



SYNTEZA POLIMERÓW IMPRINTOWANYCH DOPAMINĄ I TEORETYCZNA ANALIZA ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZYCZĄSTECZKOWYCH W KOMPLEKSIE PREPOLIMERYZACYJNYM

Piotr Luliński, Aleksandra Cieślak, Dorota Maciejewska*

Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

*autorka korespondująca, tel./faks +22 572 0643, e-mail: domac@farm.amwaw.edu.pl

Otrzymany 30.04.2008; zaakceptowany 26.05.2008; zamieszczony 26.06.2008

STRESZCZENIE

Imprintowane polimery znalazły praktyczne zastosowanie w wielu działach analizy i rozdziału substancji oraz w syntezie organicznej. Najnowsze badania dotyczą wychwyty i uwalniania substancji leczniczych i są związane z poszukiwaniem nowych postaci leków. W artykule przedstawiono przegląd wybranych problemów związanych z syntezą molekularnie imprintowanych polimerów przeznaczonych do izolowania różnych substancji, analizę teoretyczną oddziaływań międzycząsteczkowych w kompleksach prepolimeryzacyjnych oraz krótko omówiono wyniki własnych eksperymentów. W celu otrzymania polimerów przeprowadzono polimeryzację w bloku następujących monomerów: kwasu metakrylowego, 4-winylopirydyny, 1-winyloimidazolu, akrylonitrylu w obecności związku sieciującego - dimetakrylanu etylenu oraz molekuly wzorcowej - chlorowodoru dopaminy w roztworze wodno-metanolowym. Właściwości adsorpcyjne polimerów zbadano metodą stacjonarną.

SŁOWA KLUCZOWE: molekularnie imprintowane polimery, dopamina, modelowanie molekularne

ABSTRACT

SYNTHESIS OF DOPAMINE-IMPRINTED POLYMERS AND THEORETICAL ANALYSIS OF INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN TEMPLATE-MONOMERS

The presented survey concerns the chemistry of imprinted polymers and the selected experiments referred to dopamine imprinted polymers. A bulk synthesis of such polymers was proposed by free-radical cross-linking polymerization of methacrylic acid, 4-vinylpyridine, 1-vinylimidazole, acrylonitrile in the presence of ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker and dopamine hydrochloride as the template molecule in aqueous methanol solution. The ability of imprinted polymers to isolate dopamine was evaluated on the basis of stationary adsorption. The theoretical analysis of intermolecular interactions in the complexes between dopamine cation and each of functional monomers was also discussed, assuming that higher binding energy indicates more suitable monomer for the synthesis.

KEYWORDS: molecularly imprinted polymers, dopamine, molecular modeling

1. Imprintowane polimery

Technika molekularnej imprintacji pozwala otrzymać polimery zdolne do specyficznego oraz selektywnego wychwyty danej substancji. Wychwyt specyficzny to zdolność polimeru imprintowanego do adsorpcji określonej substancji z jednoskładnikowego roztworu tej substancji. Wychwyt selektywny to zdolność polimeru imprintowanego do adsorpcji określonej substancji z dwu- lub wieloskładnikowej mieszaniny.

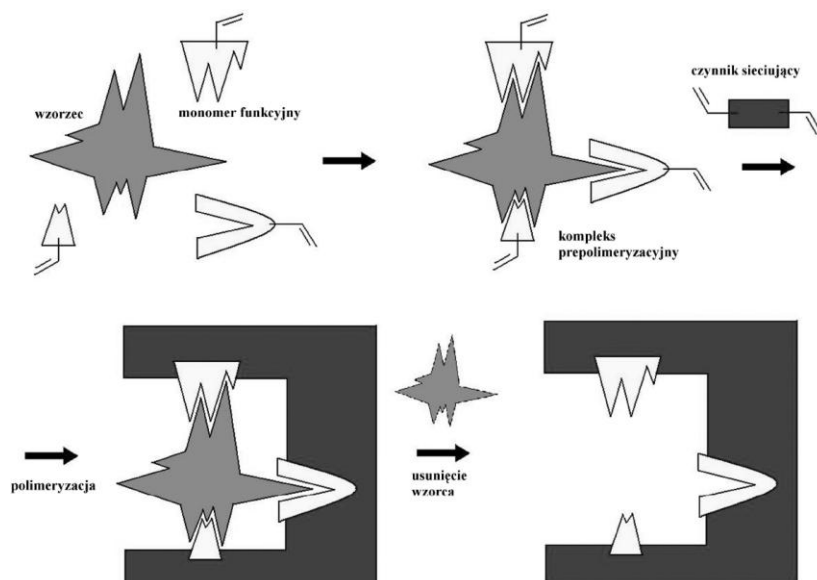
Molekuła wzorcowa zostaje rozpuszczona w wybranym rozpuszczalniku, czyli porożenie, razem ze zdolnymi do polimeryzacji monomerami funkcyjnymi. Dzięki oddziaływaniom niekowalencyjnym (oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe) lub wiązaniom kowalencyjnym pomiędzy wzorcem i monomerami tworzy się trwała struktura prepolimeryzacyjna, potocznie zwana kompleksem prepolimeryzacyjnym. Po

dobaniu czynnika sieciującego i zajściu właściwej reakcji polimeryzacji powstaje wysoce usieciowana struktura polimeru.

Usunięcie molekuly wzorcowej powoduje wytworzenie trójwymiarowych wnęk o kształcie komplementarnym do wzorca (Ryc. 1). Powstałe miejsca wychwyty są w stanie adsorbować i desorbować molekuly wzorca specyficzenie, selektywnie i wielokrotnie [1].

2. Zastosowanie imprintowanych polimerów

Rozpoznanie wzorca przez molekularnie imprintowane polimery (MIP) jest porównywalne z rozpoznaniem substratów przez naturalne receptory, przeciwciała czy enzymy. W porównaniu z metodami opartymi na wykorzystaniu naturalnych biomolekuł, zastosowanie MIP w analizie



Ryc. 1. Schemat procesu imprintacji molekularnej.

ma wiele zalet. Technika ich otrzymywania jest prosta i tania, polimery są stabilne chemicznie i fizycznie i mogą być przechowywane przez długi czas bez utraty swoich właściwości.

Molekularnie imprintowane polimery znalazły szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach analizy oraz w syntezie organicznej. Są wykorzystywane między innymi jako faza stała w chromatografii (HPLC, TLC), w elektrochromatografii, w tworzeniu syntetycznych sensorów, w testach immunoenzymatycznych oraz w katalizie organicznej. Szczególnie często są stosowane w ekstrakcji do fazy stałej (SPE), gdzie stanowią złoża, zdolne do izolacji i zagęszczenia analizowanej substancji. Są wykorzystywane do:

- izolowania i pozyskiwania substancji leczniczych pochodzenia roślinnego, np. flawonoidów glikozydowych z młodego dwuklapowego (*Ginkgo biloba*) czy alkaloidów purynowych z herbaty chińskiej (*Camellia sinensis*) [2, 3],
- izolowania i oznaczania substancji czynnych w materiale biologicznym, np. niesterydowych leków przeciwzapalnych w moczu [4],
- izolowania i oznaczania substancji toksycznych w materiale biologicznym, np. niektórych związków narkotyzujących [5],
- oznaczania ilościowego niektórych herbicydów, np. monosulfuronu i jego pochodnych z wody lub gleby [6],
- izolowania i identyfikacji substancji szkodliwych w żywności, np. związków stymulujących przyrost masy mięśniowej, dodawanych do pasz w hodowli zwierząt [7].

