



УДК 541.(64+183.12)

Влияние условий синтеза на специфичные свойства полимерных сорбентов, импринтированных молекулами мочевой кислоты

Полякова И.В., Грошикова А.Р., Лещинская А.П.,
Писарев О.А., Панарин Е.Ф.

*Учреждение Российской Академии Наук, Институт высокомолекулярных соединений РАН,
Санкт-Петербург.*

Поступила в редакцию 9.02.2010 г.

Аннотация

С целью оптимизации количества введенных шаблонных молекул и увеличения вклада специфичного связывания в селективность сорбции мочевой кислоты молекулярно импринтированными сорбентами исследованы основные этапы модификации условий синтеза сшитых полимерных систем на основе функционального сомономера диметиламиноэтилметакрилата и кросс-агента диметакрилата этиленгликоля. Разработаны условия введения мочевой кислоты в полимеризационную смесь в виде хорошо растворимых солей с органическими основаниями. Это позволило увеличить концентрацию молекул-темплатов до 16 моль % и значительно повысить специфичную емкость сорбента. Модификация условий синтеза также позволила улучшить биосовместимость сорбентов за счет выведения из полимеризационной смеси диметиламиноэтилметакрилата.

Ключевые слова: молекулярно импринтированные полимерные сорбенты, мочевая кислота, изотермы равновесия сорбции, специфичное связывание.

For optimizing the quantity of the introduced template molecules and increasing the specific binding contribution to the sorption of uric acid by the molecularly imprinted sorbents, the main stages of the conditions modification of the crosslinked polymeric system based on dimethylaminoethylene methacrylate as functional monomers and ethyleneglycol dimethacrylate as a crosslinker synthesis were studied. There were elaborated conditions for introducing the uric acid into the copolymerization bulk as the well soluble salts of uric acid and organic bases. That permitted to increase the template molecules concentration up to 16 mol % and to considerably increase the sorbent specific capacity. The modification of the synthesis conditions also permitted to improve the sorbents biocompatibility properties in result of excluding from the copolymerization bulk.

Keywords: molecularly imprinted polymeric sorbents, uric acid, equilibrium sorption isotherms, specific binding

Введение

Создание и исследование физико-химических и сорбционных свойств молекулярно импринтированных полимерных сорбентов (МИПов), иначе сетчатых полимеров с молекулярными отпечатками (imprint – отпечаток), способных к распознаванию и высокоспецифичному связыванию биологически активных

молекул (БАВ) и выполняющих роль искусственных рецепторов, позволяет разрабатывать аналитические методы определения и препаративные методы выделения БАВ различной природы [1, 2]. Это обусловлено способностью к высокоспецифичному молекулярному узнаванию МИПами целевых БАВ, а также простотой и дешевизной получения МИПов и их стабильностью в экстремальных условиях.

Принцип метода получения МИПов включает три основные стадии. Первая стадия состоит в создании предполимеризационного комплекса между целевым объектом – темплатом (template – шаблон, трафарет, лекало) и функциональным мономером путем ковалентных или нековалентных взаимодействий их функциональных групп. На следующей стадии в присутствии сшивающего агента осуществляется полимеризация, при которой комплексы мономеров с шаблонами фиксируются в определенных позициях полимерной сетки. На заключительной стадии синтеза МИПов при удалении шаблонов путем экстракции органическим растворителем или разрушения связей шаблона с мономерами в полимере образуются полости или отпечатки, комплементарные шаблонным молекулам по размеру, форме и функциональности, и сохраняющие «молекулярную память» о них. В результате в полимерной сетке формируются адсорбционные центры, способные к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом, и к высокоселективному извлечению молекул-мишеней из многокомпонентных растворов [3].

