

**Mesterséges és természetes ellenanyagokon alapuló  
analitikai módszerek antiepileptikumok  
meghatározására**

**Ph. D. értekezés**

**Bereczki Andrea Enikő**

**Témavezető: dr. Horváth Viola**

2003



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Általános és Analitikai Kémia Tanszék

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek *dr. Horváth Violának*, aki munkám és dolgozatom megírása során nagyon sok segítséget nyújtott, értékes tanácsai mindig tovább segítettek munkámban. Hálás vagyok konzulensemnek *Dr. Horvai Györgynek*, aki figyelemmel kísérte kutatómunkámat és hasznos tanácsokkal látott el.

Külön köszönet illeti *dr. Tolokán Antalt*, aki nagyon sokat segített laboratóriumi jártasságom kialakításában, számítógépes ismereteim gyarapításában. Szeretném megköszönni a Farmakokinetikai Laboratórium munkatársainak támogatását és segítségét, legfőképp *Pap Tímeának* tartozom köszönettel.

Köszönet illeti Dr. Keszei Csabát, a fluoreszcencia polarizációs és radioimmunoassay összehasonlító mérések elvégzéséért, valamint az értékes szakmai tanácsokért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Pokol György tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy az általa vezetett Általános és Analitikai Kémiai Tanszéken végezhettem Ph. D. munkámat.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Gál Sándornak az Akadémiai Kutatócsoport vezetőjének, a Varga József Alapítvány kuratóriuma elnökének figyelmes és következetes támogatásáért.

Köszönöm az Általános és Analitikai Kémiai Tanszék minden dolgozójának azt a baráti légkört és támogatást, amely munkám során és azt követően mindig körülvett.

Köszönet illeti azokat a külföldi kollegákat, akiknek közreműködésével a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek kutatásába kapcsolódhattam be.

Köszönet illeti a *Varga József Alapítványt* a doktoránsi és kutatói ösztöndíj biztosításáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak a szerető támogatást, megértést és türelmet, amiből mindig erőt meríthettem. Külön köszönöm a biztatásukat és azt, hogy mindvégig hittek bennem.

## TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS .....	1
2.	IMMUNANALITIKA.....	4
2.1.	IRODALMI RÉSZ.....	4
2.1.1.	Az immunanalitikai módszerek fejlődésének rövid történeti áttekintése....	4
2.1.2.	Antitestek .....	7
2.1.3.	Az immunanalitikai módszerek csoportosítása .....	7
2.1.4.	Áramló oldatos injektálásos módszerek alkalmazása az immunanalitikában 10	
2.2.	KÍSÉRLETI RÉSZ.....	14
2.2.1.	Alkalmazott mérőműszerek és eszközök .....	14
2.2.2.	Felhasznált anyagok, vegyszerek.....	14
2.3.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....	16
2.3.1.	GÉLKROMATOGRÁFIÁS RENDSZEREN ALAPULÓ IMMUNANALITIKAI ELJÁRÁS FENITOIN MEGHATÁROZÁSÁRA HUMÁN SZÉRUMBÓL.....	16
2.3.1.1.	Az immunanalitikai eljárás kiválasztása .....	16
2.3.1.2.	Az immunreagensek kiválasztása .....	18
2.3.1.3.	A batch módszer kidolgozása .....	18
2.3.1.3.1.	A kromatográfiás elválasztás optimalálása.....	18
2.3.1.3.2.	Az immunreakció időtartamának optimalálása .....	22
2.3.1.3.3.	Fenitoin meghatározása a batch módszerrel .....	24
2.3.1.4.	Az áramlásmegszakításos módszer kidolgozása.....	24
2.3.1.4.1.	Az inkubálási idő hatásának vizsgálata .....	26
2.3.1.5.	Az immunanalitikai módszer validálása .....	27
2.3.1.5.1.	Az eljárás összehasonlítása egy elfogadott analitikai módszerrel ..	29
2.3.2.	FENOBARBITÁL MEGHATÁROZÁSA HUMÁN SZÉRUMBÓL ÁRAMLÓ OLDATOS IMMUNANALITIKAI MÓDSZERREL.....	31
2.3.2.1.	Az immunanalitikai módszer kiválasztása.....	31
2.3.2.2.	Az immunreagensek kiválasztása .....	31
2.3.2.3.	Az immunanalitikai eljárás optimalálása .....	32
2.3.2.3.1.	A kromatográfiás elválasztás optimalálása.....	32
2.3.2.3.2.	Az immunreakció időtartamának optimalálása .....	33
2.3.2.4.	Az áramlásmegszakításos immunreakció optimalálása .....	34
2.3.2.5.	Az immunanalitikai módszer validálása .....	35
2.3.2.5.1.	Az eljárás összehasonlítása elfogadott analitikai módszerekkel.....	36
3.	MOLEKULÁRIS LENYOMATOT TARTALMAZÓ POLIMEREK .....	38
3.1.	IRODALMI RÉSZ.....	38
3.1.1.	Polimerek molekuláris emlékezetrel - rövid történeti áttekintés .....	39
3.1.2.	Molekuláris lenyomatképzési eljárások .....	42
3.1.2.1.	Kovalens eljárással készült polimerek .....	42
3.1.2.2.	Fémionkoordinációs kötésen alapuló szintézisek .....	43

3.1.2.3.	Nem kovalens eljárással készült polimerek .....	44
3.1.2.3.1.	Funkcionális monomerek.....	46
3.1.2.3.2.	Oldószerek .....	47
3.1.2.3.3.	Keresztkötők .....	47
3.1.2.3.4.	Iniciátorok.....	48
3.1.2.3.5.	Templátok.....	49
3.1.3.	A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek tesztelése.....	49
3.1.4.	Molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek alkalmazása az analitikai kémia területén .....	51
3.1.4.1.	Molekuláris lenyomatok a nagyhatékonyságú elválasztástechnikákban .....	51
3.1.4.2.	Molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek alkalmazása az immunanalitikában.....	53
3.1.4.3.	Molekuláris lenyomatok alkalmazása a szenzorkutatásban.....	56
3.1.4.4.	Molekuláris lenyomatok alkalmazása a szilárd fázisú extrakcióban	57
3.2.	<b>MOLEKULÁRIS LENYOMATOT TARTALMAZÓ POLIMEREK ALKALMAZÁSA FENITON MEGHATÁROZÁSÁRA HUMÁN PLAZMÁBÓL.....</b>	61
3.3.	<b>KÍSÉRLETI RÉSZ.....</b>	61
3.3.1.	Alkalmazott mérőműszerek és eszközök .....	61
3.3.2.	Felhasznált anyagok és vegyszerek .....	63
3.3.3.	Kalibrációs és minőségellenőrző minták készítése .....	64
3.3.4.	A lenyomatképzés során alkalmazott eljárások.....	65
3.3.4.1.	A mini-MIP szintézis .....	65
3.3.4.2.	Mini-MIP tesztelés.....	67
3.3.5.	Fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek preparatív méretben való előállítása.....	68
3.4.	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>	70
3.4.1.	Fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek szintézise .....	70
3.4.1.1.	Előzetes megfontolások .....	70
3.4.1.2.	Polimerizációs előkísérletek a mini-MIP eljárással .....	71
3.4.1.3.	Az optimális polimerek előállítása.....	74
3.4.2.	A preparatív méretben előállított polimerek kromatográfiás tesztelése ....	74
3.4.3.	A fenitoin MIP kötőhelyek tanulmányozása .....	78
3.4.4.	Fenitoin MIP alkalmazása a mintaelőkészítésben.....	82
3.4.4.1.	A víztartalom hatása a MIP templát kötésére .....	82
3.4.4.2.	A mintaelőkészítés optimálása.....	84
3.4.5.	A módszer validálása.....	91
3.4.5.1.	Validációs paraméterek meghatározása .....	92
4.	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	96
5.	<b>TÉZISEK .....</b>	98
6.	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	99

## 1. BEVEZETÉS

Az epilepszia az egyik leggyakoribb idegrendszeri betegség, a lakosságnak mintegy 0,5%-a szenved epilepsziában<sup>1</sup>. Ha a családban epilepszia fordult elő, úgy a kockázat valamennyire megnő az általános népességhez viszonyítva. Fontos tehát az epilepszia gyógykezelése, amely a rohamjelenségek és a kiváltó körülmények részletes elemzése alapján, tervszerűen, szervezeten és folyamatos ellenőrzéssel kell, hogy végbemenjen. Az epilepsziások gyógykezelése számtalan szövődménnyel is járhat, és a betegek ezért is, folyamatos ellenőrzésre szorulnak, nemcsak az antiepilepsziás kezelés hatásának értékelése szempontjából. Az epilepsziás rohamok közvetlen befolyásolásához az antiepileptikumok széles skálája áll az orvosok rendelkezésére, valamennyi a neuronális stabilizáció irányába hat, és ezt gyakran a legkülönbözőbb hatásmechanizmusok útján érik el. Ha a roham intenzitását vagy gyakoriságát kedvezően, de nem elég erélyesen befolyásolja a terápia, gyakran többféle, különböző hatásmechanizmussal rendelkező antiepileptikumot kell egy időben szedni.