3. Dobór monomeru funkcyjnego do molekuly wzorcowej

W procesie imprintacji polimeru istotne jest odpowiednie dobranie grup funkcyjnych monomeru do grup funkcyjnych obecnych w molekułach wzorca (np. donory i akceptory wiązania wodorowego), w celu umożliwienia powstania trwałego kompleksu prepolimeryzacyjnego oraz zbudowania miejsc imprintacji. W przypadku jednoczesnego zastosowania w reakcji polimeryzacji dwóch lub

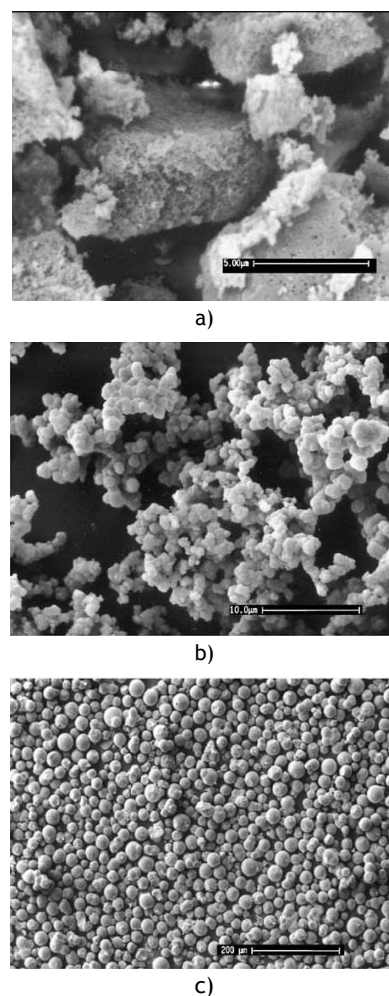
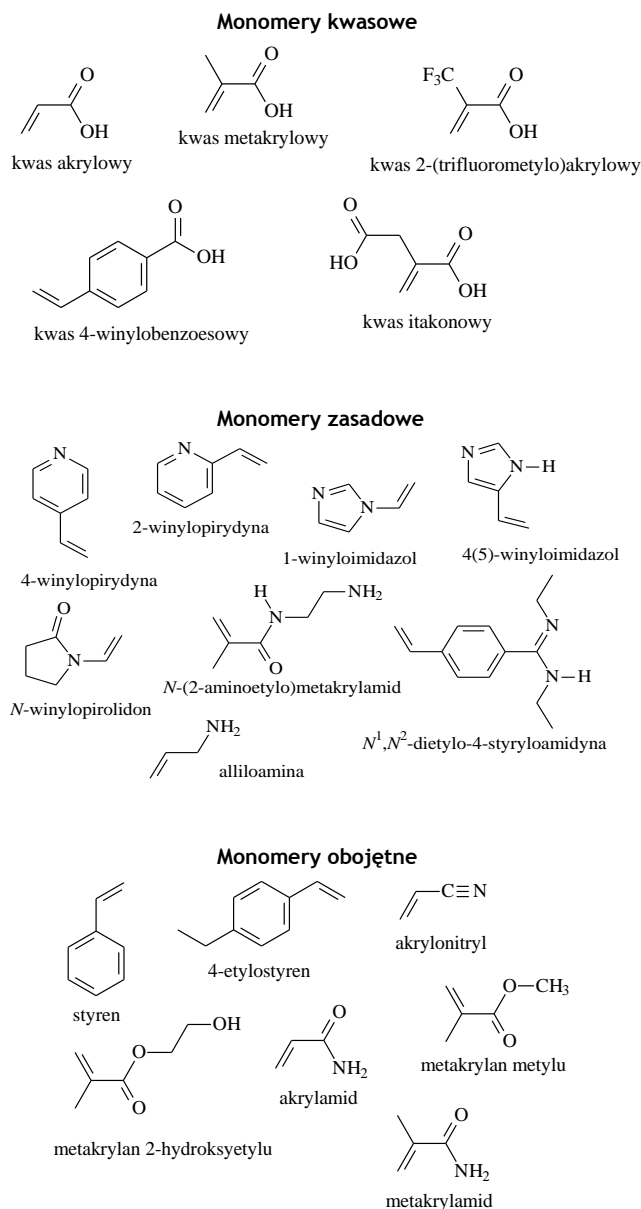
więcej rodzajów monomerów (kopolimeryzacja) należy uwzględnić stosunek reaktywności monomerów funkcyjnych. Względne reaktywności wielu monomerów zostały wyznaczone i stabelaryzowane oraz przedstawione w postaci stosunku reaktywności dla danych par monomerów. Stosunek reaktywności przyjmuje wartości od 0 do 1. Jeśli monomery funkcyjne posiadają zbliżoną reaktywność, ich udział w formowaniu łańcucha polimeru będzie zbliżony. Jeśli monomery różnią się znacznie reaktywnością, łańcuch polimerowy będzie tworzył głównie monomer o wyższej reaktywności. Liczne monomery funkcyjne, o różnych właściwościach fizykochemicznych, są dostępne jako handlowe produkty. Te z nietypowymi ugrupowaniami mogą być otrzymywane w laboratorium. Wybrane monomery funkcyjne zostały przedstawione na Ryc. 2.

3.1. Zastosowanie monomerów kwasowych

W procesie niekowalencyjnej imprintacji najczęściej stosowanym monomerem funkcyjnym jest kwas metakrylowy. Wynika to z faktu, że grupy karboksylowe mogą oddziaływać z innymi molekułami jako donory lub akceptory wiązania wodorowego, poprzez tworzenie par jonowych oraz oddziaływanie dipol - dipol.

Schirmer i Meisel [8] otrzymali imprintowany polimer w syntezie z kwasem metakrylowym jako monomerem funkcyjnym. Zastosowali technikę polimeryzacji w bloku. Jest to jedna z częściej stosowanych metod syntezy polimerów imprintowanych, ponieważ jest tania i prosta, jednakże otrzymywane ziarna mają nieregularny kształt (Ryc. 3).

Autorzy użyli polimeru jako sorbentu w ekstrakcji do fazy stałej chloramfenikolu z miodu. W celu oceny efektu imprintacji oraz wpływu fazy ruchomej na retencję chloramfenikolu przeprowadzili analizę RP-HPLC. Badanie wykazało, że polimer imprintowany ma wyższe powinowactwo do molekuly wzorcowej niż polimer kontrolny, a współczynnik wychwytu, oznaczający stosunek ilości chloramfenikolu zaadsorbowanego na polimerze imprintowanym do ilości zaadsorbowanego na polimerze kontrolnym, wynosi 2,2.



Ryc. 3. Zdjęcia z skaningowego mikroskopu elektronowego pokazujące ziarna polimerowe otrzymane w wyniku: a) polimeryzacji w bloku, b) polimeryzacji strąceniowej, c) polimeryzacji w zawiesinie [9], za zgodą wydawcy Elsevier.

