

УДК 541.135.541.64

МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ГИДРОФИЛЬНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ СОРБЦИИ ЭРИТРОМИЦИНА

© 2011 г. Н. М. Ежова, И. С. Гаркушина, О. А. Писарев

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004

e-mail: pisarev@imc.macro.ru

Поступила в редакцию 23.03.2011 г.

Методом молекулярного импринтинга синтезированы новые гидрофильные полимерные сорбенты, несущие сайты, комплементарные молекуле антибактериального антибиотика эритромицина. Для сравнительного изучения сорбционных свойств синтезирована серия аналогичных по структуре сорбентов, не несущих импринт-сайтов. На обоих типах синтезированных полимерных сорбентов изучена сорбция эритромицина в широком диапазоне значений рН и ионной силы. Показано, что избирательность сорбции эритромицина на молекулярно импринтированных сетчатых полимерах обусловлена вкладом специфичного взаимодействия целевой молекулы с матрицей сорбента. Данный тип сорбента перспективен для разработки очистки антибиотика непосредственно из культуральной среды *Saccharopolyspora erythreus*.

В последнее десятилетие широко распространенным подходом к одному из важнейших направлений биотехнологии — выделению и очистке сложных по химическому строению и обладающих высокой структурной лабильностью биологически активных веществ, является использование высокоспецифичных полимерных сорбентов, предназначенных для селективной сорбции целевого объекта из многокомпонентных биологических жидкостей [1]. Современным подходом к получению селективных сорбентов является метод молекулярного импринтинга. Метод молекулярного импринтинга заключается в синтезе полимерной матрицы в присутствии целевой молекулы, которая играет роль молекулы-шаблона. После удаления такой молекулы из сетчатого полимера в структуре матрицы образуются сайты, комплементарные целевой молекуле по расположению сорбционных центров [2–4].

Ранее были синтезированы “настроенные” на молекулу эритромицина карбоксильные катиониты, имеющие в своей структуре как участки, комплементарные по отношению к молекуле антибиотика, так и свободные карбоксильные группы [5, 6]. К недостаткам такого синтеза можно отнести как наличие импринт-сайтов, так и ионогенных групп, способных к взаимодействию с другими веществами культуральной среды, что снижало селективность данного типа сорбентов.

Цель работы — получение и изучение свойств молекулярно-импринтированных полимерных сорбентов, которые содержат только сорбционные центры, настроенные на молекулу эритромицина, а также могут быть использованы в динамическом колонном режиме для создания процесса выделе-

ния и очистки антибиотика непосредственно из культуральной среды *Saccharopolyspora erythreus*. Такие сетчатые сорбенты представляют полимерную модель биологического рецептора эритромицина.

МЕТОДИКА

В качестве неионогенного сомономера для синтеза сетчатых полимеров в работе использовали 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА, “Acros Organics”, США). Сшивающим агентом служил диметакрилат этиленгликоля (ДМЭГ) той же фирмы.

Контрольные полимеры (КП), так же, как и молекулярно-импринтированные полимеры (МИП), синтезировали путем трехмерной осадительной сополимеризации с той лишь разницей, что синтез неимпринтированных КП проводили в отсутствие молекулы метакрилата эритромицина (МЭ). Вместо нее в полимеризационную смесь вводили метакриловую кислоту (МАК) в той же пропорции по отношению к остальным мономерам, что и МЭ. В результате после удаления эритромицина из импринтированного полимера сохранялся одинаковый химический состав КП и МИП. МЭ был получен из эритромицина—основания (ОАО “Биосинтез”, г. Курган, Россия) [5].

Таким образом, МИП представляли собой сополимеры ГЭМА, МЭ и ДМЭГ, из которых после окончания синтеза удаляли эритромицин. КП являлись сополимерами ГЭМА, МАК и ДМЭГ.