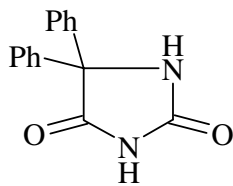
Doktori munkám során két antiepileptikum, a fenitoin (1.a ábra) és a fenobarbitál (1.b ábra) biológiai mátrixból (vérszérum, vérplazma) való meghatározására dolgoztam ki mérési eljárásokat. Mindkét gyógyszert gyakran alkalmazzák az epilepsziás terápiaiban. A fenitoin a hidantoinok közé sorolható, erős görcsgátló hatású. Hiperpolarizációval stabilizáló hatást fejt ki a központi és környéki idegek membránjaira, ezáltal gátolja a görcspotenciálok terjedését az agykéregben. A fenobarbitál az agyban a barbiturát-receptorokhoz kötődik, csökkentve a neuronok ingerlékenységét, növelve az ingerküszöböt. A fenitoin terápiás tartománya 10-20 µg/ml, míg a fenobarbitálé 15-40 µg/ml, mindkettő viszonylag szűk tartomány, ezért szedésük alatt a páciens folytonos kontrollra szorul, a vérszinteket állandóan monitorálni kell. Túl magas gyógyszer-szint nem kívánatos mellékhatásokhoz vezet, míg a túl alacsony gyógyszer-koncentráció nem fejt ki a kívánt, görcs-, rohammegelőző hatást. Az antiepileptikumok mérésére alkalmazott analitikai módszerek közül talán a folyadékkromatográfiás<sup>2-4</sup> módszerek a legnépszerűbbek, hiszen ezekkel lehetőség nyílik több gyógyszer és metabolit egyidejű meghatározására<sup>2,5</sup>. A kromatográfiás módszerek hátránya azonban, hogy a biológiai

mintákban levő szennyezők eltávolítása érdekében időigényes mintaelőkészítést igényelnek. Léteznek azonban olyan alkalmazások is, ahol szérummintákat közvetlenül, mintaelőkészítés nélkül injektálták kromatográfias rendszerbe<sup>3,6</sup>. Az utóbbi években a klinikai kémiai gyakorlatban egyre nagyobb teret hódítanak az immunkémiai módszerek, amelyek specificitásukkal, szelektivitásukkal, egyszerűségükkel és gyorsaságukkal méltán válhatnak a kromatográfias módszerek vetélytársaivá. Főként radioaktív, fluoreszcens, enzimes és lumineszcens jelölést alkalmazó immunanalitikai eljárásokkal találkozhatunk. Az egyszerű tesztsíktól, a komplex analizátorokon át mindenféle megoldással találkozhatunk<sup>7-13</sup>. Az ún. batch immunoassay módszerek hátránya a kromatográfias eljárásokhoz képest, hogy csak nagyszámú minta mérése esetén gazdaságosak a drága kalibrációs reagenskészletek miatt. A gyógyszer monitorálás folyamán csak viszonylag kisszámú minta keletkezik, és az eredményre szinte azonnal szükség van, hogy a gyógyszeradagolásba időben be lehessen avatkozni. Így a batch módszerek kevésbé jöhetnek szóba ilyen típusú mérések esetén. Az immunanalitikai módszerek és az áramló oldatos mérési technika kombinálásával megoldódhat ez a probléma, mivel a mérőrendszerbe a minta már az érkezésekor beinjektálható, nem szükséges sok mintát összevární. Az áramló oldatos technika pontos időzítési lehetőségének köszönhetően nem kell megvárni a komplexképzés egyensúlyának beálltát, lehetőség nyílik nem-egyensúlyi körülmények között való mérésekre is, amivel jelentős időt takaríthatunk meg.

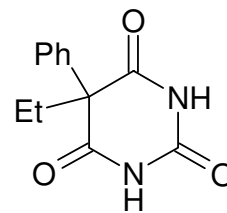
Munkám kezdetekor egy olyan áramló oldatos immunanalitikai eljáráson alapuló, biológiai mátrixból történő gyógyszermeghatározási módszer kidolgozását tűztük ki célul, amely felveszi a versenyt azokkal a klinikai módszerekkel, melyeket általában ezen gyógyszermolekulák meghatározására használnak. A módszer kidolgozására célvegyületként a fenitoin antiepileptikumot választottam. Célul tűztem ki az áramló oldatos rendszer megépítését, a működési paraméterek optimalizálását és a kidolgozott eljárás validálását fenitoin meghatározására humán plazmából. Továbbá célul tűztem ki, hogy bizonyítsam, hogy ez a rendszer és a kidolgozott mérési eljárás könnyen alkalmazható egyéb, kis molekulatömegű gyógyszerek meghatározására is, ezért a fenobarbitál szérummintákból történő meghatározására is tesztelni kívántunk.

Doktori munkám második részében új típusú anyagokkal, molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerekkel dolgoztam. Ezek az anyagok az antitestekhez hasonló erősséggel

és szelektivitással képesek megkötni egy adott célvegyületet, működésük az ellenanyagokhoz hasonlóan molekuláris felismerésen alapul. Számos előnnyel és persze bizonyos hátrányokkal rendelkeznek az ellenanyagokkal szemben. Célul tűztem ki a molekuláris lenyomatkészítés stratégiájának elsajátítását, új molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek készítését, az előállított polimerek analitikai jellemzését és működésüknek vizsgálatát. Bár már számos közlemény megjelent, melyek az analitikai kémia különböző területein való alkalmazásukkal foglalkoznak, eddig nem volt olyan munka, amely a kidolgozott módszerek gyakorlatba való átültethetőségét bizonyítaná. Ezért célom az volt, hogy e szelektív polimert szilárd fázisú extrakciós mintaelőkészítésre használva validált mérési módszert dolgozzak ki humán plazmaminták analízisére. Célvegyületként ebben az esetben is a fenitoin antiepileptikumot választottam.