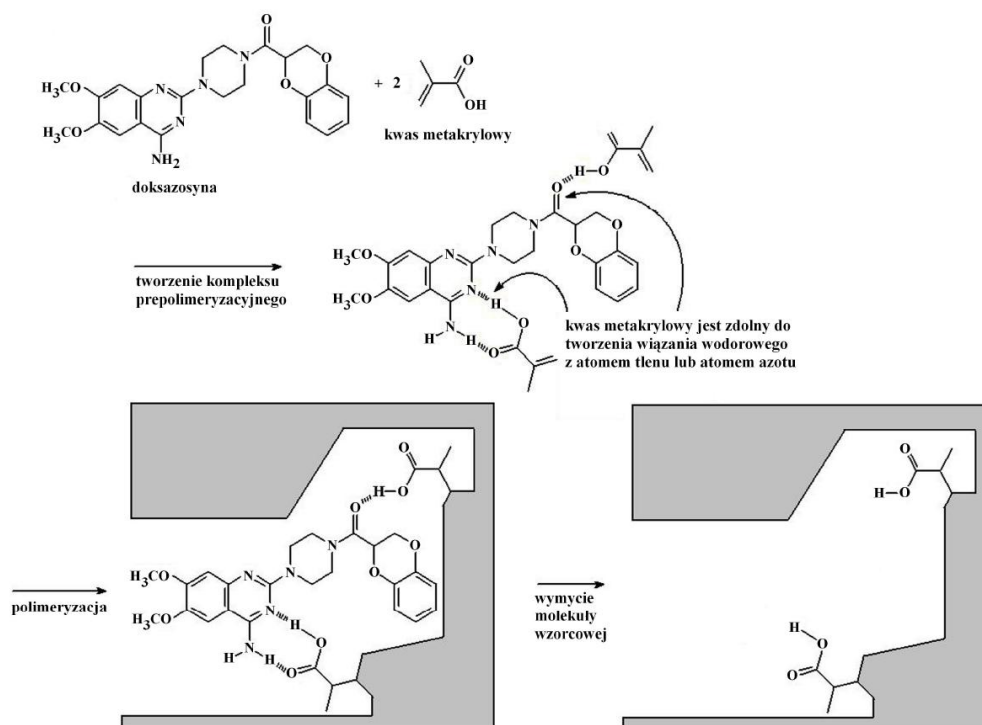
Ryc. 2. Wybrane monomery funkcyjne.

Wang i wsp. [10] otrzymali polimer imprintowany doksazosyną, używając w syntezie kwasu metakrylowego jako monomeru funkcyjnego.

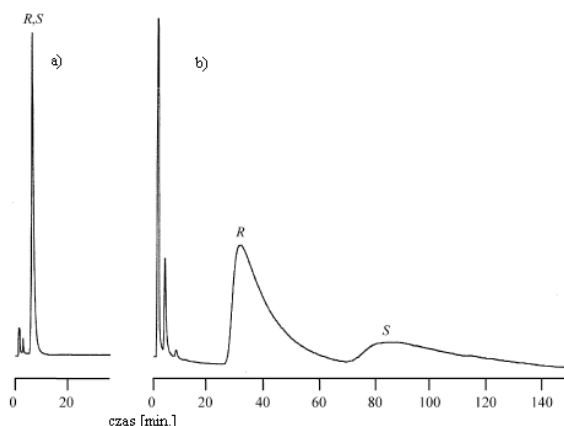
Autorzy otrzymali polimery stosując różną ilość składników mieszaniny prepolimeryzacyjnej, w celu zbadania wpływu ilości rozpuszczalnika, stosunku monomeru funkcyjnego do wzorca oraz ilości czynnika sieciującego. Największy wpływ na jakość polimeru miała ilość monomeru funkcyjnego. Gdy była zbyt mała, kompleksu prepolimeryzacyjnego było również zbyt mało. Optymalny stosunek molowy wzorca do monomeru wynosił 1:6. Autorzy wyjaśnili mechanizm imprintacji polimeru doksazosyną (Ryc. 4).

Dong i wsp. [11] wykorzystali kwas metakrylowy jako monomer funkcyjny do syntezy polimeru imprintowanego (-) efedryną, selektywnie wychwytyjącego (-)-efedrynę z wyciągu z ziela Przędzi chińskiej (*Ephedra sinica*). Poza (-)-efedryną zielenie zawiera (+)-pseudoefedrynę i inne związki. Polimer imprintowany wykazał dobrą selektywność i zdolność do chiralnego rozdzielenia enancjomerów: (-)-efedryny i (+)-pseudoefedryny.

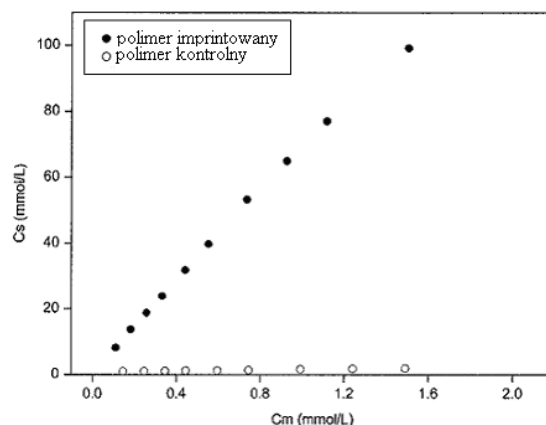
Sambe i wsp. [12] wykorzystali kwas metakrylowy i kwas 2-(trifluorometylo)akrylowy jako monomery do otrzymania polimerów imprintowanych (S)-nikotyną. Polimer został otrzymany metodą strąceniową. Metoda ta pozwala otrzymać regularne, okrągłe ziarna polimeru (Ryc. 3). Do dalszych badań zakwalifikowano polimer otrzymany z kwasu metakrylowego i sprawdzono jego zdolność wychwytywania nikotyny z dymu tytoniowego. Otrzymane chromatogramy (Ryc. 5) wskazują, że polimer imprintowany może efektywnie wychwytywać (S)-nikotynę. Ponadto polimer imprintowany jest w stanie selektywnie rozdzielić enancjomery: (R)-nikotynę i (S)-nikotynę (obecność oddzielnych pików obu enancjomerów).



Ryc. 4. Schemat syntezy polimeru imprintowanego doksazosyną [10].



Ryc. 5. Chromatogram rozdzielający enancjomerów: (R)-nikotyny i (S)-nikotyny na kolumnie: a) z polimerem kontrolnym, b) z polimerem imprintowanym [12], za zgodą wydawcy Elsevier.



Ryc. 6. Izoterma adsorpcji ibuprofenu na polimerze imprintowanym i kontrolnym, C_s - stężenie zaadsorbowanego ibuprofenu, C_m - stężenie niezaadsorbowanego ibuprofenu w roztworze [14].

3.2. Zastosowanie monomerów zasadowych

Najszerzej stosowane wśród monomerów zasadowych są 2- oraz 4-winylopirydyna. Monomery te mogą tworzyć z molekułą wzorcową wiązania wodorowe oraz tworzyć układ kwas-zasada. Jedną z przeszkód w stosowaniu tych monomerów są silne oddziaływania π - π , które prowadzą do powstania licznych oddziaływań niespecyficznych pomiędzy wzorcem i polimerem.

Caro i wsp. [13] wykorzystali 4-winylopirydynę jako monomer funkcyjny do syntezy polimeru imprintowanego kwasem 1-naftalenosulfonowym. Polimer został otrzymany w celu izolacji związków z grupy naftalenosulfonianów z próbek wody i został wykorzystany jako sorbent w ekstrakcji do fazy stałej. Badano selektywność procesu adsorpcji

naftalenosulfonianów oraz naftalenodisulfonianów i niektórych ich pochodnych. Autorzy zoptymalizowali etapy ekstrakcji do fazy stałej, określając m. in. warunki kondycjonowania, zależność pomiędzy wychwytem naftalenosulfonianów a pH wody na etapie nałożenia substancji oraz parametry przemycania i elucji.

W innej pracy Jin i Row [14] wykorzystali 4-winylopirydynę jako monomer funkcyjny do syntezy polimeru imprintowanego kwasem (+)-(S)-2-(4-izobutylofenylo)popionowym, czyli ibuprofenem. Autorzy porównali wychwyt ibuprofenu przez polimer imprintowany i kontrolny metodą stacjonarną przez wyznaczenie izotermy adsorpcji (Ryc. 6).

Polimer imprintowany znacznie lepiej adsorbował

wzorec niż polimer kontrolny, który praktycznie nie adsorbował ibuprofenu (białe punkty na wykresie).

