

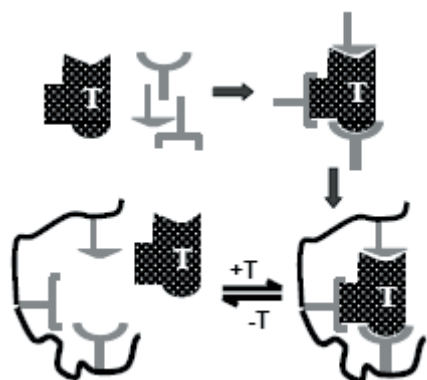
Molekuláris lenyomatú polimerek: kombinatorikus előállítás, nemlineáris kromatográfia és pszeudo-immunanalitika

TÓTH Blanka, PAP Tímea, HORVÁTH Viola*, HORVAI György

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Kémiai Informatika Tanszék és *MTA Műszaki Analitikai Tanszéki Kutatócsoport 1111, Budapest Szt. Gellért tér 4.

Bevezetés

A molekuláris lenyomatú polimerek („molecularly imprinted polymer”, MIP) szelektív szorbensek. Különleges tulajdonságaikat előállítási módjuknak köszönhetik. A polimert a szelektíven megkötni kívánt anyag – ami lehet viszonylag egyszerű szerves molekula, pl. gyógyszer vagy növényvédőszer, de lehet akár makromolekula vagy sejt is – jelenlétében állítják elő. Kovalens kötésen alapuló lenyomatképzés esetén a célmolekula („templát”) és a monomerek között előzetesen alakítanak ki reverzibilis kovalens kötést, ami a templát és a monomerek kapcsolódási módját és geometriáját rögzíti. Nemkovalens kölcsönhatáson alapuló lenyomatképzéskor a monomer(ek) és a közeg célszerű megválasztásával általában elérhető, hogy a polimerizációs elegyben a megköendő anyag és a monomer molekulák között önrendeződés révén jelentős intermolekuláris kölcsönhatások jöjjenek létre. Az így kialakult térbeli elrendezés a polimerizáció során keresztlinkáló segítségével rögzül, kialakul a szilárd polimer, a MIP.

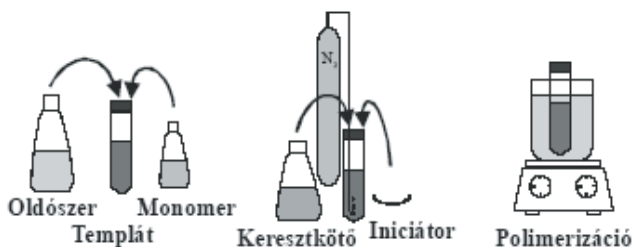


1. Ábra. A molekuláris lenyomatképzés sematikus menete (T=templát)

A templátot a MIP-hez kötő reverzibilis vagy másodlagos kötőerők valamilyen alkalmas, többnyire kompetitív reagens segítségével megbonthatók, és így a megkötött anyag a polimerről leoldható. Visszamaradnak azonban a már kialakult kötőhelyek, vagyis a kiválasztott anyag térbeli és kémiai lenyomata. Ezért beszélünk molekuláris lenyomatképzésről. A polimer a templátot képes oldataiból szelektíven adszorbeálni az említett lenyomatszerű kötőhelyekre. Az adszorbeált anyag azután alkalmas lemosószerrel ismét eltávolítható. Így a molekuláris lenyomatú polimer újrahasználható.

A molekuláris lenyomatú polimerek iránti nagy érdeklődést elsősorban az indokolja, hogy a fent ismertetett eljárás szinte bármilyen molekulára szelektív szorbens előállítását lehetővé teszi az önrendeződési elv alapján, azaz a bonyolult

szintézisek elkerülésével. A MIP készítés legegyszerűbb módja a tömbpolimerizációs előállítás (2. ábra). Az első lépés a templát, az oldószer és a monomer összekeverése, ekkor kialakulnak a templát-monomer komplexek. Ezután adjuk hozzá a keresztlinkáló és az iniciátort, majd oxigénmentesített (általában nitrogénnel) atmoszférában lejártszátjuk a polimerizációt. A kapott tömbpolimert összetörjük és szitáljuk, majd a templátot kioldjuk belőle.



2. Ábra. A polimer szintézis menete (nem kovalens kölcsönhatáson alapulva).