**1.a. ábra** fenitoin



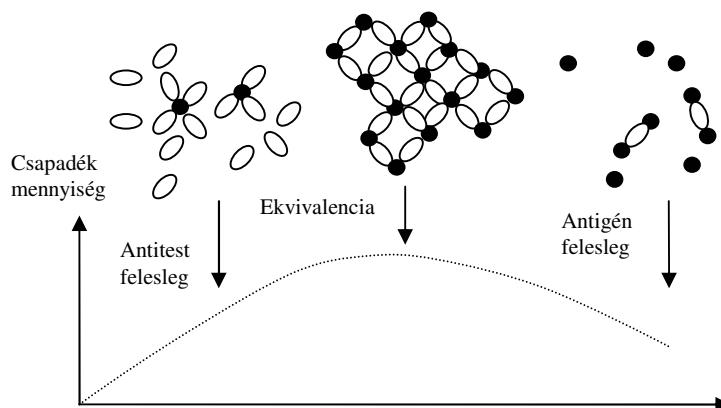
**1.b. ábra** fenobarbitál

## 2. IMMUNANALITIKA

### 2.1. IRODALMI RÉSZ

#### 2.1.1. Az immunanalitikai módszerek fejlődésének rövid történeti áttekintése

Az immunkémia az 1800-as évek végén alakult ki, amikor Ehrlich<sup>14</sup> felfedezte azokat a ma antitest néven ismert specifikus szérumproteineket, amelyek feladata a különböző fertőző ágensek hatástalanítása. Az immunreakciók alapját képező szelektív molekuláris felismerés az immunanalitika kifejlődését tette lehetővé. Az immunanalitika azoknak a módszereknek a gyűjtőneve, amelyek specifikus antitest-antigén reakciókon keresztül szolgáltatnak analitikai információt egy adott minta ismeretlen komponenseiről. Az immunanalitika fejlődése párhuzamosan haladt az immunológia, biokémia és analitikai kémia fejlődésével. A diagnosztikai immunanalitika korai alkalmazásának egy jellemző példája az 1897-ben<sup>15</sup> Kraus által leírt specifikus agglutináción alapuló tífuszteszt volt. Az agglutináción alapuló immunanalitikai tesztek közül érdemes még kiemelni a Coombs-tesztet, amely a szervezet vörösvérsejtjei elleni autoimmunválasz diagnosztikájára szolgál és a hemolízis eredetére ad információt<sup>16</sup>. A direkt Coombs-teszt esetében a páciens vörösvérsejtjeihez polispecifikus anti-humán globulin szérumot adnak. Pozitív válasz esetén agglutináció lép fel.



**2. ábra** A csapadékképződés alapját képező antitest-antigén reakció sematikus vázlata, és az ennek megfelelő diagram (Heidelberg-Kendall diagram). A csapadék mennyisége az ekvivalencia zóna közelében a legnagyobb. A csapadék kialakulását általában 430 nm-en detektálják turbidimetriásan.



A későbbiekben immunreakciókon és csapadékképződésen alapuló módszerek egész sorát fejlesztették ki. Így az 1930-as években ezeket a módszereket már rutinszerűen használták baktériumok detektálására. Jellemző példa a Heidelberger és Kendall<sup>17</sup> által kifejlesztett módszer a tífusz diagnosztikájára, amely alkalmasnak bizonyult a bakteriális antigén 0,1 µg-nál kisebb mennyiségben való meghatározására. Az 1940-es években kifejlesztett immundiffúzió<sup>18</sup> és az immuncsapadékképzés lehetőséget biztosítottak a proteinek azonosítására és fél-mennyiségi meghatározására. 1941-ben Coons fluoreszcinszármazékkal jelölt antitesteket használt a megfelelő antigének vizualizálására szövetmintákban, és ezáltal megteremtette az immunfluoreszcencia alapjait<sup>19</sup>. Jelentős előrelépést jelentett az immunanalitika területén az 1953-ban bevezetett immunelektroforézis<sup>20</sup>, amely az immundiffúzióval együtt az első standardizált és rutinszerűen alkalmazott immunanalitikai módszernek tekinthető<sup>21</sup>. Ezek alkalmazása azonban nehézkes és időigényes volt, elsősorban minőségi illetve fél-mennyiségi eredményeket szolgáltatottak. Forradalmi előrelépést jelentett az 1960-as évek elején, a Berson és Yalow által bevezetett radioimmunoassay, amelyet az endogén plazma inzulintartalmának meghatározására dolgoztak ki<sup>22</sup>. Munkájuk annyira úttörő volt, hogy annak idején a Science folyóirat elutasította cikküket, mivel az immunológusok nem hitték el, hogy a 6000 móltömegű inzulinmolekula immunogén hatással rendelkezik. A Journal of Clinical Investigation is csak jelentős változtatások után fogadta el a cikket<sup>23</sup>. A módszer későbbi népszerűségét és elterjedését részben annak is köszönheti, hogy az első radioimmunoassay módszerek hormonok meghatározását szolgálták<sup>22,24,25</sup>. A hormonokat, melyek a belső elválasztású mirigyek termékei, rendszerint nagyon kis mennyiségben kell meghatározni. Hatásuk és szerkezetük között rendkívül szoros összefüggés van, ezért a legcsekélyebb kémiai módosulás is változtathat az élettani hatáson. Az immunoassay bevezetése előtt a hormonok meghatározása rendkívül nehézkes volt, a fehérje természetű hormonok meghatározására, mint például az inzulin, gyakorlatilag nem létezett megfelelő analitikai módszer. Nagy jelentőségű az 1960-as évek közepén Wide<sup>26</sup> illetve Miles és Hales<sup>26</sup> által kidolgozott eljárás az antitestek radioaktív izotópokkal való jelölésére, amely az immunradiometrikus assay (immunoradiometric assay, IRMA) módszer kialakulásához vezetett. A

radioimmunoassay módszerek viszonylag könnyű automatizálhatóságuknak és széleskörű alkalmazhatóságuknak köszönhetően lehetőséget teremtettek nagyszámú, rutin analízis elvégzésére. Az 1970-es évek elején a kereskedelmi forgalomban már több száz radioimmunoassay állt a felhasználók rendelkezésére, elsősorban klinikai analízisre, de környezeti, élelmiszer-analitikai célokra is.

A radioimmunoassay bevezetése után gyorsan megjelentek a nem-izotópos jelölésen alapuló immunoassay módszerek. Így már 1961-ben Dandliker és Feigen<sup>27</sup> a Coons által bevezetett fluoreszcens jelölést használva, fluoreszcencia polarizáción alapuló immunoassay módszert dolgozott ki, míg 1969-ben Avrameas<sup>28</sup> az immunreagensek enzimekkel való jelölését írta le. Az utóbbi munka az 1970-es évek elején bevezetett enzim immunoassay technikák alapját képezte<sup>29,30</sup>. A radioaktív izotópokat alkalmazó módszerek nyilvánvaló hátrányokkal rendelkeznek, mint például a szigorúan szabályozott laboratóriumi körülmények. Ezért a későbbiekben a nem-izotópos, enzimes és fluoreszcens jelölést alkalmazó immunoassay módszerek és különböző metódusok gyors fejlődésének korszaka következett. Párhuzamosan a jelölés nélküli, sok esetben az immunreakciók valós időben való követésére alkalmas módszerek kidolgozására is sor került, mint például a felületi plazmonrezonancia<sup>31</sup> (SPR, surface plasmon resonance), kvarckristály mikromérleg<sup>32</sup> stb.

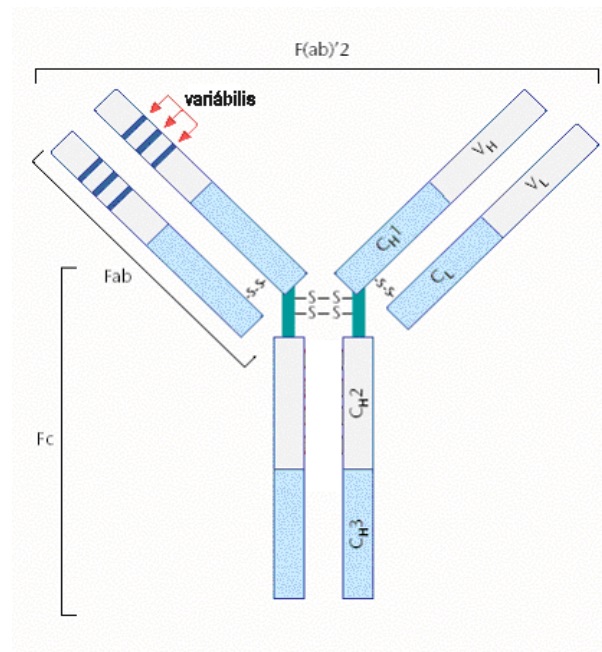
Jelenleg az immunanalitika kiforrott tudományterület, amely a modern bioanalitika jelentős részét képezi. A módszer rendkívül széleskörű alkalmazását bizonyítja az irodalomban több, mint 250 ezer immunanalitikai témájú publikáció jelent meg. Az immunanalitika óriási kereskedelmi fontossággal is bír. Ezt bizonyítja a Business Communications Company, Inc. 2001. októberi jelentése, amely szerint az immunanalitika három hagyományos alkalmazási területén (klinikai analízis, élelmiszer-analitika és környezeti analitika) a kereskedelmi forgalom meghaladja a 14 milliárd dollárt, és évi 4 % feletti növekedés várható az elkövetkezendő öt évben (1. táblázat).

#### 1. táblázat Business Communications Company, Inc előrejelzési adatai

Alkalmazási terület	2001	2006	Átlagos évi növekedés (2001–2006)
Klinikai analízis	13800	16800	4,1
Élelmiszeranalitika	414	760	12,9
Környezetvédelem	17,8	23,1	5,4
Összesen	14232	17583	4,4

### 2.1.2. Antitestek

Az immunrendszer elsőként azonosított elemei az antitestek voltak<sup>14</sup>. Az antitestek fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer egy adott antigén hatására termel. Tekintettel arra, hogy az antitestaktivitás általában a szérumfehérjék  $\gamma$ -globulin frakciójával társítható, immunglobulinoknak hívjuk őket. Az emberi és állati immunglobulinok diszulfidhidakkal és több, nem kovalens kötéssel összekapcsolt polipeptid láncokból, két "nehéz" peptidláncból és két "könnyű" peptidláncból állnak (3. ábra). A peptidláncok N-terminális szakaszán a primer szerkezet változékony, ezt hívjuk variábilis szakasznak. Ezzel ellentétben a peptidláncok C-terminális fele állandó primer szerkezetű. A peptidláncokat összetartó diszulfid kötések kémiai ágensek segítségével felhasíthatók, amely reakció során az egyes láncok elválaszthatók egymástól.

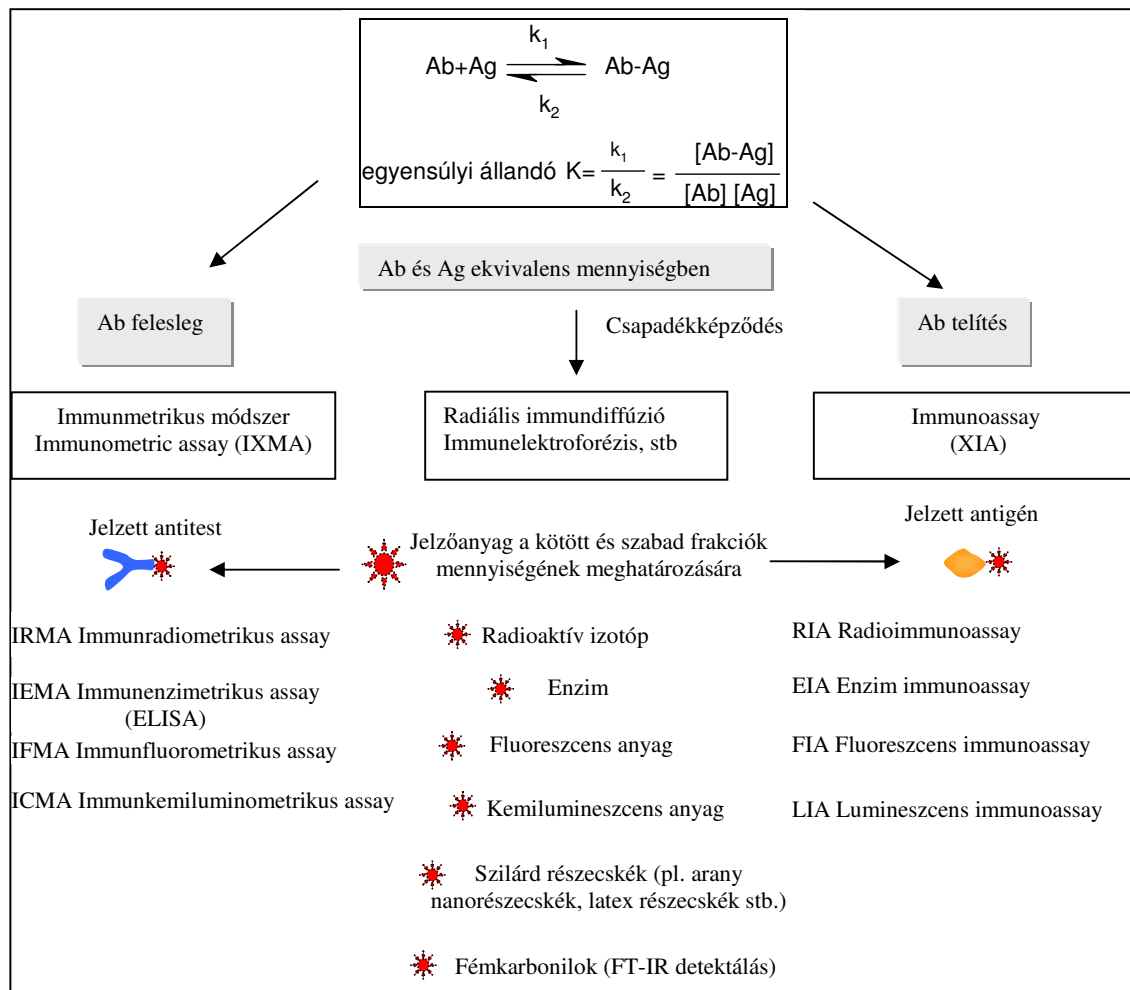


**3. ábra** Az emberi IgG immunglobulin szerkezete

### 2.1.3. Az immunanalitikai módszerek csoportosítása

Kvantitatív analitikai célra egy immunreakció csak akkor használható, ha a szelektív molekuláris felismerés érzékeny műszeres detektálással párosul. Ennek érdekében az immunanalitikai módszerek nagy többsége jelzőmolekulákat használ, bár

több olyan technika is ismeretes, mint például a felületi plazmon rezonancia, ahol az antitest-antigén komplex kialakulása jelzés nélkül meghatározható. Ez utóbbi módszereknek a rutinszerű használatát a viszonylag hosszú analízisidő és a költséges mérőkészülékek jelentősen akadályozzák, ezért a következőkben csak a jelzésen alapuló immunanalitikai módszereket mutatom be (4. ábra).



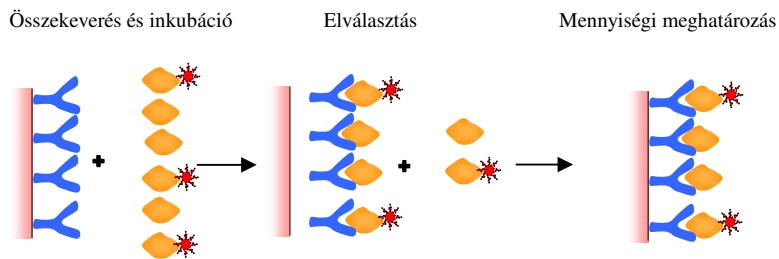
**4. ábra** Az immunanalitikai módszerek osztályozása az antigén-antitest mennyiség aránya és az alkalmazott jelölő anyag szerint

Amennyiben a detektálási technika különbséget tud tenni a kötött és nem kötött immunreagensek által szolgáltatott analitikai jel között, akkor ezek elválasztása nem szükséges. Azokat az immunanalitikai módszereket, ahol az immunreagensek elválasztása nélkül is meghatározható a kötött, illetve szabad frakciók mennyisége

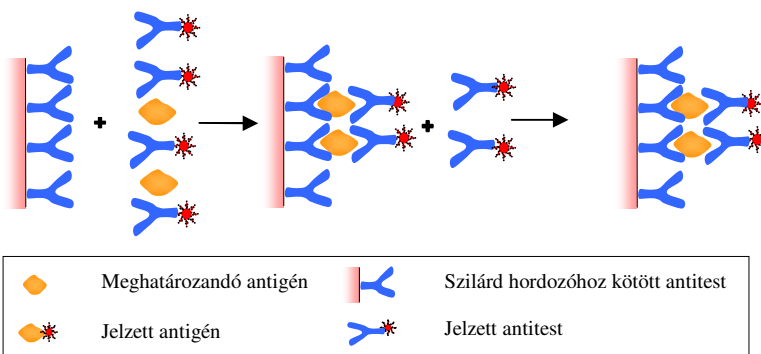
homogén módszereknek nevezzük. Ezeknél elterjedtebbek az ún. heterogén módszerek, ahol az immunreakció végezetével, de még a detektálás előtt a szabad és kötött immunreagens-frakciókat elválasztják. Fontos követelmény az alkalmazott elválasztási módszerrel szemben, hogy a kötött és szabad frakciókat az antigén-antitest egyensúlyának megváltoztatása nélkül válassza szét.

A heterogén módszerek esetében két alapvető eljárást különböztethetünk meg. A vetélkedésen alapuló immunoassay esetén (5. ábra), az antitest mennyisége korlátozott és kötőhelyeiért versengés alakul ki a meghatározandó antigén és konstans mennyiségű jelzett antigén között. Az immunkomplex kialakulása után a kötött és szabad antigéneket elválasztják. Általában az antitesthez kötődött jelzett antigénmennyiséget határozzuk meg és ekkor az analitikai jel ellentétes módon változik a minta antigéntartalmával. A másik eljárást nem vetélkedő immunoassay módszereknek nevezzük. A legismertebb változata a szendvics eljárás (lásd 5. ábra), amely csak a legalább két kötőhellyel rendelkező antigének meghatározására alkalmazható. Ebben az esetben a felismerő (capture) antitestet a meghatározandó antigénhez viszonyítva feleslegben immobilizáljuk egy szilárd hordozóra. A minta antigénje és az immobilizált antitest közötti immunkomplex kialakulása után egy második jelzett (tracer) antitestet adunk a reakció közeghez. A felismerő és jelzett antitestek "szendvicsszerűen" zárják közre az antigént. A jelzett antitest feleslegének eltávolítása után meghatározzuk a szendvicskomplex mennyiségét, amely a minta antigénkoncentrációjával arányos.

*Vetélkedésen alapuló immunanalitikai módszer*



*Nem vetélkedésen alapuló immunanalitikai módszer, Szendvics eljárás*



**5. ábra** A vetélkedésen alapuló és a nem vetelkedésen alapuló (esetünkben szendvics) immuneljárások sematikus ábrája

**2.1.4. Áramló oldatos injektálós módszerek alkalmazása az immunanalitikában**

Az áramló oldatos injektálós analízist (flow injection analysis, FIA) az 1970-es évek elején vezette be Nagy, Fehér és Pungor<sup>33</sup>. A módszer rendkívül gyors elterjedését bizonyítja, hogy megjelenése óta több, mint 6000 közlemény és monográfia jelent meg ebben a témában. Az áramló oldatos injektálás és a különböző detektálási technikák összekapcsolása során kialakított mérőrendszerek jelentős előnyöket biztosítanak. A FIA módszerek alkalmazásával lehetőség nyílt a mérési eljárások automatizálására, a minta-és reagenstérfogatok csökkentésére, a kémiai és biológiai reakciók kontrollált körülmények között való elvégzésére. Az immunreagensek árait figyelembe véve, a reagensmennyiség hathatós csökkentése rendkívüli fontossággal bír. Így nem meglepő, hogy a FIA mérés technika alkalmazására az immunanalitikában már az 1980-as évek elején sor került, amikor Lim és munkatársai szérumban albumin meghatározására

alkalmazták<sup>34</sup> a méréstechnikát. Munkájuk során fluoreszcenciás energiaátvitelen alapuló homogén immunanalitikai<sup>35</sup> eljáráshoz használták a FIA-t. A homogén módszer és a FIA méréstechnika együttes használatának újabb lehetőségét írta le Kelly és Christian<sup>36</sup>. IgG meghatározáshoz EMIT (Enzyme Multipled Immunoassay Technique) módszert használtak, melynek során az IgG szelektív felismeréséhez torma peroxidázzal jelölt anti-IgG-t alkalmaztak. Az enzim egy nem fluoreszcens fluoreszcein származék és a hidrogén-peroxid redoxi reakcióját katalizálta, amelynek során fluoreszcenciával rendelkező diklórfloreszcein keletkezett<sup>37</sup>. Az immunanalitikai mérés alapját az képezte, hogy az enzim aktivitását az immunkomplex képződése gátolta, és ezáltal a fluoreszcens jel csökkent. A FIA módszer alkalmazása óránként 60 minta analízisére nyújtott lehetőséget, és jelentősen lecsökkentette a felhasznált reagensek mennyiségét.

A FIA méréstechnika alkalmazását heterogén immunanalitikai módszerek esetében csak később, a 80-es évek közepén írták le. A heterogén immunoassay módszerek esetében az antitest megfelelő szilárd hordozóhoz van kötve, és ismételt minták mérése estén a felismerő antitestrétege regenerálásra szorul. Az oszlopra kötött antitest regenerálását elsőként Mattiasson oldotta meg, aki enzimek reverzibilis immobilizációjára kívánt módszert kidolgozni. Ennek érdekében anti-humán szérum albumint (anti-HSA) kötött Sepharose gélhez majd ezt különböző HSA-enzim konjugátumokkal módosította. Az enzimaktivitás meghatározásához az áramló oldatos rendszerbe szubsztrátumot injektált és az enzim katalizálta reakció hőfejlődését mikrokalorimetriás módszerrel detektálta. A gél regenerálását 0,2 M glicin pufferral (pH=2) végezte el<sup>38</sup>. Annak ellenére, hogy ez a rendkívül úttörő munka időrendileg megelőzi a homogén immunoassay módszerek esetében leírt áramló oldatos injektációs méréstechnikákat, nem tekinthető immunoassay módszernek. Az első heterogén immunoassay de Alwis és Wilson nevéhez fűződik<sup>39</sup>. IgG meghatározására immunenzimmetrikus assay-t írtak le, amely során az anti-IgG-vel módosított szilárd hordozó (Reactigel-6X) regenerálására 0,1 M foszfát puffert (pH=2) használtak. Az áramló oldatos rendszerbe először a mintát injektálták, utána időrendi sorrendben glükóz oxidázzal jelölt anti-IgG-t, glükózt és regeneráló puffert. Az injektált IgG minta a mintareaktorban megkötődött, majd szendvics immunkomplex alakult ki a jelölt anti-IgG

hozzáadása után. Az anti-IgG-t jelölő glükóz-oxidáz a glükóz oxidációját katalizálta, és az így keletkezett hidrogén-peroxid koncentrációját a mikroreaktor után elhelyezett amperometriás vékonyréteg cellában detektálták. Annak ellenére, hogy a meghatározást nem egyensúlyi körülmények között, esetenként mindössze pár szekundum inkubációs időt alkalmazva végezték, a módszer pikomol mennyiségű IgG minták meghatározására is alkalmasnak bizonyult<sup>39</sup>. Később a szerzők bebizonyították a mérési elv alkalmazhatóságát vetélkedésen alapuló immunoassay módszerek esetében is<sup>40</sup>. Az antitestekkel módosított szilárd hordozók regenerálására leírt módszer lendületet adott a FIA méréstechnika heterogén immunassay-ben való használatához. Az első FIA-heterogén immunoassay módszerek általában 10 perc/minta sebességgel, 5%-nál jobb pontosságot értek el, amely jelentősen jobb volt a mikrotiter tálcás, illetve kémcsöves eljárások esetében elért értékeknél.

A megfelelő jelölő enzim kiválasztásával lehetőség nyílt különböző detektálási technikák alkalmazására. Példaként említhető a Meyerhoff és Lee által kidolgozott enzimimmunmetrikus eljárás humán IgC meghatározására. Jelölésre adenzin-deamináz enzimet alkalmaztak. Az analitikai jelet az enzimatis reakcióban generált ammónium ionok potenciometriás detektálása szolgáltatta<sup>41</sup>.

A szilárd hordozó *regenerálásának hátránya*, hogy jelentősen megnöveli az analízisidőt és bizonyos esetekben az immobilizált immunreagensek denaturálódásához vezethet<sup>42,43</sup>. Erre a problémára több megoldás is született. Így Liu és munkatársai<sup>44</sup> bebizonyították, hogy amennyiben immunmetrikus módszert alkalmaztak kis antigénmennyiség meghatározására (nagy antitestfelesleg), akkor a hordozó többször is felhasználható regenerálás nélkül. Ennek érdekében rendkívül érzékeny kemilumineszcenciás detektálást alkalmaztak, amely segítségével 1 femtomol kimutatási határral tudtak borjú IgG-t meghatározni. Regenerálás nélkül a mérőrendszer kb. 30 analízis elvégzésére volt képes (pikomol mennyiségű IgG minták). Az elegánsabb eljárások mikronméretű részecskékhez kötött immunreagenseket alkalmaznak. A mikronméretű részecskékből vizes oldatokban stabil szuszpenziót hoznak létre, és ezáltal áramló oldatos rendszerekben könnyen használhatók. Pollema, Ruzicka és Christian<sup>45</sup> IgG molekulák meghatározására szekvenciális áramló oldatos injektációs rendszerben



anti-IgG-vel módosított mágneses gömböcskéket használtak egyszer használatos szilárd hordozó fázisként. Az immunoassay kezdeti fázisában injektálták az anti-IgG-vel módosított mágneses gömböcskéket a mérőcsatornába, és ennek egy adott szakaszán elektromágnes segítségével rögzítették. Vetélkedésen alapuló eljárás alkalmazása után a szabad antigénfrakciót (fluoreszcens molekulával jelölt antigén és minta antigén) a detektorba áramoltatták és meghatározták a fluoreszcencia intenzitását. A mérés végén az elektromágnes automatikusan kikapcsolt és a mágneses gömböcskéket eltávolította a rendszerből. Ez a módszer lehetőséget nyújt a mágneses gömböcskék felületének off-line regenerálására amennyiben ez szükséges. Az előbb említett csoport a mérési elv több finomítását is leközölte<sup>46,47</sup>, amelyek közül az általuk FIRSI-nek (Flow Injection Renewable Surface Immunoassay) elnevezett módszer az immunreakció valós időben való nyomonkövetésére is lehetőséget nyújt<sup>47</sup>.

A heterogén immunoassay módszerek sorában, az elválasztásra alkalmazott módszerek között találunk gélkromatográfiás megoldást is. Lidofsky<sup>48</sup> és munkatársai inzulin meghatározására alkalmaztak gélkromatográfiás elválasztást, de szérumminták mérését ez a módszer nem tette lehetővé. Nakamura<sup>49</sup> és munkatársai a hCG meghatározása során alkalmaztak gélkromatográfiás oszlopot. Mindkét eljárás esetén egy hosszú inkubálási lépés előzte meg a mérést.

Az áramló oldatos injektálásos immunoassay módszerek (FIIA, flow injection immunoassay) alkalmazási területei közül talán a legfontosabb a környezetanalitika. Különböző monitorozási feladatok megoldására (pl. peszticidek meghatározására) az áramló oldatos technikák kiválóan alkalmasak és az antitest-antigén kölcsönhatás megfelelő szelektivitást biztosít. Ennek megfelelően nagy számú nyomanalitikai módszert dolgoztak ki. Elektrokémiai detektálást és enzimerősítést alkalmazó FIIA technikával Bauer és munkatársai<sup>50</sup> zeptomol kimutatási határt értek el 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (herbicide) jelzőenzimére, míg a herbicide 0,1 ng/ml volt a kimutatási határ. A vetélkedésen alapuló immunanalitikai módszerben alkalikus foszfáttal jelölt antigént használtak. Az alkalikus foszfát a szubsztrátumként használt fenil-foszfát molekulát fenollá alakította át, amelyet amperometriás bioszenzorral határoztak meg. Jóval ritkábban találunk FIIA alkalmazásokat gyógyszer-molekulák meghatározására is<sup>51,52</sup>.

## 2.2. KÍSÉRLETI RÉSZ

### 2.2.1. Alkalmazott mérőműszerek és eszközök

Az immunanalitikai mérések során a foszfát puffer (0,01 M pH=7,4) vivőoldat szállítására, Beckman 114 M típusú HPLC pumpát használtam (Beckman Instruments, Berkeley, CA, USA). Mintabeviteli egységként Upchurch (8  $\mu$ l) (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) és Rheodyne (2x34  $\mu$ l) (Rheodyne, Cotati, CA, USA) hatutas injektort alkalmaztam. A fenitoin mérése során a gélkromatográfiás elválasztásra HR 5/5 (5x50 mm) Pharmacia (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) oszlopot alkalmaztam, melyet különböző gélekkel töltöttem meg. A fenobarbitál meghatározása során a gélkromatográfiás elválasztásra gélkromatográfiás előtétoszlopot alkalmaztam (Phenomenex, Torrance, CA, USA, 50x7,5 mm). Az immunreakció házi készítésű keverőhurokban (250  $\mu$ l) játszódott le.

Az immunmérések során detektorként JASCO FP-920-as fluoreszcens detektort használtam (Jasco International, Tokyo, Japán). A fenitoin mérése során a gerjesztési hullámhossz 470 nm, míg az emisszió hullámhossza 514 nm volt. Ugyanezen értékek a fenobarbitál mérése során 470 nm és 516 nm voltak. Az adatgyűjtést a Borwin 1.21 kromatográfiás szoftver irányításával (JMBS Developpements, Le Fontanil, Franciaország) egy 486-os IBM AT számítógép végezte. A batch módszer kidolgozása során az inkubálás elvégzésére Heidolph UNIMAX 2010 (Heidolph Elektro GmbH, Keilheim, Németország) rázógépet használtam.

### 2.2.2. Felhasznált anyagok, vegyszerek

A fenitoin immunanalitikai meghatározásához használt immunreagens-készletet (Hungarofluor Fenitoin PFK-01 fluoreszcencia polarizációs immunoassay) az Izotóp Intézet Kft.-től szereztük be. A készlet az alábbiakat tartalmazta: fluoreszcensen (fluoreszcein-5-izotiocianát) jelölt fenitoin, fenitoin ellenanyag, fenitoin szérumszandardok (0; 2,5; 5; 10; 20; 40  $\mu$ g/ml), kontroll szérumszérumszandardok hígítására. Az immunmérés során eluensként alkalmazott foszfát puffert  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ból és  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -ból állítottam elő (Reanal, Budapest, Magyarország). A fenitoin

immunanalitikai eljárásokon alapuló mérése során alkalmazott gélek a következők voltak: Akrilex P-4 (szárazon mért átmérő 50-100  $\mu\text{m}$ , kizárási tartomány globuláris proteinekre 1000-4000 Da, Reanal, Budapest, Magyarország), Sephadex G-25 superfine gél (szárazon mért átmérő 20-50  $\mu\text{m}$ , kizárási tartomány globuláris proteinekre 1000-5000 Da, Sigma, St. Louis, USA) és Bio-Gel P2 fine gél (hidratált gél átmérője 45-90  $\mu\text{m}$ , kizárási tartomány globuláris proteinekre 100-1800 Da, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Az összehasonlító mérés során a fenitoin meghatározására alkalmazott radioimmunoassay-készlet ( $^{125}\text{I}$  RIA RK 41), szintén az Izotóp Intézet Kft. terméke volt.

A fenobarbitál immunanalitikai meghatározásához használt immunkészletet az Izotóp Intézet Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A készlet a következő komponenseket tartalmazta: fluoreszcensen (fluoreszcein-5-izotiocianát) jelölt fenobarbitál, fenobarbitál ellenanyag, fenobarbitál szérumszandardok (0, 5, 10, 20, 40 és 80  $\mu\text{g/ml}$ ) és foszfát puffer a szérumszandardok hígításához. Az immunmérés során eluensként alkalmazott foszfát puffert ebben az esetben is  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ból és  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -ból állítottam elő (Reanal, Budapest, Magyarország). A gélkromatográfiás oszlop töltete, gyárilag töltött BIOSEP-SEC-S 2000 gél volt (5  $\mu\text{m}$ , kizárási tartomány 1000-300000 Da, Phenomenex, Torrance, USA). Az összehasonlító mérések során alkalmazott készletek is az Izotóp Intézet Kft. készítményei voltak: radioimmunoassay-készlet ( $^{125}\text{I}$  RIA RK 45) fenobarbitál meghatározására, valamint fluoreszcencia polarizációs immunoassay készlet (FPIA-PFK-04) fenobarbitál meghatározására.

## 2.3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 2.3.1. GÉLKROMATOGRÁFIÁS RENDSZEREN ALAPULÓ IMMUNANALITIKAI ELJÁRÁS FENITOIN MEGHATÁROZÁSÁRA HUMÁN SZÉRUMBÓL

Egy immunanalitikai módszer kifejlesztése során a megvalósítandó lépéseket négy fő csoportba tagolhatjuk:

1. az immunanalitikai eljárás kiválasztása
2. az immunreagensek kiválasztása
3. az immunanalitikai eljárást befolyásoló paraméterek optimalálása
4. a kidolgozott immunmódszer validálása

Az általam kidolgozni kívánt analitikai módszer fejlesztése során is ezeket a lépéseket tartottam szem előtt.

#### **2.3.1.1. Az immunanalitikai eljárás kiválasztása**

Egy immunanalitikai eljárás kiválasztása során a legfontosabb tényező a meghatározandó molekula sajátága. Attól függően, hogy mekkora a mérendő anyag molekulatömege, milyen széles koncentrációtartományban fogunk dolgozni, melyek a várható koncentrációszintek, más és más immunanalitikai módszer mellett dönthetünk. Ugyanakkor egy eljárás kiválasztása során nem elhanyagolható tényező a költséghatékonyság sem. Természetes, hogy annak függvényében is választjuk a módszert, hogy milyen műszerek, berendezések állnak rendelkezésünkre.

Az általam mérni kívánt molekula a fenitoin, gyakorta használt gyógyszer az epilepszia kezelésére. A fenitoin molekulatömege kicsi, (252,27 Da), így mérésére leginkább a kompetitív immuneljárások alkalmasak. Mivel a gyógyszer terápiás tartománya 10-20 µg/ml között van, így a mérendő koncentrációtartománynak ezt a tartományt kell felölelnie, azaz kb. 2,5-40 µg/ml közé esik. A mérni kívánt koncentrációtartományt tekintve, szinte bármilyen jelölést alkalmazó immuneljárást kitűnően használhatunk a fenitoin mérésére. A fluoreszcens jelölés mellett döntöttünk, mert laborunkban rendelkezésre állt egy fluoreszcens detektor. Így az általam alkalmazott immunanalitikai eljárás a fenitoin mérésére a kompetitív elven alapszik, jelző ágensként pedig fluoreszcens jelölést alkalmaztam.

Az általam alkalmazott immunanalitikai módszer a heterogén fázisú immuneljárások csoportjába sorolható, mivel az ellenanyaghoz kötődött és a nem kötődött antigéneket elválasztjuk. Ezek elválasztása egy áramló oldatos rendszerben, egy gélkromatográfiás oszlop beiktatásával történik. Az elválasztás az immunkomplex (ellenanyaghoz kötődött antigén) és a nem kötődött antigén nagy molekulatömeg különbségének alapján valósul meg. Az előbbi, nagy molekulatömegének köszönhetően kizáródik a gél pórusaiból és rögtön eluálódik az oszlopról, míg az utóbbi, kis molekulatömegének köszönhetően bejut a gél pórusaiba és így jóval később eluálódik.

A módszerkidolgozás során két mérési eljárást alkalmaztam. Az első eljárás során az immunreakciót a méréstől elkülönítve egy kromatográfiás mintatartó edényben valósítottam meg (batch módszer). A megfelelő inkubálási idő elteltével a reakcióterméket az áramló oldatos rendszerbe injektáltam, ahol a gélkromatográfiás elválasztás után fluoreszcens detektálás segítségével mértem az ellenanyaghoz kötődött fluoreszcens fenitoin és a nem kötődött fluoreszcens fenitoin mennyiségét.

A második eljárás során az immunreakció áramló oldatos rendszerben ment végbe. Ennek megvalósítására két injektor speciális összekapcsolására volt szükség, amelyek az ellenanyag és a fluoreszcensen jelölt illetve jelöletlen fenitoin egyidejű bevitelére szolgáltak. Közvetlenül az injektorok után egy keverőhurkot iktattunk az áramló oldatos rendszerbe, ahol a reagensek keveredése, és a tulajdonképpeni immunreakció zajlott. A reagensek keverőhurokba való bejutása után az áramlás adott időre való leállítását szolgálta az inkubálási időt. Az áramlás újraindítása után, az immunkomplex (az ellenanyaghoz kötődött fenitoin) és a nem kötődött fenitoin elválasztása a gélkromatográfiás oszlopon történt, majd fluoreszcens detektálást alkalmazva mértük a fenitoin ellenanyaghoz való kötődését.

A gélkromatográfiás mérések során kapott kromatogramok két csúcsot tartalmaztak, az immunkomplex csúcsát (az ellenanyaghoz kötődött jelölt fenitoin) és az ellenanyaghoz nem kötött, jelölt fenitoin csúcsát. Mindkét csúcsterület egyaránt alkalmazható volt analitikai információ kinyerésére. A kalibrációs egyenesek felvételekor a különböző koncentrációjú fenitoin szérumstandardokkal mért immunkomplex csúcsterületének (B) és a 0 koncentrációjú fenitoin szérumstandard immunkomplex csúcsterületének (B<sub>0</sub>) arányát ábrázoltuk a fenitoin

szérumstandardok koncentráció logaritmusának ( $\log c$ ) függvényében. A kalibrációs egyenes illesztésekor a legkisebb négyzetek módszerét alkalmaztam.

### **2.3.1.2. Az immunreagensek kiválasztása**

Az immuneljárás megvalósítására egy, a fluoreszcencia polarizációhoz kifejlesztett, kereskedelmileg kapható immunkészlettel dolgoztam. Így a módszer kidolgozása során adva voltak mind a fenitoin ellenanyaga, a fluoreszcensen jelölt fenitoin, a különböző koncentrációjú fenitoin szérumstandardok és a kontroll szérumminták. Mivel ismertek voltak számomra a hígítások, amelyekkel a mérés során dolgoznom kellett, így ezeket a paramétereket nem kellett optimalnom. Az eljárás során az immunanalitikai készlet leírásában javasolt ellenanyag-antigén aránnyal dolgoztam, 1: 8,5 (v/v). A jelöletlen antigén (fenitoin szérumstandard vagy ismeretlen szérumminta) és a fluoreszcensen jelölt antigén (fluoreszcensen jelölt fenitoin) aránya 1:7,5 (v/v) volt.

### **2.3.1.3. A batch módszer kidolgozása**

Az eljárás során 750  $\mu\text{l}$  fluoreszcensen jelölt fenitoint és 100  $\mu\text{l}$  jelöletlen fenitoint (különböző koncentrációjú fenitoin szérumstandardot) mértem be 2 ml-es kromatográfiás mintatartó edényekbe. A bemért antigéneket összekevertem egy kémcsőkeverő segítségével (2-4 másodperc), majd mindegyik üvegcsébe 100  $\mu\text{l}$  ellenanyagot pipettáztam. Az üvegcséket szobahőmérsékleten, állandó rázás mellett (rázógép segítségével) inkubáltam. Ezt követően a reakcióelegyet az áramló oldatos rendszerbe injektáltam, ahol a gélkromatográfiás oszlopon megtörtént az elválasztás, majd a fluoreszcens detektálás. A módszerkidolgozás során az immunreakciót, valamint a kromatográfiás elválasztást befolyásoló paraméterek optimalítását kellett megvalósítani.