3.3. Zastosowanie monomerów obojętnych

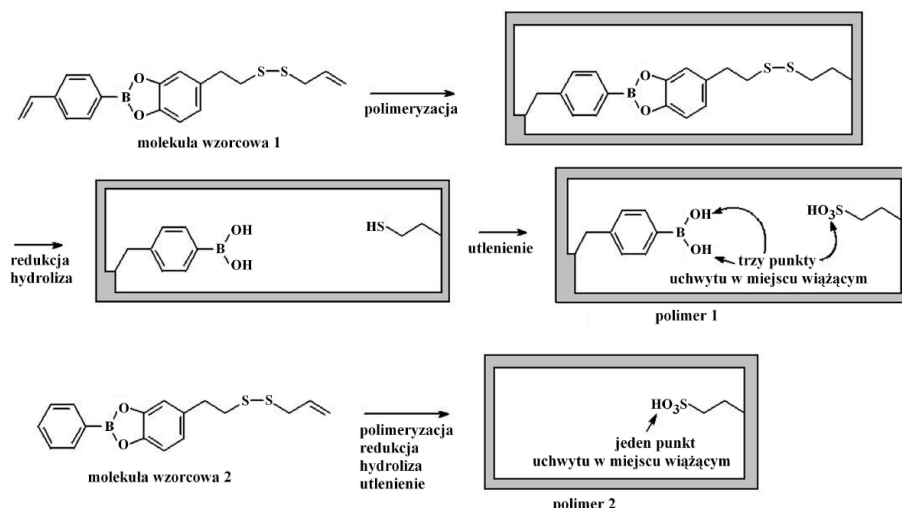
Zastosowanie w polimeryzacji różnych monomerów obojętnych dawało efektywną imprintację. Najlepsze rezultaty osiągnęto dla akrylamidu lub jego *N*-alkilowych pochodnych, szczególnie przy użyciu mało polarnych rozpuszczalników podczas polimeryzacji.

3.4. Molekularnie imprintowane polimery wiążące dopaminę

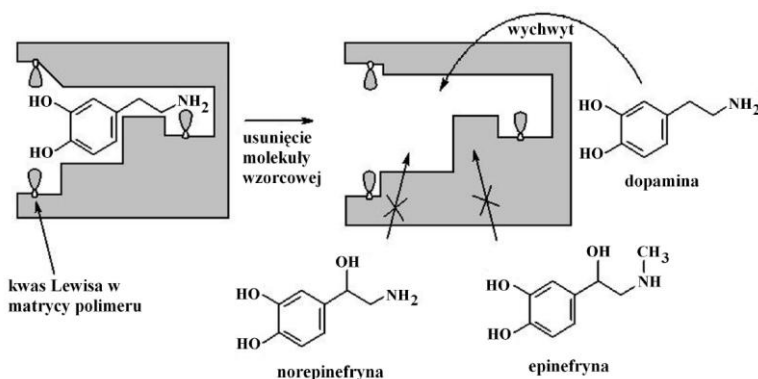
Takeuchi i wsp. [15] otrzymali drogą imprintacji kowalencyjnej polimery posiadające wnęki wiążące, odpowiadające dopaminie. Użyte molekuły wzorcowe były pochodnymi dopaminy, w których grupę aminową zastąpiono ugrupowaniem allilowym połączonym mostkiem disulfidowym, a grupy hydroksylowe związane ugrupowaniem 4-winylofenyloboranodiilowym (molekuła wzorcowa 1) lub fenylloboranodiilowym (molekuła wzorcowa 2) (Ryc. 7). Po reakcji polimeryzacji i przeprowadzeniu procesu hydrolizy wybranych wiązań w matrycy polimerów powstały miejsca imprintacji z terminalnymi grupami tiolowymi i dihydroksyboranowymi. W wyniku przeprowadzonej następnie modyfikacji postimprintacyjnej terminalna grupa tiolowa

została utleniona do grupy sulfonowej. Autorzy otrzymali dwa rodzaje polimerów: posiadający w miejscu wiążącym grupę $-SO_3H$ oraz grupę $-B(OH)_2$ (polimer 1) oraz posiadający wyłącznie grupę $-SO_3H$ (polimer 2). Otrzymano też polimer kontrolny, który zsyntetyzowano bez molekuły wzorcowej. Autorzy zbadali efektywność procesów postimprintacyjnych, wykorzystując otrzymane polimery jako wypełnienia kolumn chromatograficznych w metodzie HPLC. Wychwyt dopaminy był znacznie większy po przeprowadzeniu procesów postimprintacyjnych.

W innej pracy Ling i wsp. [16] otrzymali złożę wychytujące dopaminę, wykorzystując metodę imprintacji molekularnej żelu glinowo-krzemowego. Monomerem funkcyjnym był ortokrzmian tetraetylu, a molekułą wzorcową dopamina. Zwiększenie zdolności wychwytu wzorca przez polimer uzyskano przez dodatek chłorku glinu. W miejscu wiążącym zachodziły oddziaływania pomiędzy molekułą wzorcową a kwasem Lewisa. Badano selektywność polimeru dla siedmiu substancji: dopaminy, epinefryny, norepinefryny, kwasu askorbowego, kwasu homowanilinowego, kwasu moczowego i L-tyrozyny. Największy wychwyt dopaminy przez polimer imprintowany zaobserwowano przy pH 6,5. W tych warunkach polimer kontrolny nie wychwytywał wzorca. MIP wykazywał dobrą selektywność w stosunku do dopaminy w porównaniu z analizowanymi substancjami. Wnęki imprintowane dopaminą nie pozwalają



Ryc. 7. Schemat imprintacji dopaminą i modyfikacji postimprintacyjnej [15].



Ryc. 8. Wnęki imprintowane dopaminą nie adsorbują innych cząsteczek [16].

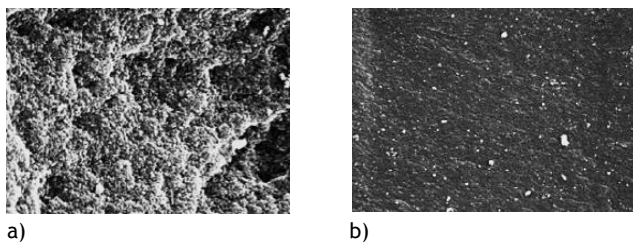
na dostęp większych molekuł, takich jak epinefryna i nor-epinefryna (Ryc. 8).

Suedee i wsp. [17] otrzymali przez kopolimeryzację kwasu metakrylowego i akrylamidu (monomery funkcyjne) oraz *N,N*-metylenobisakrylamidu (czynniki sieciujący), polimer imprintowany dopaminą wrażliwy na temperaturę. Zdolność rozpoznania molekuły wzorcowej polimeru w roztworze wodno-metanolowym zmieniała się wraz z temperaturą i polimer wykazał najwyższą selektywność w temperaturze 35°C. Podwyższenie temperatury powodowało również zwiększenie wychwytu specyficznego. Autorzy przebadali polimer jako adsorbent w ekstrakcji do fazy stałej dopaminy oraz innych związków: epinefryny, izoprotterenolu, salbutamolu i serotoniny. Dopamina i serotonina były silnie adsorbowane, natomiast inne badane związki zostały wymyte z polimeru w procesie przemycania.

Luliński i wsp. [18, 19] otrzymali przez kopolimeryzację kwasu metakrylowego jako monomeru funkcyjnego i dimetakrylanu etylenu jako czynnika sieciującego, polimer imprintowany chlorowodorkiem dopaminy. Polimer został zastosowany jako sorbent w ekstrakcji do fazy stałej katecholoamin z moczu.

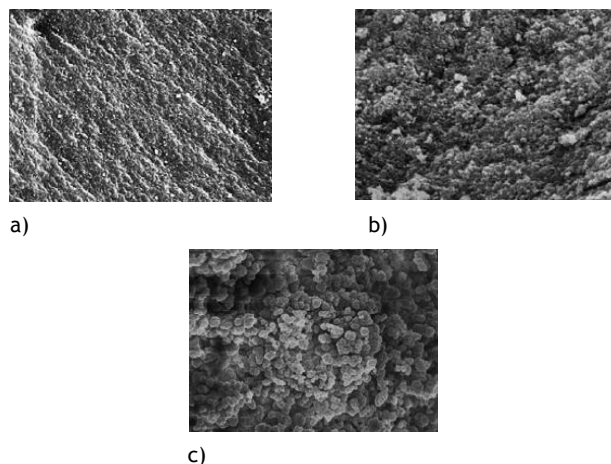
4. Struktura imprintowanych polimerów pod skaningowym mikroskopem elektronowym

Gonzalez i wsp. [20] zbadali wpływ różnych reagentów i warunków syntezy na strukturę otrzymanych polimerów imprintowanych digoksyną. Początkowo porównali strukturę powierzchni ziaren polimerów imprintowanego i kontrolnego otrzymanego z kwasu metakrylowego techniką polimeryzacji w bloku z fotochemiczną inicjacją procesu wolnorodnikowego. Oba polimery miały różne powierzchnie widoczne pod skaningowym mikroskopem elektronowym. Ilustruje to Ryc. 9.



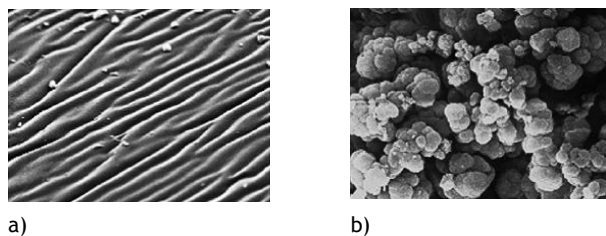
Ryc. 9. Zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego pokazujące powierzchnię polimeru: a) imprintowanego, b) kontrolnego [20], za zgodą wydawcy Elsevier.

Istotnym czynnikiem wpływającym na jakość otrzymanych polimerów był rodzaj i ilość użytego w syntezie rozpuszczalnika, zwanego porogiem. Najpierw autorzy zbadali wpływ dwóch różnych porogów: dichlorometanu i acetonitrylu. Użycie acetonitrylu powodowało powstanie większej ilości mikroporów, a więc kanalików o średnicy poniżej 20 Å, natomiast zastosowanie dichlorometanu dawało polimer o powierzchni ziaren dość gładkiej i jednolitej. Następnie przeanalizowali wpływ stosunku ilości porogenu do monomeru. Większa ilość porogenu powodowała powstanie ziaren okrągłych i jednorodnych (Ryc. 10).



Ryc. 10. Zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego pokazujące polimery otrzymane z użyciem porogów: a) dichlorometanu, b) acetonitrylu, c) acetonitrylu (w podwójnej ilości) [20], za zgodą wydawcy Elsevier.

Autorzy porównali również dwa polimery imprintowane digoksyną, pierwszy otrzymany z 2-winylopirydyny jako monomeru funkcyjnego i drugi z kwasu metakrylowego. W celu wyznaczenia powinowactwa imprintowanego polimeru do digoksyny, autorzy przeprowadzili badania wychwytu metodą stacjonarną, polegające na inkubowaniu określonej ilości polimeru w odpowiednim roztworze wzorcowym. Polimer otrzymany z kwasu metakrylowego wykazywał wysoki wychwyt specyficzny. Natomiast w polimerze z 2-winylopirydyny nie powstały miejsca specyficznego wychwytu. Autorzy porównali morfologię obu polimerów używając skaningowego mikroskopu elektronowego. Ryc. 11 przedstawia uzyskany obraz badanych polimerów.

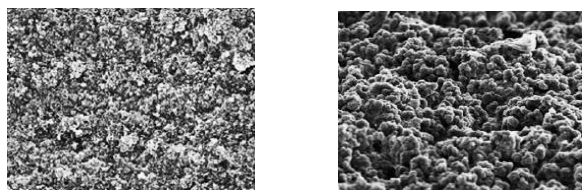


Ryc. 11. Zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego pokazujące polimery otrzymane w wyniku: a) polimeryzacji z 2-winylopirydyną, b) polimeryzacji z kwasem metakrylowym [20], za zgodą wydawcy Elsevier.

Polimer otrzymany z 2-winylopirydyny był twardszy, jego struktura zwarta, a powierzchnia gładka z równoległymi rowkami. Natomiast polimer otrzymany z kwasu metakrylowego przypominał konglomerat okrągłych ziaren o strukturze porowatej, z małymi szczelinami pomiędzy konglomeratami. Taka morfologia polimerów dobrze korelowała z obserwowaną wartością wychwytu.

Ostatnim analizowanym parametrem był wpływ metody inicjacji reakcji polimeryzacji. Autorzy zastosowali fotochemiczną inicjację procesu polimeryzacji (UV, 365 nm, temp. 10°C, 24 godz.) oraz termiczną inicjację pro-

cesu polimeryzacji (temp. 60°C, 20 godz.). Ryc. 12 przedstawia powierzchnię otrzymanych polimerów. Polimer termostatowany w temperaturze 60°C charakteryzuje się powierzchnią bardziej zróżnicowaną z większą ilością wgłębień.



a)

b)

Ryc. 12. Zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego pokazujące polimery otrzymane w wyniku polimeryzacji inicjowanej: a) fotochemicznie, b) termicznie [20], za zgodą wydawcy Elsevier.

5. Modelowanie molekularne w syntezie molekularnie imprintowanych polimerów

Do optymalizacji parametrów układu prepolimerizacyjnego, a więc wyboru monomeru funkcyjnego, porożenu i stosunku molowego wzorca do monomeru, zastosowano teoretyczną analizę interakcji zachodzących pomiędzy składnikami układu.

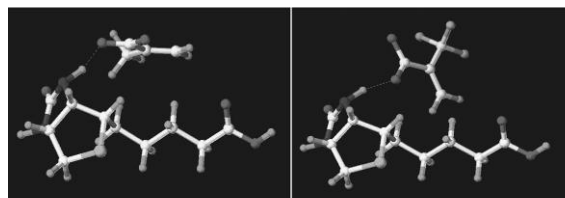
Piletska i wsp. [21] zaprojektowali i otrzymali na drodze syntezy polimer wychwytyjący biotynę. Skład mieszaniny polimerizacyjnej został zoptymalizowany przy użyciu programu Sybyl 6.9.

Celem autorów była synteza polimeru, który zachowywałby swoje właściwości adsorbcyjne w środowisku wodnym. Środowisko wodne stwarza trudności w otrzymaniu polimerów posiadających wnęki o zdefiniowanym kształcie, ponieważ molekuly rozpuszczalnika i monomeru współzawodniczą w oddziaływaniu z ugrupowaniami funkcyjnymi wzorca. W wodzie, w porównaniu z rozpuszczalnikiem organicznym, następuje odmienny wzrost łańcuchów polimeru. W konsekwencji polimer charakteryzuje się inną strukturą wewnętrzną i odmienną morfologią, co powoduje różnice w budowie miejsc wychwytu. Autorzy przeprowadzili obliczenia w celu wybrania monomerów, które wytworzą silne wiązania z molekulą wzorcową w środowisku wodnym. W pierwszym etapie została wymodelowana cząsteczka wzorca, (+)-biotyny i cząsteczek 21 najczęściej stosowanych monomerów funkcyjnych. Energię zminimalizowano na poziomie mechaniki molekularnej. Środowisko wodne symulowano wprowadzając do obliczeń stałą dielektryczną wody, $\epsilon = 80$. Zdefiniowano struktury kompleksów monomer-molekula wzorcowa i obliczono energię ich tworzenia.

Monomerami zdolnymi do formowania najsilniejszych kompleksów okazały się kwas metakrylowy, kwas 2-(trifluorometylo)akrylowy i kwas 2-akrylamido-2-metylopropanosulfonowy (Ryc. 13). Oddziaływały one ze wzorcem w środowisku wodnym, tworząc wiązania wodorowe.

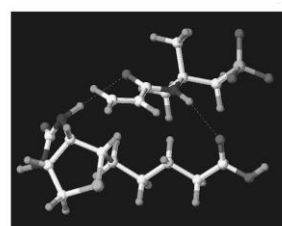
Polimery imprintowane i odpowiadające im polimery kontrolne, zostały otrzymane z wytypowanych monomerów i zbadane w kierunku wychwytu (+)-biotyny. Rezultaty wykazały dobrą korelację między teoretyczną energią polimerach. Najlepszy wynik otrzymano dla kwasu metakrylowego, który wykazywał największą energię kompleksowania i wyznaczonymi eksperymentalnie wartościami stałych dysocjacji kompleksów w odpowiednich poli-

merach. Najlepszy wynik otrzymano dla kwasu metakrylowego, który wykazywał największą energię wiązania z molekulą wzorcową. Stałe dysocjacji dla każdego z polimerów imprintowanych były względnie niskie. Wartości uzyskane dla eksperymentu przeprowadzonego w środowisku wodnym są o cztery rzędy wielkości niższe niż wartości stałych dysocjacji dla polimerów imprintowanych biotyną w rozpuszczalniku organicznym. Siła oddziaływań monomer-wzorec okazała się jednym z najważniejszych czynników warunkujących sukces imprintacji.



a)

b)



c)

Ryc. 13. Zaprojektowane struktury kompleksów (+)-biotyny z monomerami: a) kwasem metakrylowym, b) kwasem 2-(trifluorometylo)akrylowym, c) kwasem 2-akrylamido-2-metylopropanosulfonowym [21], za zgodą wydawcy Elsevier.

W innej pracy Piletska i wsp. [22] zaprojektowali i otrzymali techniką imprintacji molekularnej polimery zdolne adsorbować substancje uzależniające: deoksyfedrynę, metadon, kokainę i morfinę. Modelowanie układów monomer-wzorec zostało przeprowadzone w kilku etapach. Z biblioteki monomerów funkcyjnych wybrano te, które potencjalnie tworzyły najsilniejsze oddziaływania z molekulą wzorcową. Następnie, przy użyciu dynamiki molekularnej, wymodelowano sposób ułożenia monomerów wokół wzorca. Na podstawie ponownie obliczonej wartości energii kompleksowania wybrano najlepsze układy monomer-wzorec. Dla kokainy wybrano kompleks z kwasem itakonowym i akrylamidem, dla deoksyfedryny kompleks z kwasem itakonowym w kombinacji z metakrylanem 2-hydroksyetylu lub akrylamidem, dla metadonu odpowiednie okazały się dwa kompleksy: z mieszaniną kwasu metakrylowego i akrylamidu lub z mieszaniną kwasu metakrylowego i metakrylanu 2-hydroksyetylu, a dla morfiny najlepszymi monomerami były kwas metakrylowy i metakrylan 2-hydroksyetylu. Kolejny etap stanowiła synteza polimerów o składzie odpowiadającym teoretycznej analizie. Otrzymane polimery przebadano metodą HPLC. Niektóre polimery odrzucono, ze względu na zbyt silne wiązanie wzorca (deoksyfedryna i kwas itakonowy) lub brak powinowactwa do molekuly wzorcowej (akrylamid). Najlepsze wyniki zostały osiągnięte dla kombinacji monomerów: kwas itakonowy i akrylamid dla polimeru imprintowanego kokainą. Natomiast wszystkie polimery imprintowane miały wyższe powinowactwo do odpowiednich wzorców niż polimer kontrolny, co świadczyło o tym, iż miejsca wiążące zostały utworzone.

Wu i wsp. [23] zbadali wpływ porogenu na powinowactwo i selektywność polimeru imprintowanego nikotynamidem. Monomerem funkcyjnym był kwas metakrylowy. Wyznaczono energię oddziaływania między monomerem funkcyjnym a wzorcem na poziomie DFT w różnych porogach: metanolu, acetonitrylu, chloroformie i toluenie oraz w próżni. Następnie dla zsyntetyzowanych polimerów zastosowanych jako wypełnienia kolumn chromatograficznych wyznaczono współczynniki retencji i selektywności nikotynamidu i jego analogów. Zaobserwowano dobre korelacje pomiędzy teoretycznymi energiami kompleksowania a współczynnikami retencji i selektywności. Jeżeli porogen miał słabą zdolność tworzenia wiązań wodorowych (toluen, chloroform, acetonitril), energia oddziaływania zależała głównie od stałej dielektrycznej rozpuszczalnika, natomiast jeśli porogen wykazywał dużą zdolność tworzenia wiązań wodorowych (metanol), na energię tworzenia kompleksu wpływała stała dielektryczna rozpuszczalnika i siła wiązań wodorowych. W konkluzji stwierdzono, że porogeny aprotyczne, o niskiej stałej dielektrycznej, pozwalają na powstanie kompleksu o wysokiej energii kompleksowania, a polimer otrzymany w takim środowisku charakteryzuje się dobrą selektywnością i dużym powinowactwem dla wzorca.

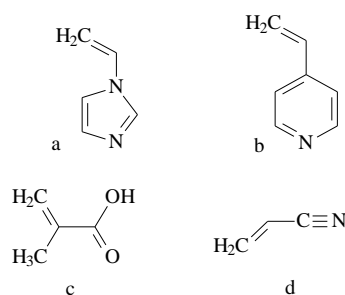
6. Część eksperymentalna

Celem pracy była synteza różnych polimerów i zbadanie ich powinowactwa do dopaminy, a następnie powiązanie właściwości polimerów z teoretycznymi energiami tworzenia kompleksów prepolimeryzacyjnych.

6.1. Synteza polimerów

Syntezę przeprowadzono dla czterech monomerów funkcyjnych, których struktury chemiczne przedstawiono na Ryc. 14.

Synteza prowadzona była z zastosowaniem techniki polimeryzacji w bloku. Wolnorodnikową reakcję polimeryzacji kolejnych monomerów funkcyjnych z czynnikiem sieciującym w obecności chlorowodoru dopaminy w wybranym rozpuszczalniku inicjowano termicznie przy użyciu wybranych inicjatorów: 2,2'-azobis(izobutyronitrylu) i chlorowodoru 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)opropanu].



Ryc. 14. Struktury chemiczne monomerów funkcyjnych użytych w syntezach: a) 1-winyloimidazol, b) 4-winylopirydyna, c) kwas metakrylowy, d) akrylonitryl.

Czynnikiem sieciującym był dimetakrylan etylenu. W ten sposób powstawał polimer imprintowany (MIP). Polimer kontrolny (NIP) otrzymywano w identycznych warunkach, lecz bez udziału chlorowodoru dopaminy. Wydajności

syntez były ilościowe. Reakcję polimeryzacji prowadzono w układzie rozpuszczalników metanol-woda w stosunku objętościowym 87,5:12,5% v/v. Zastosowanie układu metanol-woda zostało wymuszone przez znikomą rozpuszczalność chlorowodoru dopaminy (wzorca) w rozpuszczalnikach organicznych. Ryc. 15 przedstawia schemat przeprowadzonych reakcji polimeryzacji.

6.2. Przygotowanie polimerów do badań

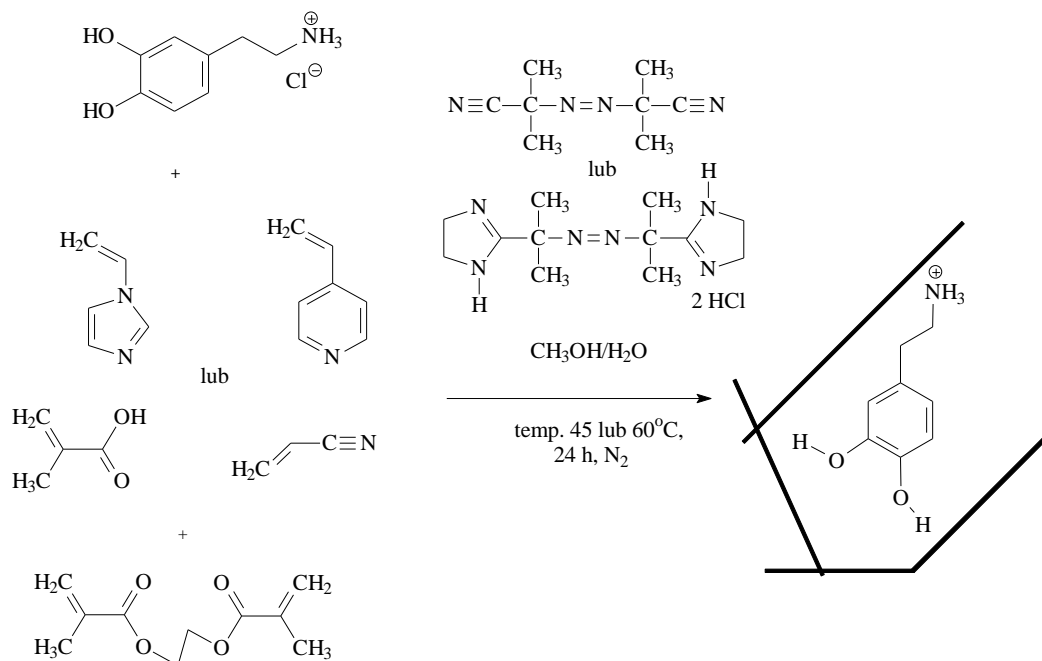
Otrzymaną bryłę polimeru roztarto, powstałe ziarna przesiano przez sito analityczne i rozdzielono przez sedymentację. Kolejny etap to usunięcie molekuly wzorca z otrzymanego polimeru. Polimery imprintowane były ekstrahowane w celu usunięcia dopaminy. Podobnej obróbce poddano polimery kontrolne, w celu zapewnienia właściwych warunków do porównania obu typów polimerów. Ostatnim etapem było suszenie polimerów.

6.3. Badanie wychwytu chlorowodoru dopaminy przez polimery otrzymane w syntezie z zastosowaniem różnych monomerów funkcyjnych

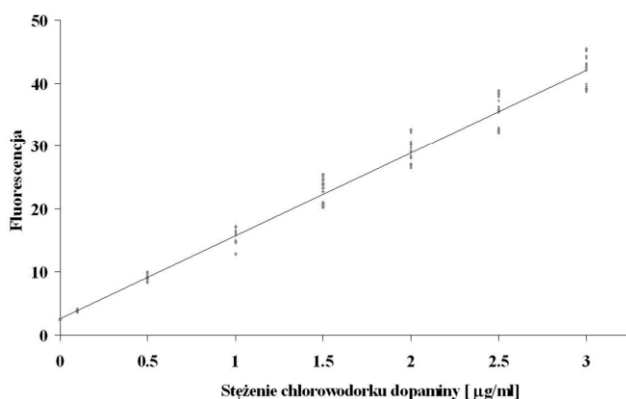
Analizę adsorpcji chlorowodoru dopaminy przez otrzymane polimery prowadzono metodą stacjonarną. Określoną ilość polimeru umieszczono w fiolce Eppendorfa i dodano 1 ml roztworu chlorowodoru dopaminy o określonym stężeniu. Otrzymane w ten sposób próbki wytrząsano przez 3 godziny. Następnie polimer odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, pobrano 0,4 ml przesącza, który rozcieńczono do 4 ml. Zmierzono fluorescencję roztworów metodą spektrofлуorymetryczną ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 315 \text{ nm}$), a stężenie chlorowodoru dopaminy wyznaczono z prostej wzorcowej. W tym celu wyznaczono funkcję $A = f(x)$ przedstawiającą zależność fluorescencji (A) od stężenia chlorowodoru dopaminy w roztworze (x) przy użyciu programu Microsoft Excel (Ryc. 16).

Otrzymano prostą $A = 13,20x + 2,46$; współczynnik korelacji wyniósł $R^2 = 0,986$, granica wykrywalności (LOD) $0,044 \mu\text{g/ml}$, a granica oznaczalności (LOQ) $0,132 \mu\text{g/ml}$ ($n = 240$).

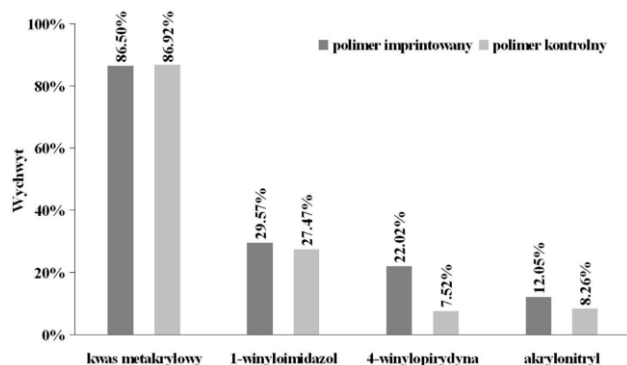
Przeanalizowano wychwyt polimerów imprintowanych i kontrolnych otrzymanych w syntezach z zastosowaniem różnych monomerów funkcyjnych (Ryc. 17). Najwyższy wychwyt zaobserwowano dla polimeru otrzymanego z kwasu metakrylowego jako monomeru funkcyjnego. Wychwyt na polimerze imprintowanym i kontrolnym był zbliżony, a obie wartości wyniosły odpowiednio 86,5% i 86,9%. W przypadku 1-winyloimidazolu analogiczne wartości wychwyty były znacząco niższe, odpowiednio 29,6% i 27,5%. W przypadku polimeru otrzymanego z 4-winylopirydyny stwierdzono znacząco wyższy wychwyt na polimerze imprintowanym niż na polimerze kontrolnym, wartości wyniosły odpowiednio 22,0% i 7,5%. Obliczony dla tych wartości współczynnik wychwyty wyniósł 2,95. Wartość tego współczynnika jest wysoka i wskazuje jednoznacznie na obecność miejsc imprintacji w matrycy polimeru imprintowanego. W przypadku polimeru otrzymanego z akrylonitrylu wartości wychwyty były najniższe wśród omawianych par polimerów i wyniosły odpowiednio 12,1% i 8,3%.



Ryc. 15. Schemat przeprowadzonych reakcji polimeryzacji.



Ryc. 16. Prosta wzorcowa dla wodnego roztworu chlorowodoru dopaminy.



Ryc. 17. Porównanie wychwytu polimerów otrzymanych w reakcji wybranych monomerów funkcyjnych.

Wszystkie wyniki pochodzą z dwóch niezależnych syntez każdej pary polimerów (imprintowanego i kontrolnego) dla każdego badanego monomeru funkcyjnego. Badania były wykonywane trzykrotnie ($n = 3$).

7. Analiza teoretyczna kompleksów prepolimeryzacyjnych

Przy użyciu narzędzi programu Hyperchem 7.0 przeprowadzono analizę teoretyczną kompleksów prepolimeryzacyjnych. Obliczenia wykonano na poziomie półempirycznym metodą PM3. Najpierw wymodelowano trójwymiarowe struktury analizowanych molekuł: molekuły wzorcowej czyli kationu dopaminy oraz monomerów funkcyjnych: kwasu metakrylowego, 1-winyloimidazolu, 4-winylopirydyny oraz akrylonitrylu (Ryc. 18). Rozpatrywano różne konformacje kationu dopaminy, różniące się ułożeniem atomów wodoru grup -OH, które oznaczono kolejno symbolami: α , β , γ .