Az így kapott szemcsés szorbens fizikai és kémiai módszerekkel tesztelhető (szemcseméret, pórusméret eloszlás, sűrűség, valamint - kromatográfias vagy szilárd fázisú extrakció (SPE) oszlopba töltve - elúciós és szelektivitás jellemzők), de a gyakorlati felhasználás és nagy mennyiségben való előállítás hatékonyabb módszerek kifejlesztését igényli.

Az 1. táblázatban néhány példát mutatunk be molekuláris lenyomatú polimerekre és azok lehetséges alkalmazására. A téma bőséges irodalmából csupán néhány friss összefoglaló közleményt¹⁻⁵, egy könyvet⁶ és két magyar nyelvű értekezést⁷⁻⁸ említünk.

Közleményünkben a továbbiakban csak a kis molekulák nemkovalens kölcsönhatáson alapuló polimer lenyomataival foglalkozunk. Célunk bemutatni néhány új, általános módszert e különleges polimerek előállítására és alkalmazására. Hangsúlyosan tárgyaljuk azokat a módszereket és számítási eredményeket, amelyek létrejöttében aktívan részt vettünk.

A nemkovalens lenyomatképzés technológiájából adódóan a kapott polimerek sajátos tulajdonságokkal rendelkeznek. Az önrendeződés a tapasztalatok szerint általában nem elég erős ahhoz, hogy csupa egyforma kötőhely alakuljon ki. Emiatt a kötőhelyek kötőerőssége és szelektivitása elég széles skálán változhat egyazon anyagon belül is. A kötőhelyek hozzáférhetősége sem egyforma. Gyakorlati célra készülő szorbenseknél természetesen fontos a kötőhelyek könnyű, vagyis gyors hozzáférhetősége. Ezért a molekuláris

lenyomatú polimereket u.n. porogén oldószerekben szokták előállítani. Így nagy fajlagos felületű, mezopórusos anyag jön létre és a kötőhelyek elsősorban a pórusfelületeken alakulnak ki.

1. Táblázat. Molekuláris lenyomatú polimerek néhány alkalmazása

Célvegyület	Minta	Módszer
Clenbuterol	Vizelet	SPE
L-fenilalanin anilid	Puffer, oldószer	Királis HPLC
Teofillin	Vér	Mesters. ellenanyag
Oxidációs termékek	Motorolaj	Tömeg szenzor
Triazinok	Vizek	SPE

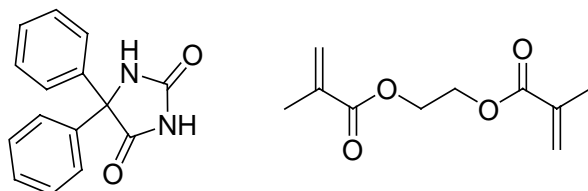
Kombinatorikus előállítás

A molekuláris lenyomatú polimerek előállításánál számos technikai nehézséget kell megoldani. Ilyenek például:

- alkalmas monomert és keresztkötőt kell találni, amely(ek) a lenyomatoképző molekulával megfelelő kölcsönhatásba tudnak lépni,
- a porogén oldószer oldja jól a monomereket és a lenyomatoképző anyagot, de ugyanakkor ne lépjen erős másodlagos kölcsönhatásba a lenyomatoképzővel, mert akkor gátolná a monomerek és a lenyomatoképző közti kötődést,
- a lenyomatoképzőt könnyen és teljesen el lehessen távolítani a polimerből a szintézis után.

Ezek a problémák gyakran nehéz helyzet elé állítják még a legrutinosabb szintetikus vegyészeket is. Ezért célszerűnek látszott a vegyész által elképzelhetőnek tartott nagy számú lehetőség közül egy gyors előkísérlet sorozattal választani ki a legmegfelelebbeket. A feladat nem volt egyszerű, mert a hagyományos módszerekkel egy új polimer tisztítása és jellemzése több napos feladat, ezért túl sok alternatíva kipróbálása nem jöhetett szóba. A megoldást a más területeken már divatos kombinatorikus módszer alkalmazása jelentette. (Tulajdonképpen nem a kombinatorikus jelleg dominált itt, hanem a kombinatorikus módszereknél használt nagy áteresztőképességű automatizált technika átvétele).

