно, что ни один из изученных сорбентов не поглощает альбумин, основной белок крови.

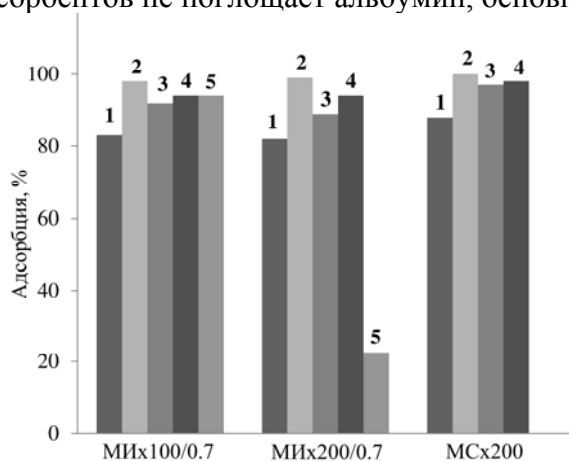


Рис. 2. Адсорбция (% от исходного) фенолкарбоновых кислот из водных растворов с концентрацией 10^{-4} М и рН 4 на сверхсшитых полистирольных сорбентах: (1) бензойная кислота, (2) 4-гидроксибензойная кислота, (3) 3,4-дигидроксибензойная кислота, (4) 3-фенилпропионовая кислота, (5) сорбция цитохрома С из фосфатного буфера с рН 6.86

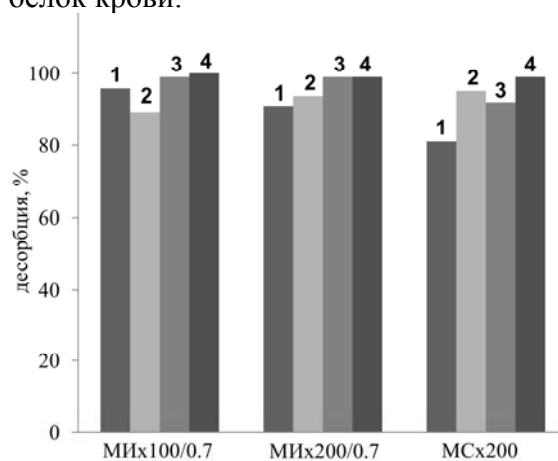


Рис. 3. Десорбция (% от поглощенного) фенолкарбоновых кислот щелочным метанолом: (1) бензойная кислота, (2) 4-гидроксибензойная кислота, (3) 3,4-дигидроксибензойная кислота, (4) 3-фенилпропионовая кислота

Помимо фенолкарбоновых кислот, сверхсшитые полистирольные сорбенты удерживают многие другие полярные и неполярные соединения. К ним относятся все приоритетные фенолы, пестициды, синтетические органические красители, хлорированные ароматические и алифатические углеводороды, алифатические кислоты, различные амины, многие лекарственные вещества - антибиотики пенициллинового ряда, сердечные препараты, трентал, N-ацтил-L-цистеин (АЦЦ), аскорбиновая кислота, санорин, фенаптин, верапамил, седуксен, преднизалон и другие [3,4,7]. Изученные соединения относятся к разным классам органических соединений, и, следовательно, сверхсшитые полистирольные сорбенты можно отнести к числу универсальных сорбентов. Это свойство принципиально отличает сверхсшитый полистирол от известных силикагельных РАМ. Селективность последних зависит от соотношения гидрофобных и гидрофильных свойств сорбента и сорбата, а потому для решения разных задач необходимо подбирать колонки, упакованные по-разному модифицированными сорбентами.

Прямым доказательством принадлежности сверхсшитого полистирола к классу материалов ограниченного доступа являются результаты следующего эксперимента [8]. Лабораторный образец сверхсшитого сорбента Стиросорб был получен сшиванием МХДЭ монодисперсных микрогранул сополимера стирола с 1% ДВБ (диаметром 2.5 мкм) до 100% степени сшивания. Малое число остаточных хлорметильных групп, находящихся главным образом на внешней поверхности гранул (где они не могли найти партнера для взаимодействия), было введено в реакцию с Трисом для некоторого повышения гидрофильности внешней поверхности гранул. Стиросорб был упакован в хроматографическую колонку размером 29x4 мм, и в нее напрямую была введена проба плазмы, содержащая лекарство Амперозид, его метаболит и родственные соединения.

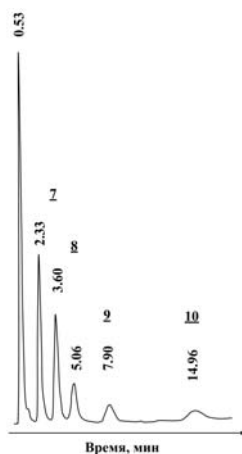


Рис. 4. Разделение беков плазмы, Амперозид (8) и родственных соединений. Колонка 29x4 мм, ТГФ/15 ммол фосфатный буфер с рН 8.2, 38/92 (об/об), скорость потока 0.5 см³/мин, детектирование 262 нм [8].

На рис. 4 показана полученная хроматограмма. Как видно, смесь была полностью разделена на индивидуальные компоненты, при этом плазма не удерживалась на поверхности гранул Стиросорба, она вышла из колонки первой с межгранульным объемом. Предварительные опыты показали, что с таким же объемом выходят также суммарные белки сыворотки и два белка, миоглобин с молекулярной массой 17800 Да и ферритин с молекулярной массой 450000 Да.

Заключение

Итак, чтобы получить гранулы сополимеров стирола с ДВБ диаметром в общем случае 30-60 мкм и малым разбросом размеров обычной суспензионной сополимеризацией, недостаточно просто увеличить интенсивность перемешивания двухфазной системы. Необходимо соблюдать ряд особых условий, к которым относятся в первую очередь тип мешалки, форма колбы и соотношение их размеров. Важно уменьшить объем свободного пространства над реакционной массой и обеспечить его прогрев. Соблюдая эти требования, нам удалось получить желаемые гранулы сополимера стирола с 0.7% ДВБ. Сополимеру была придана сверхсшитая структура путем его сшивания МХДЭ на 100 и 200%.

Анализ свойств полученных полимеров, а также свойств известных на сегодняшний день сверхсшитых полистирольных сорбентов позволяет с полным основанием относить его к сорбентам ограниченного доступа. По сравнению с известными силикагельными РАМ, сверхсшитый полистирол более универсален, так как способен удерживать широкий спектр полярных и неполярных органических соединений разных классов. Синтез сверхсшитого полистирола проще описанных синтезов РАМ. Эксперимент со Стиросорбом показал, что даже без какой бы то ни было гидрофилизации внешней поверхности его гранул, Стиросорб практически не удерживает белки. Этот факт ставит под сомнение необходимость такой процедуры. Последующие эксперименты помогут разрешить все сомнения.

Список литературы

1. Pinkerton T.C. // *J.Chromatog.* 1991. Vol. 544. pp. 13-23.
2. RAM Direct Injection Guide, Режим доступа: http://www.registech.com/Library/Catalog/RAM_2008.pdf (дата обращения 31.01.2017)
3. Davankov V.A., Tsyurupa M.P. // *Hypercrosslinked polymeric networks and adsorption materials. Comprehensive Analytical Chemistry.* Elsevier. 2011. Vol. 56. Chapter 14. pp. 523-567.
4. Дутов А.А. // *Биомедицинская хроматография.* Издательская группа Гзотар-Медиа. Москва. 2016. 311 с.
5. Tsyurupa M.P., Blinnikova Z.K., Il'in M.M., Davankov V.A. et al. // *Russian Journal of Physical Chemistry A.* 2015. Vol. 89. No 11. pp. 2064-2071.
6. Tsyurupa M.P., Blinnikova Z.K., Davankov V.A. // *Russ. J. Phys. Chem.* Vol. 84. No 10. 2010. pp. 1767-1771. DOI: 10.1134/S0036024410100146.
7. Кейл Б. Лабораторная техника в органической химии. М. Мир. 1966. 751 с.
8. Beth M., Unger K.K., Tsyurupa M.P., Davankov V.A. // *Chromatographia.* 1993. Vol. 36. pp 351-355.

References

1. Pinkerton T.C., *J.Chromatogr.*, 1991, Vol. 544, pp. 13-23.
2. RAM Direct Injection Guide, Available at: http://www.registech.com/Library/Catalog/RAM_2008.pdf (accessed 31 jan 2017)
3. Davankov V.A., Tsyurupa M.P. *Hypercrosslinked polymeric networks and adsorption materials. Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2011, Vol. 56, Chapter 14, pp. 523-567.
4. Dutov A.A. *Biomeditsinskaya khromatografiya (Biomedical chromatography)*. Izdatel'skaya gruppa Gzotar-Media, Moskva, 2016, 311 p.
5. Tsyurupa M.P., Blinnikova Z.K., Il'in M.M., Davankov V.A. et al., *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2015, Vol. 89, No 11, pp. 2064-2071.
6. Tsyurupa M.P., Blinnikova Z.K., Davankov V.A., *Russ. J. Phys. Chem.*, 2010, Vol. 84, No

10, pp. 1767-1771, DOI: 10.1134/S0036024410100146.

7. Keil B., *Laboratorni technika organické chemie*, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1963, 751 p.

Попов Александр Юриевич – аспирант лаборатории стереохимии сорбционных процессов Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Блинникова Зинаида Константиновна – к.х.н., с.н.с., лаборатории стереохимии сорбционных процессов Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Цюрупа Мария Петровна – д.х.н., в.н.с. лаборатории стереохимии сорбционных процессов Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Даванков Вадим Александрович – д.х.н., профессор, заведующий лабораторией стереохимии сорбционных процессов Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

8. Beth M., Unger K.K., Tsyurupa M.P., Davankov V.A., *Chromatographia*, 1993, Vol. 36, pp 351-355.

Popov Alexander Yu. – the postgraduate student, department of stereochemistry of sorption processes, A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow

Blinnikova Zinaida K. – Ph.D. (chemistry), senior scientific fellow department of stereochemistry of sorption processes, A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow

Tsyurupa Maria P. – Dr.sc. (chemistry), leading scientific fellow, department of stereochemistry of sorption processes, A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow. e-mail: mts@ineos.ac.ru, 8 (499) 135 79 25

Davankov Vadim A. – Dr.sc. (chemistry), professor, head of the department of stereochemistry of sorption processes, A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow