

## ХИМИЯ НЕФТИ И ОРГАНИЧЕСКИЙ КАТАЛИЗ

УДК 543.544

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НОВЫХ  
ГЕТЕРОПОВЕРХНОСТНЫХ СОРБЕНТОВ

Р.В. Копылов, П.Н. Нестеренко, А.А. Сердан, И.П. Тюленина

*(кафедра химии нефти и органического катализа)*

**Получены катионообменные сорбенты с различной плотностью покрытия внешней поверхности частиц белковыми молекулами. Изучена зависимость плотности покрытия от условий синтеза. По данным элементного анализа предложены способы расчета толщины белкового слоя и ее полуколичественной оценки по электрофоретической подвижности частиц. Исследовано влияние количества иммобилизованного белка на изменение хроматографических свойств синтезированных сорбентов.**

Гетероповерхностные сорбенты – это такие пористые частицы, в которых модифицирующий слой на внешней (видимой) поверхности по химической природе отличается от модифицирующего слоя на внутренней (невидимой) поверхности, т.е. на поверхности в порах сорбента. Возможны различные способы получения гетероповерхностных сорбентов [1]. В настоящей работе рассмотрен способ получения таких сорбентов путем экранирования поверхности частиц от контакта с белковыми молекулами анализируемой пробы. Следует отметить, что таким образом удастся получить сорбенты, модифицирующий слой которых на внутренней поверхности не отличается от обычно используемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Внешняя поверхность при этом защищена плотным экраном сшитых между собой белковых глобул, между которыми остаются «окна», через которые небольшие молекулы могут свободно проникать внутрь пор и удерживаться там в соответствии с обычными хроматографическими закономерностями.

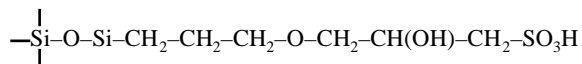
Разработка гетероповерхностных сорбентов обусловлена тем, что при анализе биологических жидкостей с прямым вводом пробы в аналитическую колонку нет необходимости предварительно освобождаться от белковых макромолекул. В случае применения традиционных сорбентов хроматографическое определение сложных органических соединений или ионов, присутствующих в пробах биологических жидкостей (крови, моче, слюне и т.д.), затруднено из-за белков, необратимо сорбирующихся на поверхности частиц и выводящих из строя хроматографическую колонку при

прямом вводе таких проб. Для преодоления таких трудностей разработаны разнообразные методики многостадийной пробоподготовки, требующей большого исходного объема пробы, подбора реагентов для высаливания, экстракции и др. процедур, что связано с большими затратами времени. Все вышеперечисленное снижает точность результатов и существенно повышает стоимость анализов. Примеры такого подхода к анализу сыворотки крови и слюны приведены в работах [2–5]. Частичным решением проблемы является использование предколонок для защиты основной разделяющей хроматографической колонки при прямом вводе проб [6–7]. Однако в этом случае требуется регулярная замена предколонок, поэтому наиболее перспективным решением проблемы прямого ввода проб, содержащих сильно различающиеся по размерам молекулы, по-видимому, является использование гетероповерхностных сорбентов [8].

В нашей лаборатории разработана более простая методика синтеза гетероповерхностного сорбента с использованием химической «обшивки» обращенно-фазовых сорбентов молекулами сывороточного альбумина человека для создания специальной внешней поверхности. Полученный по этой технологии сорбент использован для определения лекарственных препаратов в плазме крови больных [9]. Данная работа посвящена разработке специального класса гетероповерхностных ионообменных сорбентов на основе силикагеля для определения ионов в биологических жидкостях методом высокоэффективной ионной хроматографии.

**Экспериментальная часть**

Все изученные сорбенты синтезировали на основе ионообменника «Диасорб-130-Сульф» с размером частиц 10 мкм (АО «БиоХимМак», Россия), имеющего следующую структуру привитых молекул



Для синтеза в пол-литровую колбу помещали при постоянном перемешивании 5 г исходного сорбента в 200 мл 3 мМ фосфатного буферного раствора (рН 4.5 или 7.3), содержащего различное количество бычьего сывороточного альбумина (БСА) или белков плазмы крови человека (таблица). Межмолекулярную «сшивку» сорбированного на носителе белка проводили через 10 ч после начала реакции, добавляя в раствор с интервалом в 1 ч 5 порций по 1 мл 4%-го водного раствора глутарового альдегида, обычно используемого для внутри- и межмолекулярной сшивки белков [10–11]. Спустя 5 ч после фильтрования и тщательной промывки 1 л 3мМ фосфатного буферного раствора (рН 4.5), модифицирование сорбента повторяли, но перед повторным фильтрованием в реакционную смесь в течение часа небольшими порциями добавляли 300 мг борогидрида натрия для восстановления непрореагировавших альдегидных групп и образования алдиминных связей [12]. Окончательно сорбент промывали на фильтре последовательно 1 л 3 мМ фосфатного буферного раствора (рН 4.5), 1 л дистиллированной воды, 20 мл ацетона и высушивали.

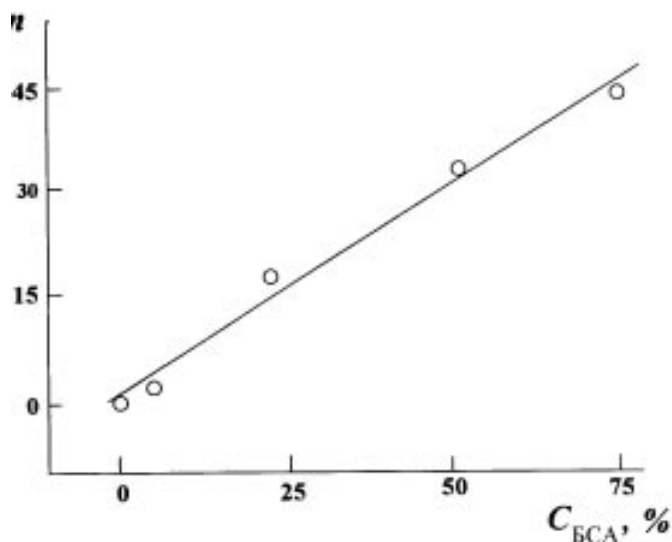


Рис. 1. Зависимость модельного числа слоев иммобилизованного белка от концентрации модифицирующего раствора

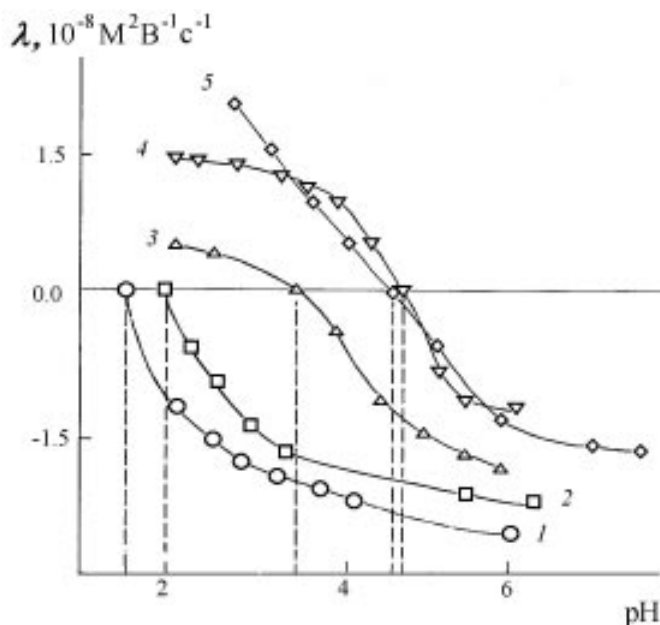


Рис. 2. Зависимости электрофоретической подвижности частиц сорбентов 1–5 от рН в 20 мМ фосфатном буферном растворе

Для хроматографического изучения свойств сорбента использовали хроматографическую систему, состоящую из насоса высокого давления «Вескман-114М», кондуктометр «LKB-5300В» и УФ-детектор «LKB-2238 Uvicord-S2», петлевой кран-дозатор «Rheodine-7125» с петлей объемом 50 мкл. Измерение электрофоретической подвижности частиц проводили на установке для лазерного электрофореза «Malvern Zetasizer 2с». Все изучаемые сорбенты были упакованы суспензионным способом в колонки из нержавеющей стали длиной 5 см и внутренним диаметром 4 мм.

**Обсуждение результатов**

Использованный в работе принцип создания гетероповерхностных сорбентов заключается в сохранении неизменной природы модифицирующего покрытия на внутренней поверхности пор, составляющей более 98% общей площади поверхности сорбента, в то время как на внешней поверхности создается плотное макромолекулярное гидрофильное покрытие, препятствующее денатурации и необратимой сорбции белка на частицах сорбента, а также его проникновению в поры при прямом вводе пробы биологической жидкости в хроматографическую колонку. В результате белки пробы выходят раньше «мертвого» времени колонки, определяемого для небольших молекул, проникающих в поры.

Описанные выше условия синтеза предполагают получение сорбента с равномерным по толщине слоем

## Характеристики исследуемых сорбентов

Сорбент	Используемый белок	Концентрация белка, мг/мл	pH	Содержание углерода C, %	$\Delta C$	Число слоев белка, $n$	pI частиц
1	Диасорб-130-сульфо			2.2	0	0	1.5
2	БСА	5	4.5	2.4	0.2	2	2.0
3	БСА	20	4.5	3.8	1.6	16	3.5
4	БСА	50	4.5	5.0	2.8	29	4.5
5	Плазма крови человека	$\approx 70$	7.3	5.9	3.7	38	4.7

иммобилизованных на внешней поверхности молекул альбумина в глобулярной форме. Глобулы альбумина (минимальный диаметр вращения эллипсоидальных глобул альбумина  $d_{\text{БСА}} \approx 7$  нм) не проникают в поры сорбента (диаметр пор  $d_n \approx 13$  нм) на заметную глубину и создают слой, препятствующий проникновению последующих макромолекул. Для описания качества прививки альбумина на поверхность частиц и интерпретации данных элементного анализа (таблица) частица сорбента рассматривается как идеальный сплошной шар (плотность  $\rho$ , радиус  $R = 5$  мкм, площадь поверхности  $S = 4\pi R^2$ , масса  $M = V \cdot \rho = 4/3\pi R^3 \rho$ ), на поверхности которой закрепляются глобулы альбумина радиусом  $r = 3.5$  нм. Таким образом, площадь, занимаемая одной глобулой при плотнейшей упаковке, равна

$$s = 2\sqrt{3} r^2.$$

Тогда число глобул, размещающихся на частице сорбента мономолекулярным слоем, составляет

$$N = S/s = 2\sqrt{3} (R/r)^2$$

с общей массой

$$m = N \cdot M_{\text{БСА}} / N_A,$$

где  $N_A$  – число Авогадро, а  $M_{\text{БСА}}$  – масса одной молекулы альбумина. Тогда увеличение содержания углерода за счет закрепления глобул белка составляет величину

$$\Delta C = mnk / (M + mnk),$$

где  $n$  – модельное число мономолекулярных слоев

альбумина, а  $k$  – массовая доля углерода в белке ( $k = 0.53$ ). Отсюда можно найти  $n$

$$n = \frac{M\Delta C}{(1-\Delta C)mnk} = \frac{\Delta C}{(1-\Delta C)} \cdot \frac{2 R r^2 \rho N_A}{\sqrt{3} k M_{\text{БСА}}}.$$

Полагая, что  $M_{\text{БСА}} = 67000$ , а плотность частицы сорбента  $\rho \approx 0.85$  г/см<sup>3</sup>, получаем

$$n = 10^3 \frac{\Delta C}{100\% - \Delta C}$$

Таким образом, по данным элементного анализа сорбенты могут быть охарактеризованы плотностью белкового покрытия, выражаемого условным модельным числом мономолекулярных слоев  $n$  (таблица). При сравнении данных элементного анализа следует отметить почти линейную зависимость модельного числа слоев  $n$  от концентрации белкового раствора, используемого при синтезе (таблица). Заметной зависимости  $n$  от pH в диапазоне 4.5–7.5 обнаружено не было.

С данными элементного анализа хорошо согласуются и результаты исследования электрофоретической подвижности ( $\lambda$ ) частиц полученных сорбентов от pH. Как известно,  $\lambda$  зависит от заряда внешней поверхности частицы ( $\xi$ -потенциала) и позволяет найти для нее изоэлектрическую точку pI, что дает возможность полуколичественно оценить результаты модифицирования внешней поверхности. Значения изоэлектрических точек для серии сорбентов найдены из графиков зависимости  $\lambda = f(\text{pH})$ , представленных на рис. 2 (для сорбентов 1 и 2 данные экстраполированы), и приведены в таблице. По этим значениям видно, что с на-

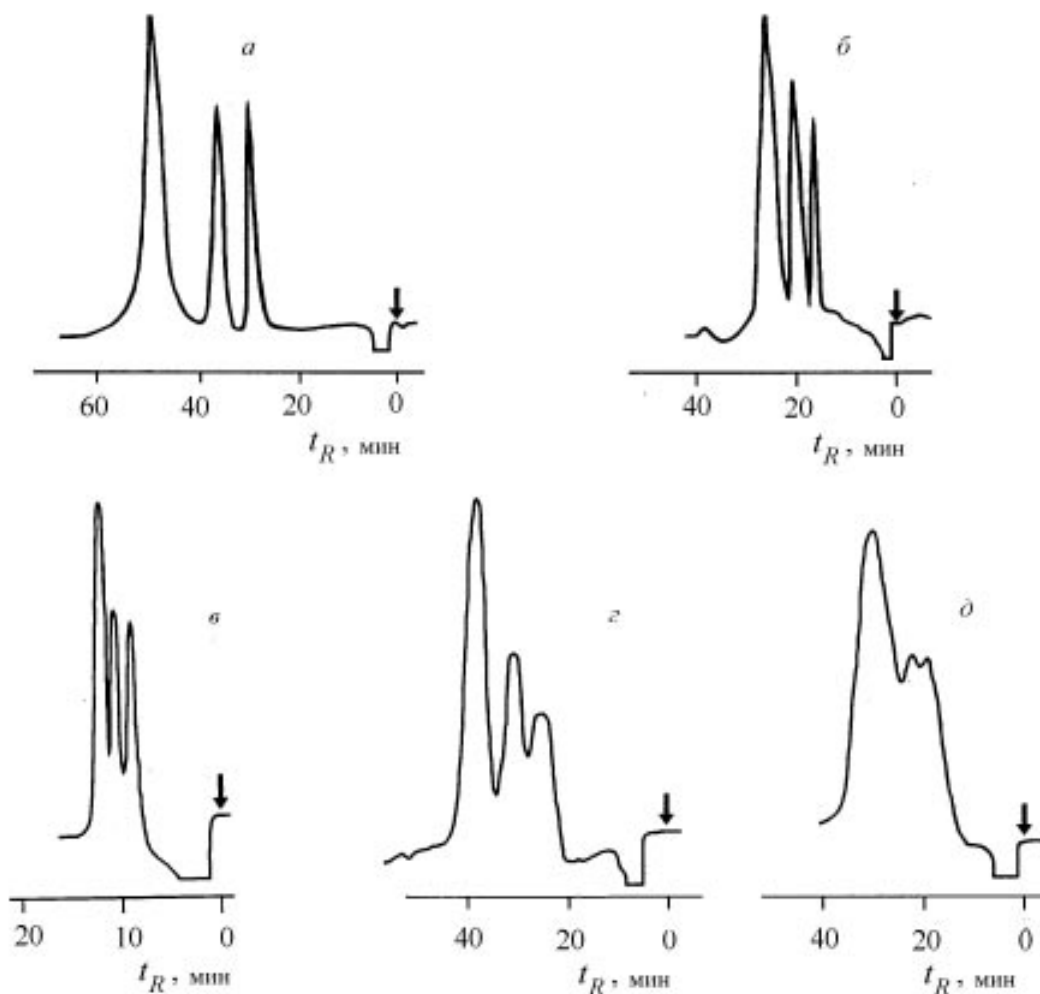


Рис. 3. Разделение ионов лития, натрия, калия на сорбентах 1–5 (а–д соответственно). Колонка 50×4 мм, элюент – 2мМ HNO<sub>3</sub>, расход элюента 1 мл/мин, детектирование кондуктометрическое

растанием толщины слоя белка усиливается экранирование исходной (сорбент 1) поверхности, содержащей сульфогруппы, и наблюдается смещение изоэлектрических значений рН к изоионной точке альбумина ( $pI_{\text{БСА}} = 4.7$ ).

Для оценки хроматографических свойств полученных сорбентов было исследовано удерживание ионов трех щелочных металлов при элюировании раствором азотной кислоты. Полученные хроматограммы при использовании в качестве элюента 2 мМ азотной кислоты представлены на рис. 3. Изучение зависимости эффективности колонки ( $N$ ) и времени удерживания ( $t_R$ ) от  $n$  (рис. 4,а и 4,б) для ионов калия показало, что снижение эффективности с увеличением  $n$  в ряду сор-

бентов 3–5 соответствует предположению об уменьшении доступности пор сорбента, где сосредоточены катионообменные группы. Снижением скорости диффузии ионов в нарастающем по толщине слое белка на поверхности частиц можно объяснить и почти линейное увеличение времени удерживания ионов щелочных металлов, которое при более плотных покрытиях могло бы, по-видимому, увеличиться на порядок и более.

Довольно необычными для гетероповерхностных сорбентов оказались свойства сорбента с минимальным модифицированием (сорбент 2,  $n = 2$ ) по сравнению с исходным (сорбент 1,  $n = 0$ ): эффективность разделения увеличивается вдвое и снижается до значения, практически равному значению для исходного

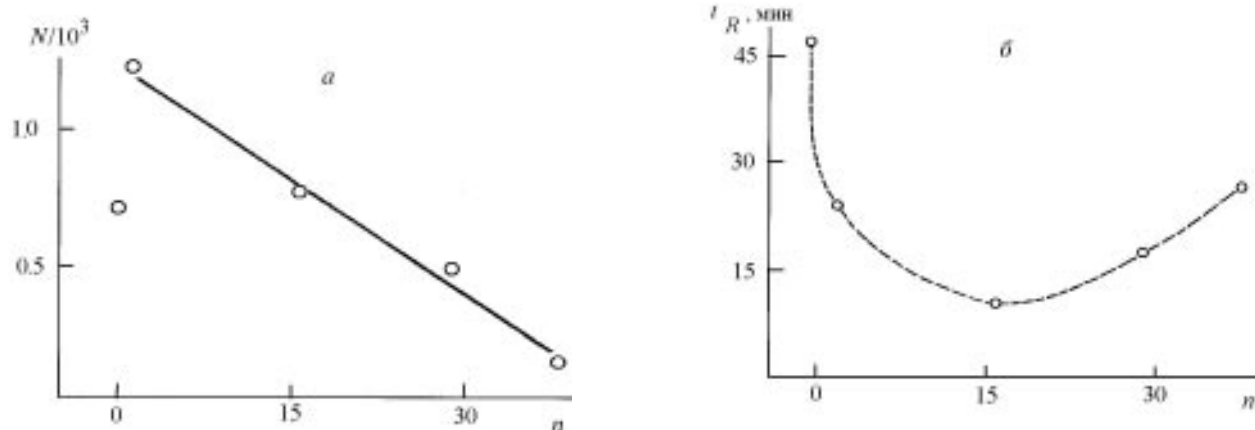


Рис. 4. Зависимость эффективности колонки (а) и времени удерживания (б) для иона калия от количества иммобилизованного белка. Условия см. в подписи к рис. 3.

сорбента, при белковом покрытии в 8 раз большем (сорбент 3,  $n = 16$ ).

Принимая во внимание то, что в действительности форма реальной частицы отлична от идеального шара и внешняя поверхность значительно развита, можно предположить, что при значении  $n = 2$  достигается покрытие, близкое к мономолекулярному, которое, равномерно покрывая внешнюю поверхность частицы, экранирует наиболее активные катионообменные центры и не затрудняет при этом доступ ионов в поры. Это приводит к большей однородности поверхности сорбента, что способствует повышению эффективности колонки.

Таким образом, в данной работе отработана методика синтеза гетероповерхностных сорбентов на основе катионообменника с различной толщиной внешнего белкового покрытия и установлена ее зависимость от условий синтеза. Данные элементного анализа, измерений электрофоретической подвижности и ионохроматографического изучения серии сорбентов независимо подтвердили и взаимно дополнили друг друга. На основе упрощенной геометрической модели предложен параметр  $n$  (условное число мономолекулярных слоев) для характеристики плотности белковой обшивки частиц сорбента. Показано наличие корреляции между

рядом характеристик сорбентов и рассчитанным числом слоев закрепленных глобул белка. Из результатов эксперимента следует, что оптимальные хроматографические характеристики имеет сорбент с покрытием альбумином, близким к мономолекулярному.

Исследования осуществлены при поддержке грантов Международного научного фонда и Правительства Российской Федерации (№ MLQ 000 и № MLQ 300).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сердан А.А. // 1-я Междунар. конф. «Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии». Автореф. докл. ч. 1. С.-П., 1996. С.138.
2. Mok C.-S., Law O.-W. // Anal. Chem. Acta. 1995. **302**. P. 45.
3. Campins P., Rosa F. // Anal. Chem. Acta. 1993. **284**. P. 67.
4. Saleh M.I., Loh H.K. // Anal. Chem. Acta. 1993. **282**. P. 559.
5. Bourguignon B., Massart D.L. // Anal. Chem. Acta. 1993. **282**. P. 45.
6. Peng W. et al. // Anal. Chem. Acta. 1994. **298**. P. 415.
7. Mavtari K. et al. // Anal. Chem. Acta, 1995, **302**. P. 179.
8. Pinkerton T.C. // J. Chromatogr. 1991. **544**. P. 13.
9. Сердан А.А., Богословский С.Ю., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1991. **65**. С. 2638.
10. Фрейдлин Г.А. и др. // Глутаровый альдегид. М., 1983.
11. Horwood D. // Fixation in Histochemistry. L., 1973. P. 47.
12. Кузнецова Н.П. и др. // Ж. биоорг. химии. 1993. **19**. С. 871.