Ранее с целью создания биосорбента для селективной сорбции мочевой кислоты (МК) из плазмы крови были разработаны методы синтеза сшитых молекулярно импринтированных полимерных систем. Для наиболее эффективного формирования комплементарных отпечатков были разработаны условия образования устойчивого предполимеризационного комплекса МК с функциональным мономером диметиламино-этилметакрилатом (ДМАЭМ). Были исследованы условия введения в полимеризационную смесь сшивающего агента диметакрилата этиленгликоля (ДМЭГ) в количествах, необходимых для достижения пористости сшитых полимерных матриц, обеспечивающих пространственную фиксацию функциональных групп и хорошую доступность сорбционных центров [4].

Однако, исследование основных параметров равновесия сорбции МК ранее синтезированными МК-МИПами и контрольными полимерными сорбентами (КП) – неимпринтированными предшественниками МК-МИПов показало необходимость модификации метода синтеза с целью увеличения количества специфичных сайтов связывания в импринтированных полимерных сетках [4, 5].

Целью настоящей работы являлась оптимизация введения шаблонных молекул МК в полимеризационную массу для повышения аффинно-рецепторной емкости модифицированных МК-МИПов.

Эксперимент

МК была использована в качестве молекул-шаблонов и вводилась в полимеризационную смесь в виде растворимых солей МК с органическими основаниями. В качестве сомономеров были исследованы ДМАЭМ и ДМЭГ. Сополимеризация проходила в инертной среде азота в закрытой колбе при 60°C в течение 2 часов. Шаблонные молекулы МК удалялись из полимерных сеток путем промывки сорбентов в аппарате Сокслета смесью 0,1н HCl и этанола (1:1) в течение

5 часов. Полученные образцы многократно промывали этанолом и водой, после чего сушили до постоянного веса. В работе были использованы полимерные сорбенты с размером частиц 160–315 мкм.

Коэффициенты набухания сетчатых полимеров определяли как отношение объема набухшего в течение 8–10 часов образца сорбента к объему сухого образца.

Величина полной обменной емкости (ПОЕ) определялась по аминным и карбоксильным группам [6]. Для титрования аминогрупп сорбенты предварительно переводили в ОН⁻ форму. Затем к 10 мг сорбента добавляли 20 мл раствора 0,1н НСl. Смесь перемешивали до установления равновесия в течение 7 суток. Остаток СГ-ионов в равновесном растворе титровали 0,1н раствором NaOH по метиловому красному. По эквивалентному количеству титранта рассчитывали ПОЕ аминогрупп (мг-экв/г). ПОЕ по карбоксильным группам определялась в Н⁺ форме сорбента в статических условиях. Полимер выдерживали в 0,1н растворе NaOH в течение 7 суток. Аликвотную часть фильтрата титровали 0,1н НСl в присутствии метилового красного и рассчитывали содержание карбоксильных групп (мг-экв/г).

При изучении равновесия сорбции в качестве модельных растворов использовали водный раствор МК, а также перитонеальную жидкость. Растворимость МК в воде достигалась введением в водный раствор Li₂CO₃ (0,3 г/л). Влияние ионной силы на равновесие сорбции исследовали при сорбции МК из изотонического 0,9% водного раствора NaCl.

Концентрацию МК в начальных и равновесных растворах определяли спектрофотометрическим методом при $\lambda = 293$ нм по предварительно построенным калибровочным кривым зависимости оптической плотности, $D^{293\text{нм}}$, от концентрации МК в растворе, C , которые носили линейный характер вплоть до $C=0,04$ ммоль/л.

Равновесие сорбции исследовали в статических условиях [4]. Равновесную сорбционную емкость, q , сорбентов по МК находили по формуле:

$$q = \frac{(C - C_p) \times V}{m_n} \times 1000$$

где C , C_p – начальная и равновесная концентрации МК, соответственно, ммоль·мл⁻¹; V – объем раствора, мл; m_n – масса навески сорбента, г.

Обсуждение результатов

Ранее синтезированные образцы МК-МИПов и КП были получены на основе функционального сомономера ДМАЭМ и гидрофобного сшивающего агента ДМЭГ при варьировании количественного соотношения сомономеров в сополимеризационной среде. Из-за предрасположенности ДМАЭМ к гидролизу в водной и смешанной водно-органической среде синтезированные сополимеры проявляли свойства полиамфолитов [4, 5]. В результате ограниченного растворения МК (1,255 мг/мл) в растворе тетрабората натрия (ТБН) образец сорбента МК-МИП-1 был синтезирован в условиях, при которых максимальная концентрация вводимых молекул-шаблонов достигала не более 0,8 моль%.

Для исследования вкладов специфического и неспецифического связывания МК с МК-МИПом были исследованы изотермы равновесной сорбции МК импринтированным и контрольным сорбентами (рис. 1, а, б).

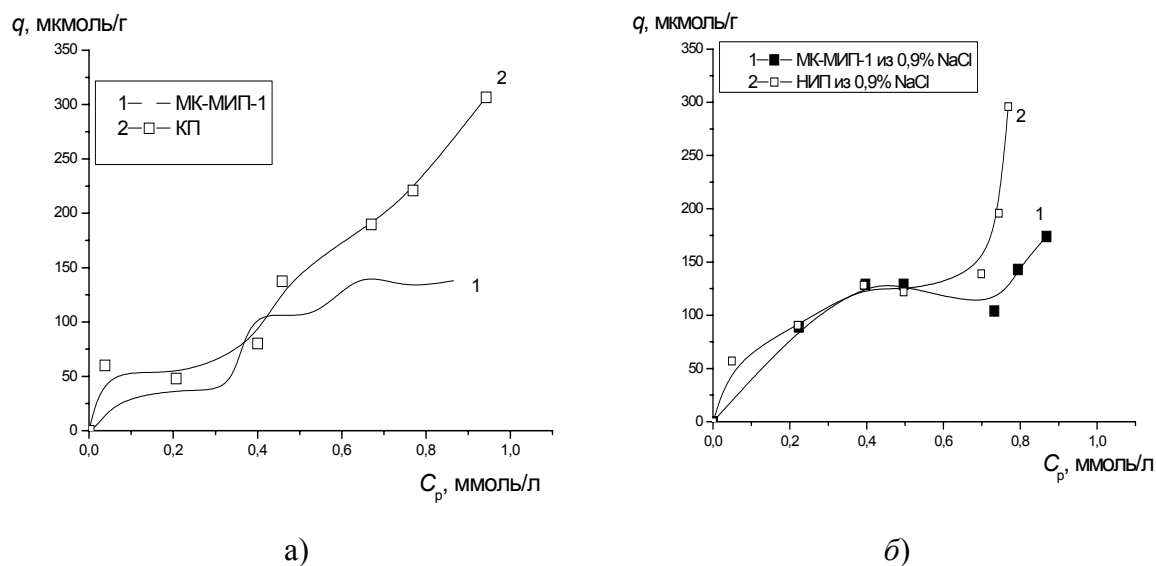


Рис. 1. Изотермы равновесной сорбции МК из водного раствора на МК-МИП-1 (кривые 1) и КП (кривые 2): *a* – сорбция из среды без конкурирующих ионов; *б* – сорбция из 0,9% NaCl

Ступенчатый характер изотерм указывал на связывание МК с энергетически неоднородными сорбционными центрами. Более выраженная многоступенчатость наблюдалась на изотерме 1, описывающей сорбцию МК-МИПом-1 из среды без конкурирующих ионов (рис. 1, *a*). Это могло быть обусловлено большей разреженностью импринтированной сетки за счет комплементарных к МК полостей и, соответственно, большей доступностью энергетически неоднородных сорбционных центров. При введении NaCl в сорбционную среду и подавлении анионообменной сорбции МК возрастали сорбционные емкости, что было обусловлено превалированием неспецифичных молекулярных взаимодействий МК с сорбентами (рис. 1, *б*). При этом близость величин сорбционных емкостей для МК-МИПа-1 и КП (кр. 1 и 2) указывала на низкую степень импринтинга МК-МИПа-1.

С целью повышения степени импринтинга были оптимизированы условия введения шаблонных молекул в полимеризационную среду. С этой целью был получен ряд солей МК с органическими основаниями, значительно улучшающими растворимость МК.

Введение МК в полимеризационную смесь в виде соли с диаллиламином, хорошо растворимой в водно-этанольной среде, позволило увеличить концентрацию шаблонных молекул до 16 моль %. В результате был получен МК-МИП-2 (табл. 1). С одной стороны, введение диаллиламина подавляло гидролиз ДМАЭМ (карбоксильные группы не оттитровывались), с другой – диаллиламин способствовал образованию низкомолекулярных фракций полимера, растворимых в водно-этанольной среде. Это значительно понижало выход сорбента.

С целью оптимизации выхода сополимера в качестве растворителя был исследован глицерин при сохранении прежних условий синтеза и загрузки компонентов полимеризационной смеси. Синтезированные образцы сорбента МК-МИПа-3 представляли механически прочные сильно сшитые ($K_n = 1,7$) шарообразные гранулы. Однако использование диаллиламина по-прежнему понижало выход сорбента даже в среде глицерина (табл. 1).

Таблица 1.

Сорбент	Конц. МК-шаблонов моль %	ПОЕ _N ⁺ мг-экв/г	ПОЕ _{COO} ⁻ мг-экв/г	ДМАЭМ моль%	ДМЭГ моль%	Выход масс %	K _n	ρ, г/см ³
МК-КП-1	0,8	3,3	1,7	75	25	85	1,7	0,68
МК-МИП-2	16	4,4	—	70	30	30	2,5	0,37
МК-МИП-3	16	2,6	—	50	50	30	1,7	0,6
МК-МИП-4	16	—	—	—	100	95	1,05	0,56
МК-МИП-5	16	—	—	—	100	95	1,2	0,47

Кроме того, исследование изотерм сорбции МК на МК-МИПе-3 показало преимущественно неспецифичную молекулярную и анионообменную сорбцию МК и низкую степень импринтинга МК-МИПа-3 (рис. 2).

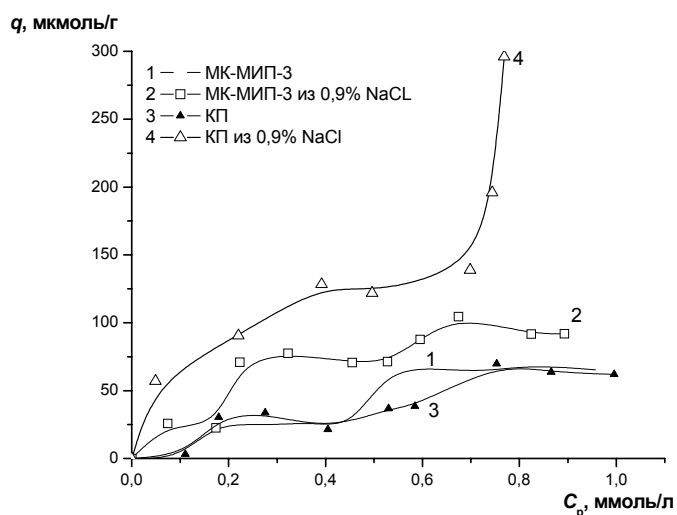


Рис. 2. Изотермы равновесной сорбции МК из водного раствора на МК-МИПе-3 и КП: 1 – сорбция на МК-МИПе-3 из среды без конкурирующих ионов; 2 – сорбция на МК-МИПе-3 из 0,9% NaCl; 3 – сорбция на КП из среды без конкурирующих ионов; 4 – сорбция на КП из 0,9% NaCl

С целью снижения вклада неспецифичного связывания МК с импринтированными сорбентами синтез полимерных сорбентов осуществляли при использовании ДМЭГ в качестве функционального мономера и кросс-агента одновременно. Кроме того, для повышения выхода сорбента были разработаны условия введения шаблонных молекул в виде хорошо растворимых солей МК с низкомолекулярными органическими основаниями, не способными вступать в реакцию сополимеризации.

При введении соли МК с диэтиламином концентрация МК-шаблонов в полимеризационной среде достигала 16 моль %. На основе ДМЭГ были синтезированы неионогенные сильно сшитые гранулы МК-МИП-4. При этом выход сополимера значительно увеличивался (табл.1). Однако в результате исключения ДМАЭМ из синтеза шарообразные гранулы сополимера не образовывались.

Вклады специфичной и неспецифичной сорбции на МК-МИПе-4 и соответствующем КП исследовались в тех же условиях, что и сорбция на сополимерах ДМАЭМ и ДМЭГ.

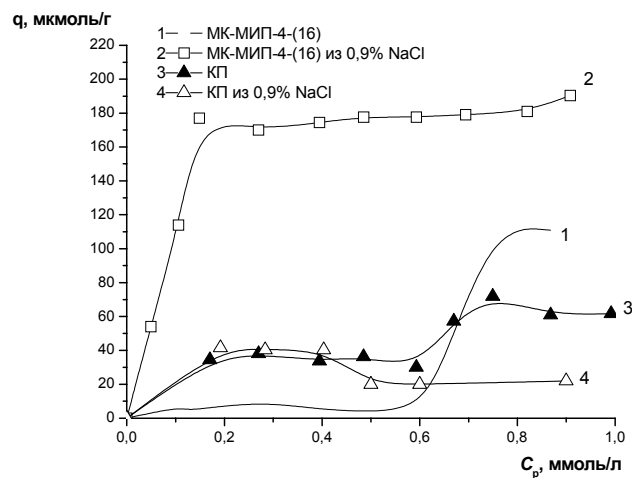


Рис. 3. Изотермы равновесной сорбции МК из водного раствора на МК-МИПе-4 и КП: 1– сорбция на МК-МИПе-4 из среды без конкурирующих ионов; 2 – сорбция на МК-МИПе-4 из 0,9% NaCl; 3– сорбция на КП из среды без конкурирующих ионов; 4 – сорбция на КП из 0,9% NaCl

Как видно из рис.3, молекулярные взаимодействия обеспечивали неспецифичную сорбцию МК неимпринтированным КП на основе ДМЭГ (кр.3, 4). Повышение ионной силы раствора понижало сорбционную емкость КП при увеличении равновесных концентраций МК. При сорбции на МК-МИПе-4 повышение ионной силы, подавляющей неспецифичную сорбцию, способствовало резкому увеличению вклада специфичных взаимодействий МК с сополимером ДМЭГ и увеличению сорбционных емкостей (кр. 2). При этом изотерма сорбции свидетельствовала о распределении МК на энергетически однородных сорбционных сайтах.

С целью улучшения гидродинамических свойств сорбента была осуществлена дополнительная модификация, позволившая практически в идентичных условиях и при аналогичной загрузке компонентов полимеризационной среды синтезировать сорбент в виде гранул правильной шарообразной формы. В полимеризационную смесь вводили 1–2 моль % ДМАЭМ в качестве суспендирующего агента. В результате были синтезированы механически прочные шарообразные гранулы МК-МИПа-5. Потенциометрическое титрование показало отсутствие ионогенных групп в полимерной сетке, что свидетельствовало об отсутствии ДМАЭМ в сополимере (табл.1).

На МК-МИПе-5 достигались высокие сорбционные емкости, как из модельных водных растворов МК, так и из многокомпонентной перитонеальной жидкости – биологического раствора, близкого по составу к плазме крови (рис. 4, кривые 1–3). В области равновесных концентраций МК, соответствующих физиологическим концентрациям в крови ($< 0,415$ ммоль/л), изотермы сорбции имели сходный характер и близкие величины сорбции МК импринтированным сорбентом. Это свидетельствовало о высокой степени импринтинга и превалирующем вкладе специфичного связывания МК сорбентом.