A megoldást egy konkrét példán mutatjuk be. A cél a fenitoin (difenil-hidantoin, 3. ábra) nevű gyógyszerre szelektív MIP előállítása volt. A fenitoint az amid csoportjai miatt célszerűnek látszott hidrogén hidas kötéssel kötni a polimerhez. Ezt a célt – elvben – sokféle monomerrel el lehet érni. Keresztkötőként a már jól bevált EDMA-t (etilén-glikol-dimetakrilát, 3. ábra) akartuk használni. A fenitoin a szokásos porogénekből (pl. diklórmétán, toluol, acetonitril) rosszul oldódik, a jó oldószerei (pl. alkoholok, éterek) viszont gyengítik a monomerrel képzett másodlagos kötéseket. Ezért a jó porogének és a jó oldószerek elegyeivel próbálkoztunk.



3.Ábra. Fenitoin és EDMA

Először is tizenkét különböző monomert vizsgáltunk meg, a polimerizációt acetonitril és tetrahydrofuran 70/30 v/v elegyében hajtva végre, fenitoin jelenlétében illetve anélkül. Utóbbi módon a kontroll, nem-imprintelt polimereket (NIP) állítottuk elő. A tizenkét monomer közül csak kettő bizonyult alkalmasnak a fenitoinnal való lenyomatoképzésre. Ezekkel a monomerekkel azután négyféle oldószerkeletben készítettünk MIP-et illetve NIP-et, és a kapott polimerek kötőképességét két-két közegben vizsgáltuk. Így összesen negyven polimert állítottunk elő és vizsgáltunk be. A hagyományos módszerekkel mindez közel egy évi munkát adott volna egy kémikusnak. Ehelyett – a polimerizáció és a tesztelés miniaturizálásával, integrálásával és robotizálásával – a teljes vizsgálat egy hét alatt valósult meg⁹.

Nemlineáris kromatográfia

A molekuláris lenyomatú polimerek potenciális alkalmazási területeinek egyike az elválasztástechnika. Már számos példát irtak le a kromatográfias, szilárd fázisú extrakciós, elektroforetikus és hasonló alkalmazásokra. Különösen sokat foglalkoztak a királis kromatográfiai alkalmazásokkal. A MIP-ek szelektív adszorpciós tulajdonságai bizonyos fokig tervezhetően változtathatók az egyetlen vegyületre való szelektivitás és egy adott vegyületcsoportra való szelektivitás között. Mindez jól hasznosítható például a mintaelőkészítésben. Erre a célra már kereskedelemben is kapható MIP és újabb termékek forgalmazását is ígérik.

A nagy teljesítményű kromatográfias (HPLC) alkalmazásokat bemutató közleményekben általában olyan elválasztásokat mutatnak be, ahol a szelektivitás kiváló de az oszlop hatékonysága rendkívül alacsony. A rossz hatékonyság, vagyis a jelentős csúcsszélesedés, valamint a csúcsok feltűnő aszimmetriájának (tailing) magyarázatául általában a MIP szemcsék nem gömbszerű alakját, túl nagy méretét és a méreteloszlás széles voltát hozzák fel. Ezek a tulajdonságok a MIP-ek legegyszerűbb előállítási módszerének (tömbpolimerizáció) a következményei. Az utóbbi években számos eredményes kísérletet tettek homogén, gömb alakú és néhány mikrométer átmérőjű MIP szemcsék előállítására. Mindez azonban nem sokat javított a helyzeten. Egy másik magyarázat szerint az említett problémákat a MIP kötőhelyeinek inhomogenitása okozza. Ezért többen is foglalkoznak a kötésereőség szempontjából homogénebb MIP-ek előállításával.

A hosszan elnyúló csúcsalakra a legjobbnak tűnő magyarázatot azonban Guiochon és munkatársai adták¹⁰. Ők néhány MIP esetében sikeresen bizonyították, hogy a csúcsok torzulása elsősorban termodinamikai okokra vezethető vissza, nevezetesen az adszorpciós izoterma nemlineáris volta.

A nemlineáris izoterma az analitikai kromatográfiában egy ismert, de lehetőleg elkerülendőnek tartott jelenség. A vegyész-mérnökök, illetve a preparatív kromatográfusok számára viszont éppen ez a megszokott, ugyanis a preparatív munkáknál olyan nagy koncentrációkkal dolgoznak, ahol az izoterma már gyakorlatilag mindig elhajló. Ráadásul az elválasztandó anyagok egymás adszorpcióját és így retencióját is befolyásolják, ami az analitikai kromatográfiában szintén szokatlan.