При синтезе полимерных сорбентов в качестве растворителя использовали 45%-ный водный раствор изопропилового спирта. Инициатором радикальной сополимеризации служила окислительно-восстановительная система персульфат аммония—

Таблица 1. Оптимизация условий синтеза импринтированных сополимеров (содержание МЭ в полимеризационной смеси – 6 мол. %)

№ п/п	ГЭМА, мол. %	ДМЭГ, мол. %	Выход, %	Насыпная плотность, г/мл	$K_{\text{наб.}}$ в воде	$K_{\text{наб.}}$ в 50%-ном ИП
1	74	20	65	0.73	2.8	8.9
2	69	25	70	0.72	4.0	6.2
3	64	30	75	0.68	6.0	10.5
4	54	40	20	0.19	2.0	2.5

аскорбиновая кислота (1.0% от массы мономеров). Синтезированные сополимеры прогревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч, отмывали от непрореагировавших сомономеров, сушили, измельчали в фарфоровой ступке и фракционировали с помощью набора сит. В экспериментах использовали фракцию размером 100–200 мкм.

Физико-химические характеристики сорбентов определяли по методикам, которые описаны в [6–8]. Особое внимание было уделено полноте удаления эритромицина из импринтированных сополимеров. Полное удаление антибиотика было достигнуто путем экстракции сополимеров этанолом в аппарате Сокслета. Процесс продолжался до полного отсутствия антибиотика в пробе. О наличии эритромицина–основания в спиртовой пробе судили по окраске индикатора метилрота, при отсутствии в пробе основания она не изменялась.

Эксперименты по изучению равновесной сорбции проводили в среде Na-ацетатного буфера в широком диапазоне значений pH и ионной силы. Концентрацию антибиотика в водном растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм по предварительно построенным калибровочным кривым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гетеросетчатых биосорбентов наиболее эффективен при применении растворителей, хорошо сольватирующих образующиеся микрозаготовки сетчатого полимера [1, 9]. Поэтому при разработке условий синтеза таких сорбентов особенно важен выбор исходных мономеров и кросс-агента, а также растворителя. Для эритромицина наибольший интерес представляет ГЭМА. Сополимеризация ГЭМА с ДМЭГ позволяет получить гидрофильную и в то же время не содержащую ионогенных функциональных групп матрицу сорбента. Наиболее подходящим растворителем для этой пары мономер–кросс-агент являются водно-спиртовые смеси на основе изопропилового или n-пропилового спиртов.

Изучена радикальная сополимеризация ГЭМА с ДМЭГ, а также ГЭМА, ДМЭГ и МЭ в различных растворителях при разных мольных соотношениях и различной концентрации мономеров в раствори-

теле. Установлено, что наиболее подходящим растворителем, позволяющим варьировать мольные соотношения компонентов мономерной смеси в широком диапазоне, являлся 50%-ный водный раствор изопропанола (ИП). При концентрации мономеров в этом растворителе, равной 20 мол. %, удалось ввести в мономерную смесь максимальное количество эритромицина-шаблона (вплоть до 15 мол. %).

Изучение влияния содержания сшивающего агента на свойства образующихся сетчатых сополимеров было проведено при вышеуказанных условиях при содержании МЭ – 6 мол. %. Как видно из полученных данных (табл. 1), увеличение содержания в полимеризационной смеси кросс-агента ДМЭГ до 40 мол. % приводило к образованию сетчатого полимера с низкой насыпной плотностью. Это исключало его применение в колоночном процессе. В диапазоне 20–30 мол. % ДМЭГ наиболее структурно устойчивым, то есть обладающим наименьшим различием при набухании в воде и 50%-ном водном ИП, являлся сорбент, содержащий 25 мол. % ДМЭГ.

Таким образом, были найдены оптимальные условия синтеза новых гидрофильных сетчатых полиэлектролитов импринтированных молекулами эритромицина (20%-ная концентрация мономеров в 50%-ном водном растворе ИП и 25 мол. % ДМЭГ в качестве кросс-агента).

В этих условиях были получены две серии сорбентов: КП – в отсутствие эритромицина в полимеризационной смеси и МИП, которые были синтезированы в присутствии шаблона-антибиотика и “настроены” на селективную сорбцию антибиотика.

Из анализа данных, приведенных в табл. 2, видно, что синтез КП, то есть сополимеризация МАК, ГЭМА и ДМЭГ в найденных нами условиях, протекала с практически количественным выходом. Соответствие полной обменной емкости, найденной путем потенциометрического титрования карбоксильных групп, теоретически вычисленным значениям также указывало на полноту вхождения мономеров.

При синтезе МИП (табл. 3) наблюдали уменьшение выхода сополимеров с увеличением количества эритромицина-шаблона, а также различие найденных и вычисленных значений полной обменной ем-

Таблица 2. Сополимеризация МАК с ГЭМА и 25 мол. % ДМЭГ (КП)

№ п/п	МАК, мол. %	ГЭМА, мол. %	Выход, %	ρ , г/см ³	ПОЕ, мг-экв/г	
					вычислено	найдено
1	3	72	99	0.75	0.21	0.21
2	6	69	99	0.76	0.42	0.41
3	9	66	99	0.76	0.63	0.61
4	12	63	98	0.74	0.85	0.84
5	15	60	98	0.74	1.07	1.04

Таблица 3. Сополимеризация МЭ с ГЭМА и 25 мол. % ДМЭГ (МИП)

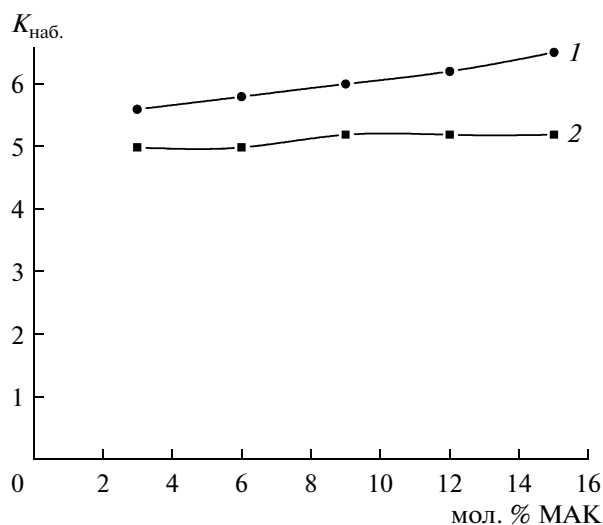
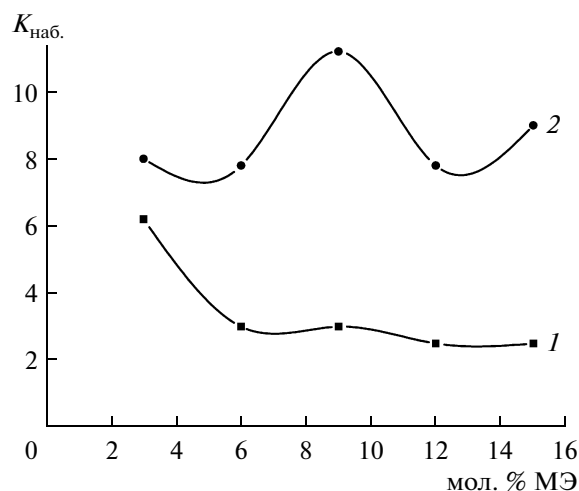
№ п/п	МЭ, мол. %	ГЭМА, мол. %	Выход, %	ρ , г/см ³	ПОЕ, мг-экв/г	
					вычислено	найдено
1	3	72	93	0.75	0.21	0.28
2	6	69	70	0.77	0.42	0.50
3	9	66	53	0.75	0.63	0.62
4	12	63	53	0.76	0.85	0.78
5	15	60	42	0.76	1.07	0.87

кости. Вместе с тем обе реакционные серии привели к синтезу сорбентов, обладающих примерно одинаковой насыпной плотностью, что существенно при использовании их в колоночном процессе.

Как видно из рис. 1 и 2, наибольшие различия в структуре КП и МИП были обнаружены при изучении набухания полимерных сорбентов в воде и 50%-ном водном ИП. КП обладали гидрофильной природой наряду с высокой структурной устойчивостью. Величины коэффициентов набухания находились в диапазоне 5.0–6.5, что согласовывалось

с исходной концентрацией мономеров в растворителе (рис. 1). Коэффициенты набухания КП практически не зависели от процентного содержания МАК, что позволило предположить незначительные различия в пористости для всех пяти образцов данной серии. Это дало возможность использовать только один из них (КП-9) для исследования основных сорбционных свойств всей реакционной серии и сравнения КП с МИП.

При переходе к МИП наблюдали значительные изменения в величинах коэффициентов набухания

**Рис. 1.** Зависимость набухания КП от концентрации МАК (мол. %) в воде (1) и 50%-ном водном ИП (2).**Рис. 2.** Зависимость набухания МИП от концентрации МЭ (мол. %) в воде (1) и 50%-ном водном ИП (2).

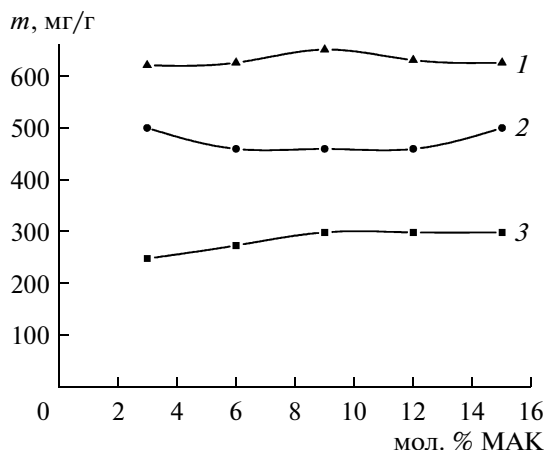


Рис. 3. Зависимость емкости сорбции эритромицина на КП от концентрации МАК (мол. %). $C_{исх} = 2$ мг/мл; pH 4.0. Измерения проводили при различной ионной силе сорбционного раствора: 0.05 (1), 0.1 (2), 0.2 (3).

по мере увеличения количества МЭ в полимеризационной смеси (рис. 2). Снижение величин коэффициентов набухания МИП в воде по мере увеличения количества МЭ можно объяснить окклюзией все большего количества гидроксильных групп ГЭМА вокруг гидрофобной части молекулы-шаблона. Значительное увеличение набухания в исходном растворителе (50%-ный водный ИП), то есть в том, в котором данная сетка была сформирована, однозначно свидетельствует об образовании значительных пустот, оставшихся после удаления молекулы-шаблона.

Изучение равновесной сорбции эритромицина на КП и МИП проводили в Na-ацетатном буфере при различной ионной силе (рис. 3 и 4). Ранее было установлено, что зависимость емкости сорбции данного антибиотика от pH внешнего раствора носит экстремальный характер, причем максимальная сорбция наблюдалась в диапазоне значений 4.0–5.0 [6].

Зависимость сорбционной емкости эритромицина от содержания МАК на КП исследовали при pH 4.0. Как видно из рис. 3, этот параметр незначительно зависел от содержания МАК, но заметно зависел от ионной силы внешнего раствора. При увеличении ионной силы от 0.05 до 0.2 н. значения сорбционной емкости антибиотика уменьшались в 2.5 раза.

В аналогичных условиях изучали зависимость сорбционной емкости эритромицина от содержания МЭ на МИП (рис. 4). При анализе данных видно, что ионная сила внешнего раствора мало влияла на величину сорбционной емкости МИП. Ранее аналогичный характер этих зависимостей выявлен для МИП, импринтированных молекулами лизина [9]. Это явление связано с возникновением специ-

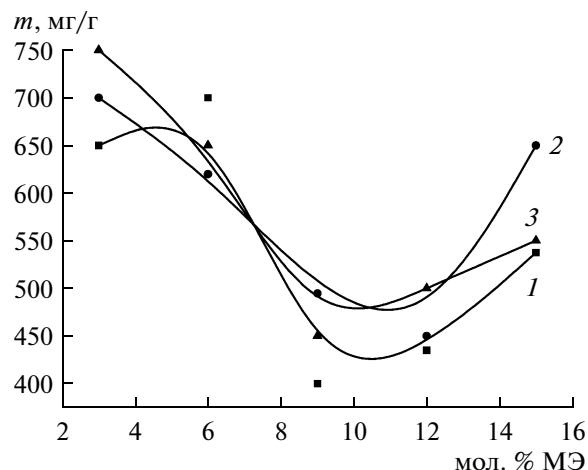


Рис. 4. Зависимость емкости сорбции эритромицина на МИП от концентрации МЭ (мол. %). $C_{исх} = 2$ мг/мл; pH 4.0. Измерения проводили при различной ионной силе сорбционного раствора: 0.05 (1), 0.1 (2), 0.2 (3).

фичных гидрофобных взаимодействий молекулы шаблона с МИП, когда молекуле термодинамически “выгодно” занять комплементарные пустоты вне зависимости от степени диссоциации сорбента и целевого объекта.

На величину сорбционной емкости заметно влияло лишь количество целевых молекул в полимеризационной смеси – максимальные величины наблюдались при 3 и 15 мол. % МЭ. При содержании 3 мол. % МЭ наблюдалось максимальное набухание сорбентов в воде (рис. 2), затем набухание по мере увеличения содержания МЭ снижалось, а количество импринт-сайтов увеличивалось. Эти два фактора, по всей видимости, формировали вид зависимости (рис. 4) с минимальными значениями сорбционных емкостей для сорбентов МИП-9 и МИП-12 (сорбентов, синтезированных в присутствии 9 и 12 мол. % МЭ соответственно).

Таким образом, разработаны методы синтеза и изучены свойства новых гидрофильных полимерных сорбентов, содержащих импринт-сайты антибиотика – макролида эритромицина. Сравнительное изучение сорбции антибиотика на ненастроенных и молекулярно импринтированных сорбентах показало различный характер межмолекулярного взаимодействия целевой молекулы с сорбционными центрами МИП и КП. По сравнению с ненастроенными сорбентами МИП сорбируют эритромицин с большей емкостью и избирательностью сорбции, причем межмолекулярное взаимодействие антибиотика с МИП практически не зависело от ионной силы внешнего раствора. Так как содержание минеральных солей в культуральной среде *Saccharopolyspora erythreus* зависит от условий культивирования и изменяется в широких пределах, то это обстоятельство является чрезвычайно полез-

ным для реализации одноактного высокоселективного сорбционного процесса выделения и очистки эритромицина непосредственно из культуральной среды.

Работа осуществлялась при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы” (контракт № 14.740.11.0382).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Писарев О.А., Ежова Н.М. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. № 4. С. 535–552.
2. Leonard M. // J. Chromatogr. B. 1997. V. 699. № 1. P. 3–27.
3. Allende C.J. // Adv. Drug Del. Rev. 2005. V. 57. № 5. P. 1731–1732.
4. Brügemann O., Haupt K., Lei Ye, Yilmaz E., Mosbach K. // J. Chromatogr. A. 2000. V. 889. № 4. P. 15–24.
5. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 4. С. 409–412.
6. Писарев О.А., Ежова Н.М., Гаркушина И.С. // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83. № 1. С. 142–147.
7. Ежова Н.М., Чернова И.А., Погодина Т.Е., Самсонов Г.В. // Ионный обмен и хроматография / Ред. Г.В. Самсонов. Л.: Наука, 1984. С. 37–41.
8. Вольский В.С., Ежова Н.М., Самсонов Г.В. // Журн. прикл. химии. 1985. № 9. С. 2133–2136.
9. Ежова Н.М., Полякова И.В., Писарев О.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 243–247.

Molecularly Imprinted Hydrophilic Polymer Sorbents for Selective Sorption of Erythromycin

N. M. Ezhova, I. S. Garkushina, and O. A. Pisarev

Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

e-mail: pisarev@imc.macro.ru

Received March 23, 2011

Abstract—New hydrophilic polymer sorbents comprising reactionary sites which are complementary to a molecule of antibiotic erythromycin were synthesized by the method of molecular imprinting. A series of similar sorbents without reactionary sites was used for comparison of sorption characteristics. Sorption of erythromycin on both types of polymer sorbents synthesized was studied in a wide range of pH and ionic strength. Selectivity of erythromycin sorption on molecularly imprinted cross-linked polymers was shown to depend on the specific interaction of target molecule with polymer matrix. This type of sorbent is perspective for the development of antibiotic purification directly from a culture medium *Saccharopolyspora erythreus*.