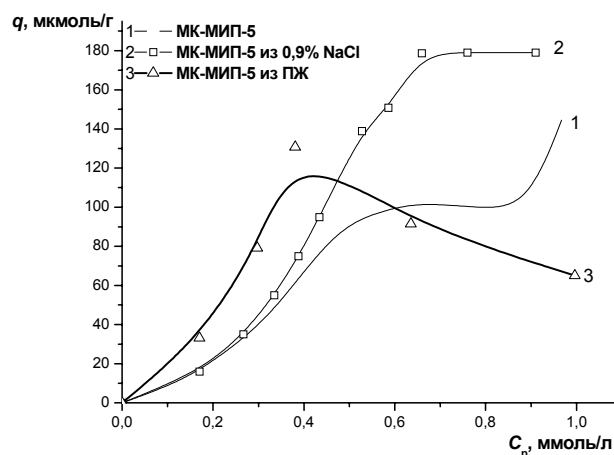


Рис. 4. Изотермы равновесной сорбции МК на МК-МИП-5: 1 – сорбция из среды без конкурирующих ионов; 2 – сорбция из 0,9% NaCl; 3 – сорбция из перитонеальной жидкости (ПЖ)

Заключение

В результате модификации условий синтеза импринтированных сетчатых сорбентов оптимизированы условия введения молекул МК в полимеризационную среду. Это позволило повысить концентрацию шаблонных молекул до 16 моль %.

Разработанные условия синтеза позволили получить МК-МИП-5 в виде правильных шарообразных гранул с узким распределением комплементарных к МК полостей в импринтированной сетке. Это способствовало росту вклада специфичного связывания МК с сорбентом в равновесную емкость сорбции из многокомпонентной перитонеальной жидкости.

Физико-химические и сорбционные свойства МК-МИП-5 как потенциального плазмсорбента соответствуют требованиям, предъявляемым к сорбентам для препаративных колоночных процессов сорбции.

Список литературы

1. Brügemann O., Haupt K., Lei Ye, Yilmaz E., Mosbach K. New configurations and applications of molecularly imprinted polymers// J. Chromatogr. A. 2000. V. 889. P. 15–24.
2. Guo M. J., Zhao Z. Protein-imprinted polymer with immobilized assistant polymer chains// Biomaterials, 2006. V. 27. № 7. P. 4381–4387.
3. Spivak D.A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers// Advanced Drug Delivery Reviews. 2005. V. 57. P. 1779–1794.
4. Полякова И.В., Грошикова А.Р., Лещинская А.П., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Синтез и сорбционные свойства шитых полимерных сорбентов на основе диметиламиноэтилметакрилата и диметакрилата этиленгликоля// Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. №.4. С. 694–705.
5. Лещинская А.П., Грошикова А.Р., Полякова И.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Синтез и изучение свойств сетчатых полимерных сорбентов для селективной сорбции мочевой кислоты// Сб. статей «Сорбенты как фактор жизни и здоровья». Белгород. 2008. С. 36–40.

6. Полянский Н.Г., Горбунов Г.В., Полянская Н.Л. Методы исследования ионитов// М.: Химия, 1976. 208 с.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-03-00516

Полякова Ирина Валериевна - старший научный сотрудник лаборатории полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, тел.: (812) 3283302

Грошикова Анна Родионовна - научный сотрудник лаборатории биологически активных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Лещинская Анастасия Петровна - младший научный сотрудник лаборатории полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Писарев Олег Александрович - зав. лаб. полимерных наносистем и биотехнологических продуктов, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Панарин Евгений Фёдорович - директор института, зав. лаборатории биологически активных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

Polyakova Irina V. - senior research worker, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, e-mail: pol_irina_val@list.ru

Leschinskaya Anastasia P. - junior research worker, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Groshikova Anna R. - research worker, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Pisarev Oleg A. - laboratory chief, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences

Panarin Eugenie F. - institute director, Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences