

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱՎԱԴԵՍԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 63, №1, 2010 Химический журнал Армении

СОРБЕНТЫ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

С. С. АЙРАПЕТЯН, Л. Г. МАНГАСАРЯН, Л. С. БАНЯН и А. Г. ХАЧАТРЯН

Ереванский государственный университет
Армения, 0025, Ереван, ул. А.Манукяна, 1
Факс: (374-10) 570663, E-mail: gold@ysu.am

Поступило 9 IX 2008

Рассмотрены вопросы получения сорбентов для твёрдофазной экстракции на основе различных полимерных композиций и широкопористых кремнеземных сорбентов. В качестве широкопористых матриц использованы: диатомит Джраджорского месторождения (Республика Армения и широкопористый силикагель -средний диаметр пор 50 нм).

Для хроматографических исследований использовали колонки, упакованные полимерно-минеральными [на основе сополимера октадецилметакрилат (ОДМА) с бутилакрилатом (БА)] сорбентами.

Рассмотрено использование монолитных колонок для пробоподготовки на основе полученных сорбентов и мочевино-формальдегидной смолы (МФС). В качестве объекта исследования использовали кровь пациентов с трансплантированными почками, которым для предотвращения отторжения назначался циклоспорин.

Рис. 2, библиограф. ссылок 11.

Твёрдофазная экстракция (ТФЭ) в настоящее время является наиболее популярным методом пробоподготовки.

Основной проблемой при проведении анализов является выбор подходящих сорбентов, которые позволили бы решить данную конкретную аналитическую задачу. В течение многих лет алкилированные силикагели были универсальными сорбентами для ТФЭ.

В настоящее время такие системы не в полной мере удовлетворяют тем требованиям, которые стоят перед пробоподготовкой. В качестве сорбентов используют шитые сополимеры, графитизированные угли и некоторые специальные алкилсиланы [1-3].

Циклоспорин является иммуносупрессантным агентом и применяется при трансплантации печени, почек, сердца для предотвращения процессов отторжения со стороны организма больного. Дозировка циклоспорина и мониторинг его количества в организме чётко контролируются. Одним из способов быстрого и надежного контроля количества циклоспорина в физиологических жидкостях может стать хроматографический метод. В этом случае, как пра-

вило, применяют метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [4-11].

Экспериментальная часть

Сорбенты для ТФЭ. В качестве пористой матрицы использовали широкопористый силикагель (средний диаметр пор 50 нм, удельная поверхность 80 м²/г, объём пор 1.0 см³/г), полученный гидротермальной обработкой исходного среднепористого силикагеля со средним диаметром пор 10 нм при 200°С (рН 8.0) в течение 6 ч.

Нанесение полимерных слоев на поверхности силикагеля. Модифицирование поверхности осуществляли пропиткой широкопористого силикагеля ацетоновым раствором соответствующих мономеров в присутствии инициатора полимеризации – пероксида дикумила (ПДК). После удаления ацетона при комнатной температуре полученный порошок перенесли в стеклянную ёмкость, закрывали и помещали в сушилку для проведения процесса полимеризации. Процесс полимеризации осуществляли при 100-120°С в течение 3-4 ч.

При нанесении соответствующего полимерного покрытия использовали смеси мономеров:

ПААГ – смесь акриламида и *бис*-акриламида в мольном соотношении 5:1;

Поли-(стирол-дивинилбензол) [поли(Ст-ДВБ) – смесь Ст и ДВБ (3:1);

ОДМА-ГлМА – смесь ОДМА и ГлМА (3:1);

ОДМА-ТЭГДМА – смесь ОДМА и ТЭГДМА (1:4);

ОДМА-ДВБ – смесь ОДМА и ДВБ (1:3);

ОДМА-МА – смесь ОДМА и МА (1:8).

Полученные сорбенты промывали горячей водой, а ОДМА-содержащие полимеры – сначала смесью 1,4-диоксана и толуола (объемное соотношение 1:1), затем этанолом. Промывные растворы исследовали в режиме ВЭЖХ. Образцы гибридных полимерно-минеральных сорбентов промывали ацетоном, отфильтровывали, сушили при 100°С в течение 2 ч.

Пробоподготовка. Приготовление монолитных колонок для ТФЭ на основе мочевино-формальдегидной смолы. К 5 мл 50% раствора мочевины при перемешивании добавляли 2 г соответствующего сорбента и 10 мл формалина, доводили рН среды до 2.0 с помощью концентрированной соляной кислоты. Через 30-40 с полученную массу заливали в пустые колонки для твердофазной экстракции (ТФЭ) ёмкостью 3 мл. Процесс поликонденсации завершается через 1.5-4.0 мин. Через 40-50 мин полученные таким образом колонки промывали сначала дистиллированной водой (20 мл), далее ацетонитрилом (3 мл).

Сорбционные свойства полученных сорбентов по циклоспорину. Пропускали по 1 мл раствора экворала (препарат, содержащий циклоспорин) в смеси ацетонитрил-вода (ACN/Wt) (75/25) (0.041 г циклоспорина в 10 мл ACN/Wt) через ТФЭ-колонки, заполненные полученными сорбентами. Элюирование колонок проводили 5 мл ACN/Wt (75/25). Отбирали по 1 мл элюата и исследовали в режиме ОФ-ВЭЖХ.

Пробоподготовка образцов крови. Через полученные колонки пропускали по 1 мл крови, содержащей циклоспорин, после чего колонку промывали 5 мл смеси ACN/Wt (75/25). Отбирали по 1 мл элюата.

Хроматографическая система. Для хроматографических исследований использовали ВЭЖХ-системы: "Waters 626 Pump", "Waters 486 Tunable Absorbance Detector", "Waters 600 S Controller". Колонка – "Si-300 ODMA-BA". Детектирование при 210 нм; мобильная фаза – смесь ACN/Wt (75/25), скорость пропускания мобильной фазы 1.0 мл/мин; давление 1800 psi.

Обсуждение результатов

Из рис. 1 следует, что из колонки, содержащей диатомит, несмотря на то, что максимум пика (450 мВ) соответствует 2 мл элюента, элюирование продолжается до 4 мл. По-видимому, циклоспорин химически взаимодействует с гуминовыми кислотами, содержащимися в диатомите (использовался без предварительной обработки) (кр. 1). Интересная картина наблюдается при элюировании циклоспорина из колонки, содержащей Ст-ДВБ (кр. 2). В этом случае элюирование начинается с 2 мл элюента, максимум пика (550 мВ) наблюдается после пропускания 3 мл элюента, и для элюирования требуется 2 мл элюента. Здесь, как и в первом случае, имеет место концентрирование анализируемого вещества и происходит его быстрое элюирование.

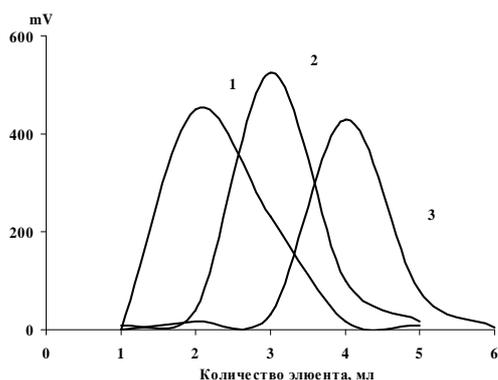


Рис. 1. Кривые удерживания циклоспорина на колонках, заполненных сорбентами: 1) – диатомит, 2) – силикагель, покрытый поли(Ст-ДВБ), 3) – силикагель, покрытый ПААГ.

В наименьшей степени элюирование циклоспорина происходит из колонки, содержащей ПААГ (кр. 2). Здесь, по всей видимости, происходит задержка ананта в порах. Вероятнее всего, механизм задержки гель-фильтрационный, поскольку на поверхности ПААГ нет функциональных групп, которые могли бы так сильно удерживать циклоспорин. Необходимо отметить, что всё элюирование происходит в мочевино-формальдегидной смоле (МФС) с функциональными группами, аналогичными таковым у ПААГ.

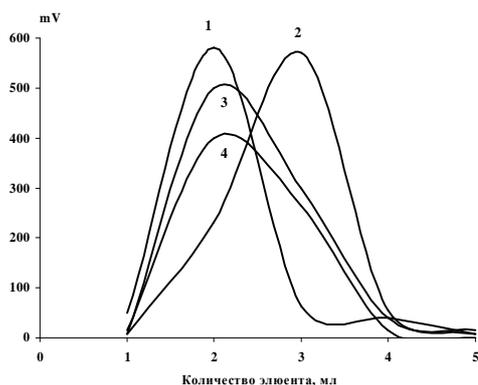


Рис. 2. Удерживание циклоспорина на колонках, заполненных сорбентами с функциональными группами:
 1 – ОДМА-СООН; 2 – ОДМА-ТГМ-3; 3 – ОДМА-ГлМа;
 4 – ОДМА-ДВБ.

На рис. 2 представлены кривые элюирования циклоспорина из колонок, содержащих группы С₁₈. Из рисунка следует, что элюирование циклоспорина в наибольшей степени происходит из колонки, упакованной бифункциональным сорбентом (содержащим одновременно группы ОДМА и СООН). При этом с помощью 2 мл элюента удаётся элюировать из колонки весь циклоспорин. Необходимо отметить, что максимум пика (600 мВ) соответствует исходному образцу циклоспорина (без прохождения через колонку). Вероятно, в такой колонке происходит концентрирование циклоспорина и его быстрое элюирование. Это обстоятельство весьма важно при проведении пробоподготовки из матриц, содержащих белковые системы.

При переходе к более гидрофобным системам наблюдается некоторое дополнительное удерживание циклоспорина в колонке. Так, при замене карбоксильных групп группами из ТЭГДМА (кр. 2), эпоксигруппами и группами ДВБ (кр. 4) удаление циклоспорина из колонки задерживается до 4 мл. С увеличением гидрофобности увеличивается степень удерживания анализа в колонке. Кроме того, если максимум пика у образца с ТЭГДМА составляет 550 мВ, а у образца с Гл-МА – 500 мВ, то у образца с ДВБ он составляет 400 мВ. Мы считаем, что это обусловлено гидрофобным взаимодействием поверхностных функциональных групп сорбентов с анализируемым веществом.

Данные по элюированию циклоспорина

| Сорбент | Общий объём элюента для полного элюирования циклоспорина, <i>мл</i> | Объём элюента, при котором наблюдается максимальное значения интенсивности пика, <i>мл</i> | Интенсивность пика, <i>мВ</i> |
|-------------|---|--|-------------------------------|
| Диатомит | 4.0 | 2.0 | 450 |
| ПААГ | 6.0 | 4.0 | 430 |
| Стирол ДВБ | 5.0 | 3.0 | 550 |
| ОДМА-СООН | 3.0 | 2.0 | 600 |
| ОДМА-ТЭГДМА | 4.0 | 3.0 | 550 |
| ОДМА-Гл-Ма | 4.0 | 2.0 | 500 |
| ОДМА-ДВБ | 4.0 | 2.0 | 400 |

Несколько иначе ведет себя сорбент с ТГМ группами на поверхности (кр. 1). Максимум пика циклоспорина наблюдается на 3 *мл* элюента. Процесс элюирования происходит при пропускании 3 *мл* элюента.

При сравнении процессов элюирования циклоспорина из колонок, содержащих сорбенты с функциональными группами ДВБ (кр. 2, рис. 1 и кр. 4, рис. 2), наблюдается следующая картина. Элюирование с поверхности сорбента, содержащего только ДВБ, происходит более «компактно» (в промежутке 2-4 *мл*) с помощью 2 *мл* элюента с максимумом пика 600 *мВ*, в то время как дополнительные группы C_{18} (кр. 4, рис. 2) обуславливают более прочное удерживание, и полное элюирование имеет место в интервале 1-4 *мл* с максимумом пика 400 *мВ*. То есть увеличение гидрофобности поверхности приводит скорее к «разбавлению» пробы, нежели к её концентрированию. Это ещё раз подтверждает приведенное выше предположение о том, что происходит гидрофобное взаимодействие поверхности с анализируемым веществом.

Из рис. 2. следует, что бифункциональные системы в большей мере подходят для концентрирования пробы и позволяют более компактно элюировать пробы из колонки. Такие системы целесообразно использовать для создания ТФЭ-колонок.

Таким образом, путем нанесения бифункциональных полимерных слоев на поверхность широкопористого силикагеля могут быть получены сорбенты для ТФЭ, в частности, для пробоподготовки при анализе циклоспорина из физиологических жидкостей (сыворотка, моча). Увеличение степени гидрофобности поверхности сорбента приводит к более прочному удерживанию анализируемого вещества в колонке в результате так называемого «гидрофобного» взаимодействия. Увеличение степени гидрофильности и переход к системам, содержа-

щим ярко выраженные гидрофильные и гидрофобные функциональные группы на поверхности, приводят к более эффективному концентрированию анализируемого вещества и его количественному элюированию.

ՍՈՐԲԵՆՏՆԵՐ ՊԻՆԴ ՖԱԶԱՅԻՆ ԼՈՒԾԱՀԱՆՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ս. Ս. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ, Լ. Գ. ՄԱՆԳԱՍԱՐՅԱՆ, Լ. Ս. ԲԱՆՅԱՆ և Հ. Գ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Դիտարկվել են տարբեր պոլիմերային կոմպոզիցիաների և լայնածակոտկեն սիլիկահողերի հիման վրա պինդ ֆազային լուծահանման համար սորբենտների ստացման և դրանց կիրառման հարցեր: Որպես լայնածակոտկեն սիլիկահողեր կիրառվել են ՀՀ Ջրաձորի հանքավայրի դիատոմիտ և լայնածակոտկեն սիլիկաժելեր (ծակոտիների միջին չափը – 50 նմ): Որպես պոլիմերային կոմպոզիցիաներ կիրառվել են պոլիակրիլամիդային ժել, պոլի(օկտադեցիլմետակրիլատ-մեթիլմետակրիլատ), պոլի(օկտադեցիլմետակրիլատ-գլիցիդիլակրիլատ), պոլի(օկտադեցիլմետակրիլատ-տրիէթիլենգլիկոլդիմետակրիլատ), պոլի(օկտադեցիլմետակրիլատ-դիվինիլբենզոլ), պոլի(օկտադեցիլմետակրիլատ-մալեիկանաթթվի անհիդրիդ):

Քրոմատոգրաֆիկ ուսումնասիրությունների ընթացքում օգտագործվել են հանքավայրային պոլի(օկտադեցիլմետակրիլատ բուտիլակրիլատի հիման վրա) սորբենտներով լցված աշտարակներ: Դիտարկվել է վերոհիշյալ սորբենտների և միզանյութ-ֆորմալդեհիդային խեժի հիման վրա պատրաստված միաձուլ աշտարակների օգտագործումը նմուշապատրաստման համար, մասնավորապես արյան մեջ ցիկլոսպորինի որոշման ընթացքում նմուշապատրաստման ժամանակ:

SORBENTS FOR SOLID PHASE EXTRACTION

S. S. HAYRAPETYAN, L. G. MANGASARYAN,
L. S. BANYAN and H. G. KHACHATRYAN

Yerevan State University
1 A. Manoukyan St., Yerevan, 0025, Armenia
Fax: (37410) 570663, E – mail: gold@ysu.am

The questions related to the creation and application of solid phase extraction sorbents based on various polymer compositions and wide-porous silica have been considered. Diatomit from the Djradzor deposit (Republic of Armenia) and wide-porous silica gels (average pore size 50 nm) have been applied as wide-porous silicas. And polyacrilamide gel, poly(octadecylmethacrylate-methylmethacrylate), poly(octa-decylmethacrylate-glycidylacrylate), poly(octadecylmethacrylate-triethyleneglycoldimethacrylate), poly (octadecylmethacrylate-divinylbenzene, poly(octadecylmethacrylate-maleic anhydride co-polymers have been applied as polymer compositions.

Columns packed by mineral-polymer sorbents based on poly(octadecylmethacrylate-butylacrylate co-polymer have been used during the chromatographic experiments. The use of monolith columns on the base of the indicated sorbents and urea-formaldehyde resin for probe preparation has been considered, particularly for probe preparation during the analysis of cyclosporin in blood samples.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Henion M.-C.* // J. Chromatogr. A, 1999, v.856, p.3.
- [2] *Henion M.-C.* // J. Chromatogr. A, 1999, v.856, p.73.
- [3] *Moret S., M.Sanchez J., Salvado V., Hidalgo M.* // J.Chromatogr. A, 2005, v.1099, p.55.
- [4] *Zaghloul A.A., Hussain A., Khan M.A., Ahsan F.* // J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, v.31, issue 6, p.1101.
- [5] *Ouyang J., Baeyens W.R., Duan J., Delanghe J.* // Biomed Chromatogr., 2003, v.17, №6, p.404.
- [6] *Amini H, Ahmadiani A.* // J Chromatogr. B. (Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.), 2003, v.795, №2, p.209.
- [7] *Golabi N., Tajerzadeh H., Ghassempour A.* // Talanta, 2003, v.59, issue 6, p.1089.
- [8] *Bardelmeijer H.A., Ouwehand M., Beijnen J.H.* // J. Chromatogr. B. (Biomedical Sciences and Applications), 2001, v.763, p.201.
- [9] *Hatsis P., Volmer D.A.* // J. Chromatogr. B. (Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.), 2004, v.809, №2, p.287.
- [10] *Toulet V., Saux M.C., Rouquette C., Penouil F., Brachet-Liermain A.A.* // Ann. Biol. Clin. (Paris), 1986, v.44, №5, p.517.
- [11] *Šafarčuk K., Brozmannov H., Barto V., Jegorov A., Grundmann M.* // Clinica Chimica Acta, 2001, v.310, p.165.