Energię cząsteczek minimalizowano aż do momentu do osiągnięcia zmian energii poniżej 0,001 kcal/mol metodą sprzężonych gradientów Polak-Ribiere'a. Następnie utworzono kompleksy wzorca z różną ilością monomerów funkcyjnych. Geometrie wejściowe kompleksów tworzone w taki sposób, aby odległości między atomami uczestniczącymi w oddziaływaniach wynosiły około 2,0 Å. Minimalizację energii kompleksów przeprowadzono według tej samej procedury. Entalpię tworzenia kompleksów (ΔH) obliczono według poniższego wzoru:

$$\Delta H = \Delta H_{\text{kompleksu}} - n \Delta H_{\text{monomeru funkcyjnego}} - \Delta H_{\text{kationu dopaminy}}$$

gdzie n oznacza liczbę cząsteczek monomeru funkcyjnego w kompleksie

W Tabeli 1 przedstawiono wyniki obliczeń.



Różne konformacje kationu dopaminy.

Ryc. 18. Modele teoretyczne kationu dopaminy oraz monomerów funkcyjnych: a) kwasu metakrylowego, b) 4-winylopirydyny, c) 1-winyloimidazolu, d) akrylonitrylu.

Tabela 1. Energie kompleksów kationów dopaminy z monomerami funkcyjnymi: a) dwie cząsteczki monomeru przy grupach hydroksylowych oraz jedna cząsteczka monomeru przy atomie wodoru grupy aminowej, b) trzy cząsteczki monomeru przy atomach wodoru grupy aminowej.

Skład kompleksu	ΔH [kcal/mol]
Kation dopaminy α + 3 cząsteczki kwasu metakrylowego	a -36,25
	b brak
Kation dopaminy α + 3 cząsteczki 4-winylopirydyny	a -35,35
	b -49,27
Kation dopaminy α + 3 cząsteczki 1-winyloimidazolu	a -42,21
	b -59,01
Kation dopaminy α + 3 cząsteczki akrylonitrylu	a -30,46
	b brak
Kation dopaminy β + 3 cząsteczki 4-winylopirydyny	a -32,83
	b -47,18
Kation dopaminy β + 3 cząsteczki 1-winyloimidazolu	a -41,32
	b -58,62
Kation dopaminy γ + 4 cząsteczki 4-winylopirydyny	-54,84
Kation dopaminy γ + 4 cząsteczki 1-winyloimidazolu	-70,16
Kation dopaminy α + 5 cząsteczek kwasu metakrylowego	-64,68
Kation dopaminy α + 5 cząsteczek 4-winylopirydyny	-61,64
Kation dopaminy α + 5 cząsteczek 1-winyloimidazolu	-74,34
Kation dopaminy α + 5 cząsteczek akrylonitrylu	-55,20
Kation dopaminy β + 5 cząsteczek 4-winylopirydyny	-58,66
Kation dopaminy β + 5 cząsteczek 1-winyloimidazolu	-70,73

7. Wnioski

Przeprowadzone badania wychwytu chlorowodoru dopaminy oraz analiza teoretyczna energii tworzenia kompleksów prepolimeryzacyjnych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- rodzaj monomeru funkcyjnego w istotny sposób wpływa na wychwyt specyficzny otrzymanych polimerów,
- najwyższym wychwytem specyficznym określonym metodą stacjonarną charakteryzował się polimer otrzymany z 4-winylopirydyny jako monomeru funkcyjnego,
- polimery (imprintowany i kontrolny) otrzymane z kwasu metakrylowego adsorbowały największą ilość chlorowodoru dopaminy, jednak był to wychwyt niespecyficzny,
- najtrwalszy kompleks powstaje pomiędzy kationem dopaminy β a 5 cząsteczkami 1-winyloimidazolu,
- wyniki otrzymane w analizie teoretycznej zadowalająco korelują z wynikami badań eksperymentalnych, mimo że założony model obliczeniowy nie uwzględnił wielu czynników wpływających na właściwości kompleksu prepolimeryzacyjnego (np.: wpływu roz-

puszczalników, innych składników układu, temperatury).

WYKAZ SKRÓTÓW

RP-HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>)
TLC	- chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
SPE	- ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid phase extraction</i>)
MIP	- molekularnie imprintowany polimer (ang. <i>molecularly imprinted polymer</i>)
NIP	- kontrolny polimer nieimprintowany (ang. <i>non-imprinted polymer</i>)
DFT	- teoria obliczeń kwantowych oparta na funkcjonalach gęstości elektronowej (ang. <i>density functional theory</i>)
LOD	- granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i>)
LOQ	- granica oznaczalności (ang. <i>limit of quantification</i>)
PM3	- półempiryczna metoda obliczeń kwantowych (ang. <i>parametric model 3</i>)

BIBLIOGRAFIA

- Spivak D. A. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 1779.
- Xie J., Zhu L., Luo H., Zhou L., Li C., Xu X. J. *Chrom. A*, **2001**, 934, 1.
- Wang D., Hong S. P., Row K. H. *Korean J. Chem. Eng.*, **2004**, 21, 853.
- Caro E., Marce R. M., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Borrull F. *J. Chrom. B*, **2004**, 813, 137.
- Zurutuza A., Bayoudh S., Cormack P. A. G., Dambies L., Deere J., Bischoff R., Sherrington D. C. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 14.
- Liu X., Ouyang C., Zhao R., Shangguan D., Chen Y., Liu G. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 571, 235.
- Berggren C., Bayoudh S., Sherrington D., Ensing K. J. *Chrom. A*, **2000**, 889, 105.
- Schirmer C., Meisel H. J. *Chrom. A*, **2006**, 1132, 325.
- Perez-Moral N., Mayes A. G. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 15.
- Wang H. Y., Jiang J. G., Ma L. Y., Pang Y. L. *React. & Funct. Polym.*, **2005**, 64, 119.
- Dong X., Wang W., Ma S., Sun H., Li Y., Guo J. J. *Chrom. A*, **2005**, 1070, 125.
- Sambe H., Hoshina K., Moaddel R., Wainer I. W., Haginaka J. J. *Chrom. A*, **2006**, 1134, 88.
- Caro E., Marce R. M., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Borrull F. *J. Chrom. A*, **2004**, 1047, 175.
- Jin Y., Row K. H. *Korean J. Chem. Eng.*, **2005**, 22, 264.
- Takeuchi T., Murase N., Maki H., Mukawa T., Shinmori H. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 565.
- Ling T., Syu Y. Z., Tasi Y., Chou T., Liu C. *Biosens. Bioelectr.*, **2005**, 21, 901.
- Suedee R., Seechamnaturakit V., Canyuk B., Ovatlarnporn C., Martin G. P. J. *Chrom. A*, **2006**, 1114, 239.
- Luliński P., Maciejewska D., Bamburowicz-Klimkowska M., Szutowski M. *Ninth Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, EC-SOC-9*, 1-30 Nov., 2005, B-001.
- Luliński P., Maciejewska D., Bamburowicz-Klimkowska M., Szutowski M. *Molecules*, **2007**, 12, 2434.
- Gonzalez G. P., Hernando P. F., Durand Alegria J. S. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 557, 179.
- Piletska E., Piletsky S., Karim K., Terpetschnig E., Turner A. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 179.
- Piletska E. V., Romero-Guerra M., Chianella I., Karim K., Turner A. P. F., Piletsky S. A. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 111.
- Wu L., Zhu K., Zhao M., Li M. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 549, 39.