A MIP-eknél ugyanezek a jelenségek fellép(het)nek, de már az analitikai koncentráció-tartományban, sőt még akár az alsó méréshatárnál is.

Guiochon és munkatársainak eredményei a MIPekkel foglalkozó analitikusok és szerves kémikusok körében nem találtak nagy visszhangra. Ebben szerepe lehet a nemlineáris kromatográfia erősen matematizált voltának. Ugyanilyen fontos azonban, hogy a szerzők nem mutattak rá a nemlineáris kromatográfias viselkedésnek azokra az általános következményeire, amelyeket a MIP-ekkel dolgozóknak feltétlenül figyelembe kellene venniük. Az alábbiakban ezeket a következményeket tekintjük át.

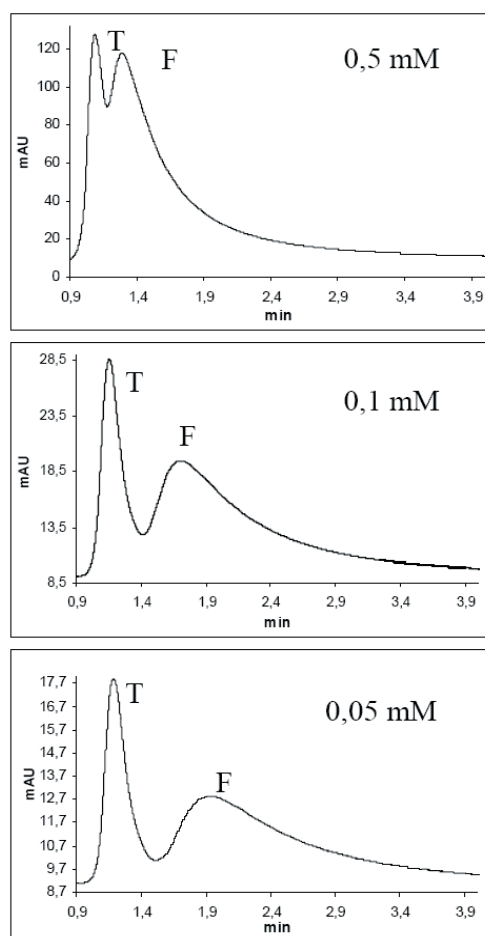
A MIP-ek legfontosabb tulajdonságának, a lenyomatékpézés következtében létrejött szelektivitásnak a jellemzésére kétféle mérőszámot használnak: a kromatográfias MIP oszlop szelektivitását (α), illetve a MIP oszlopon és a kontroll polimerből (NIP) készült oszlopon a templátra mért retenciós tényezők hányadosát (IF: imprinting factor). A számításhoz szükséges retenciós tényezőket a csúcsmaximumok helyéből állapítják meg. Ezek az adatok sajnos értelmüket veszítik ha a vizsgált anyagok adszorpciós izoterma annyira nemlineáris, hogy a csúcsalakot döntően az izoterma szabja meg. Márpedig Guiochon szerint és a mi tapasztalataink szerint is ez a helyzet, sőt az irodalomban közölt kromatogramok alapján joggal feltételezhető, hogy mások MIP-jei is így viselkedtek.

Az előbbi állítás bizonyítására megmutatjuk, hogy a szelektivitás mért értéke nagymértékben függ a beinjektált anyagok koncentrációjától illetve a minta mennyiségétől. Ennél is élesebben fogalmazva: minél alacsonyabb alsó méréshatárú detektort használunk, annál szelektívebbnek fogjuk találni ugyanazt a MIP oszlopot. A 4. ábra saját méréseink alapján mutatja, hogy egy fenitoin lenyomatú polimerből készült oszlopon (50x3mm) a fenitoin és a timin elválasztása javul a minta hígításával.

A nemlineáris kromatográfia sajátágaiból következően helytelenek azok a törekvések, amelyek a kötőhelyek kémiai sajátosságainak homogenizálásával vagy a tányérszám növelésével próbálják a csúcsok alakját javítani. A kötőhelyek homogenitása esetén az izoterma nem lineáris, hanem Langmuir típusú lesz, ami szintén egy nemlineáris izoterma. Ez csak akkor tekinthető közel lineárisnak, ha a telítési kapacitásnak csak a töredékét használjuk ki, tehát az izoterma kezdeti szakaszán. A kötőhelyek homogenitása tehát csak akkor hatásos, ha egyidejűleg nagy koncentrációban tudjuk előállítani őket, ami viszont jelenleg nem oldható meg könnyen. A tányérszám növelésével sem sikerült eddig jelentős javulást elérni. Ennek oka – legalább részben - hogy a nemlineáris kromatográfiaiban a tányérszám alig befolyásolja a csúcsok szélességét.

A gyakorlat számára talán legfontosabb következtetés az elmondottakból az, hogy az újonnan előállított MIP-ek jellemzésére feltétlenül meg kell mérni a lenyomatékpéző anyag izotermáját. Hasznos lehet továbbá a potenciális zavaró illetve elválasztandó anyagok izotermáját is megmérni, sőt vizsgálni kell a lenyomatékpéző és az elválasztandó anyag együttes adszorpcióját is, mert kölcsönhatások lehetségesek. A kölcsönhatás (amitől a

fentiekben az egyszerűség kedvéért eltekintettünk) többféle típusú lehet. Leggyakrabban a kötőhelyekért való versengés fordul elő, de mi arra is találtunk példát, amikor a két anyag kölcsönösen növelte egymás adszorpcióját¹¹.



4. Ábra. Fenitoin (F) és timin (T) elválasztásának javulása a minta hígításával. A megadott koncentrációértékek mindkét anyagra vonatkoznak. F=0,5ml/min, eluens: acetonitril, $\lambda=220\text{nm}$, $V_{inj}=10\mu\text{l}$

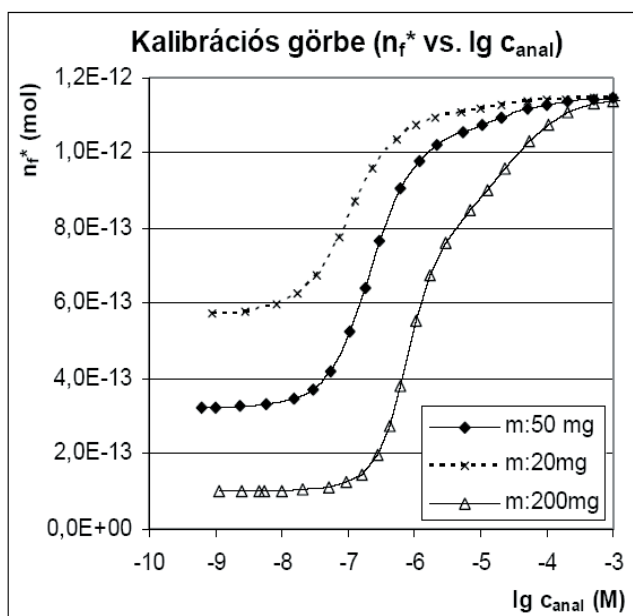
Pszedo immun-analitika

A molekuláris lenyomatú polimerek érdekes alkalmazási területe az immunreagens helyettesítése. Egyes MIP-ek az ellenanyagokhoz hasonló szelektivitással és nagy egyensúlyi állandóval kötik meg a lenyomatékpéző anyagot. Ugyanakkor a MIP sokkal stabilabb mint az ellenanyag, reprodukálhatóan állítható elő és alkalmazásával elkerülhetők az állatkísérletek is.

Többen alkalmaztak már sikerrel MIP-eket olyan mérésekre, amelyeket hagyományosan ellenanyagok segítségével oldanak meg. Legtöbbször valamelyik versengő módszert használták, vagyis a mérendő anyag egy jelzett anyaggal versenyzett a polimer kötőhelyeiért. Jelzett anyagként gyakran alkalmazták a lenyomatékpéző molekula tríciummal nyomjelzett változatát. Ebben az esetben a versengő anyagok kémiaiailag azonosnak tekinthetők. A továbbiakban csak ezzel az esettel (u.n. homolog versengés) foglalkozunk.

Az ellenanyagok helyettesítésére használt MIP-ekkel a kutatók ugyanúgy optimalták a mérési körülményeket mint ahogy az

az immunanalitikában régóta szokásos. Ezek a módszerek rengeteg kísérletet igényelnek és nem szolgáltatnak olyan adatokat, amelyek birtokában a mérés egy másik feladathoz könnyen újra optimálható lenne. A közelmúltban sikerült megmutatnunk¹², hogy az első optimáláskor elvégzett mérésekből meghatározható a MIP izotermája, ez utóbbi ismeretében pedig a módszer más feladatokra, például más lineáris tartományra, más alsó méréshatárra, más jel/zaj viszonyú detektorra egyszerű számítással újra optimálható. Az 5. ábra például azt mutatja, hogy ha megváltoztatjuk a minta és a polimer mennyiségének viszonyát, az új jelleggörbe könnyen számítható. Így céljainknak megfelelően változtathatjuk például az alsó méréshatárt és rögtön láthatjuk ennek következményeit a többi mérési jellemzőkre, például a hasznos méréstartományra.



5. Ábra. (S)-propranolol izotermájából számított kalibrációs görbék különböző polimer mennyiség esetén (assay térfogat és a jelzett propranolol mennyiség állandó)

Munkánk érdekes következtetéseként azt találtuk, hogy míg a kromatográfias alkalmazásoknál a nemlineáris izoterma megnehezíti a MIP-ek alkalmazását, addig az immunanalitikai típusú alkalmazás kizárólag akkor lehetséges, ha az izoterma nemlineáris. A kétféle alkalmazáshoz tehát másképp kell optimalni a MIP előállítási eljárásokat.

Molecularly imprinted polymers: optimization of their preparation by combinatorial methods and applications in non-linear chromatography and binding assays.

Molecularly imprinted polymers are selective polymeric sorbents. They may be prepared for almost any adsorbent by self-organization principles. Miniaturization and automation of their preparation and testing is feasible and speeds up the optimization

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki a hivatkozott eredeti közleményeink társszerzőinek, munkánk anyagi támogatásáért az *Institut de Recherches Internationales Servier*-nek (*I.R.I.S. France*), az *OTKA*-nak (T048912) és az *NKTH*-nak (NKFP 3/043/2001)

Összefoglalás

A közlemény önrendeződéssel képződő, szelektív polimer szorbenseket, u.n. molekuláris lenyomatú polimereket ismertet. Megmutatja, hogy az előállítás és tesztelés miniaturizálásával és automatizálásával felgyorsítható és gépesíthető az a folyamat, amelyben tetszőleges megkötni kívánt vegyülethez megtaláljuk a megfelelő polimerizációs recepturát. A molekuláris lenyomatú polimerek alkalmazási lehetőségei közül két fontos területet mutat be a cikk: a kromatográfiát és a polimerek mesterséges ellenanyagként való felhasználását. Konkrét példákön keresztül rámutat arra, hogy a molekuláris lenyomatú polimereket alkalmazó technikák optimalizálását a polimer adszorpciós egyensúlyi izotermájának ismeretére célszerű alapozni.

Irodalom

1. Mahony, J.O.; Nolan, K.; Smyth, M.R.; Mizaikoff, B. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 31.
2. Kandimalla, V.B.; Ju, H.X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 587.
3. Turiel, E.; Martin-Esteban, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1876.
4. Ansell, R.J. *J. Chrom. B* **2004**, *804*, 151.
5. Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2025.
6. Sellergren, B. (Ed.) *Molecularly Imprinted Polymers*, Elsevier: Amsterdam, **2001**.
7. Bereczki, A. PhD értekezés, Budapest, **2003**, <http://phd.om.hu>
8. Pap, T. PhD értekezés, Budapest, **2004**, <http://phd.om.hu>
9. Lanza, F.; Hall, A.J.; Sellergren, B.; Bereczki, A.; Horvai, G.; Bayouhd, S.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 91.
10. Sajonz, P.; Kele, M.; Zhong, G.; Sellergren, B.; Guiochon, G. *J. Chrom. A* **1998**, *810*, 1.
11. Pap, T.; Horvai, G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 99.
12. Pap, T.; Horvai, G. *J. Chrom. B* **2004**, *804*, 167.

process. Two important fields of application for the imprinted polymers are chromatography and binding assays. Method optimization in both applications may be accelerated by measuring and using the corresponding adsorption isotherms.