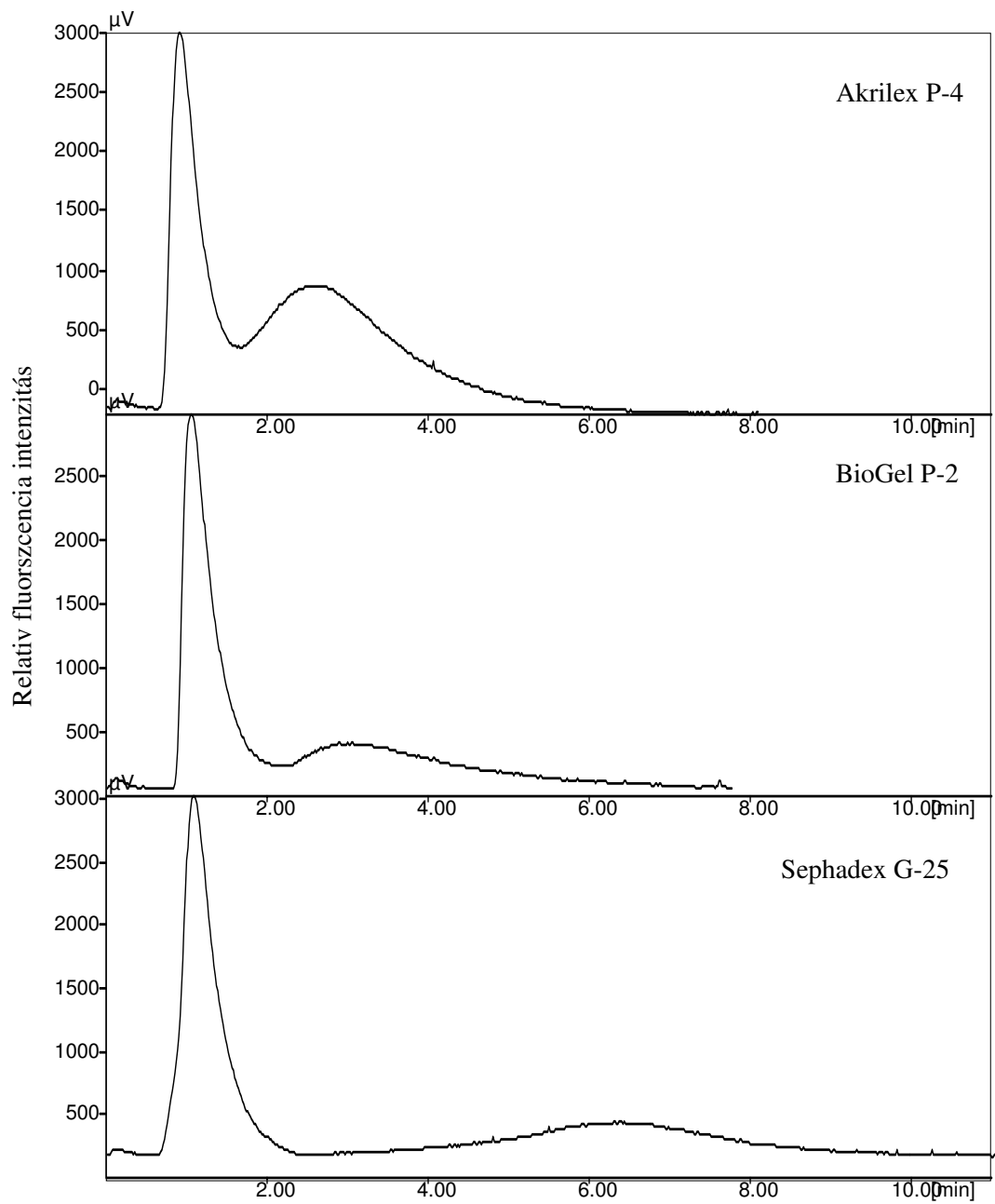
#### **2.3.1.3.1. A kromatográfiás elválasztás optimalítása**

A kromatográfiás elválasztást befolyásoló tényezők optimalítása során azt tartottam szem előtt, hogy megfelelő elválasztást érjek el, ugyanakkor az analízis

ideje, azaz egy kromatogram lefutásának ideje a lehető legrövidebb legyen. A legfontosabb optimalizálható paraméter, mely a kromatográfiás elválasztást befolyásolja maga a *gélkromatográfiás töltet* volt. A megfelelő töltet kiválasztása érdekében különböző vázú tölteteket vizsgáltam. A töltetek kiválasztásánál fő szempont volt, hogy a számunkra megfelelő kizárási tartománnyal rendelkezzenek, a fenitoin molekulatömege 252,27 Da, míg az immunkomplexé 150000 Da fölötti érték. A mérések során vizsgáltam a Sephadex G-25 dextránvázas géلكromatográfiás töltet, a Bio-Gel P-2 akrilamid típusú töltet és az Akrilex P-4 típusú, szintén akrilamid típusú töltet alkalmazhatóságát a géلكromatográfiás elválasztásban. A mérések során kapott kromatogramokat az 6. ábra szemlélteti.

A Sephadex G-25 töltet alkalmazása során azt tapasztaltuk, hogy az ellenanyaghoz nem kötődött fenitoin feltehetően fizikai-kémiai kölcsönhatásba lépett a géllal, adszorbeálódott a kromatográfiás töltetre, lévén, hogy a háromszoros oszloptérfogatnak megfelelő időnél sem eluálódott az oszlopról. Ha összevetjük a Bio-Gel P-2-es és Sephadex G-25-ös töltetekkel kapott kromatogramokat az Akrilex P-4 -es töltettel mért kromatogrammal, azt láthatjuk, hogy az első két töltet esetében a nem kötődött fenitoin csúcsterülete kisebb, mint az Akrilex P-4 töltettel mért nem kötődött fenitoiné. Ez a tény is arra utalhat, hogy az elválasztás során a fenitoin irreverzibilisen vagy legalábbis nagyon erősen kötődik a fenti töltetekhez.

A jelenség vizsgálatára különböző *adalékanyagokat* adtam az eluenshez, hogy magyarázni tudjam ezt a kötődést. Az esetlegesen fellépő ionos kölcsönhatás megszüntetése érdekében 0,1 M NaCl-ot adtam az eluenshez. Az ezzel az eluensösszetétellel mért kromatogramok azonban azt mutatták, hogy a NaCl alkalmazása nem változtatott sem a kromatográfiás idő hosszán, sem a kapott csúcsterületek nagyságán.



**6. ábra** Különböző gélekkel mért kromatogramok 50  $\mu\text{l}$  5  $\mu\text{g/ml}$  fenitoin szérumstandard esetén (1. csúcs immunkomplex; 2. csúcs nem kötődött fenitoin)



Az esetleges hidrofób kölcsönhatás megszüntetése érdekében acetonitrilt adagoltam az eluenshez először 5%-ra, majd 10%, 15% és 20%-ra növelve az eluens acetonitriltartalmát. Ennek következtében úgy a Bio-Gel P-2, mind a Sephadex G-25 töltetek esetében megnőtt az ellenanyaghoz nem kötődött fenitoin csúcsterülete, és a Sephadex G-25 töltet esetében a kromatográfiás időt is sikerült kellőképpen csökkenteni. Ez egyértelműen a hidrofób kölcsönhatás jelenlétére utal. A kapott eredmények azt mutatták, hogy már 15% acetonitril elég volt ahhoz, hogy a kívánt hatást elérjük (az ellenanyaghoz nem kötődött fenitoin csúcsterülete nagyobb lett és a kromatografálási idő is rövidebb lett), azonban ennél az acetonitriltartalomnál, az immunkomplex már nem volt többé stabil. Ilyen mozgófázis-összetételnél már valószínűleg bekövetkezik az ellenanyag denaturálódása. A fent leírt kísérletek alapján az Akrilex P-4 töltetet választottam további kísérleteimhez.

Következő lépésként azt vizsgáltam, hogyan befolyásolja az *oszlophossz* a kromatográfiás elválasztást. Az általam használt Pharmacia gélkromatográfiás oszlop változtatható hosszúságú volt annak függvényében, hogy mennyi géllal töltöttem meg az oszlopot. Méréseket végeztem abban a 3,8 és 6,2 cm-es oszlophossz-tartományban, ahol az oszlop hossza változtatható volt (2. táblázat).

**2. táblázat** Az oszlophossz hatása a gélkromatográfiás elválasztásra (áramlási sebesség= 0,6 ml/min )

Oszlophossz (cm)	Ellenanyag-fenitoin retenciós ideje (min)	Fenitoin retenciós ideje (min)	Kromatografálási idő (min)	Felbontás (R)
3,8	0,81	2,13	6,5	0,58
4,1	0,83	2,23	6,5	0,66
4,4	0,88	2,54	6,5	0,80
4,7	0,91	2,65	6,5	0,77
5,0	0,93	2,85	6,5	0,84
5,3	0,98	2,92	6,5	0,92
5,6	1,01	3,01	7,0	0,94
5,9	1,04	3,22	7,0	0,93
6,2	1,07	3,40	7,2	0,97

A mérések alapján az 5,3-5,6 cm-es oszlophossz-tartományt találtam optimálisnak. Az optimális tartományban a felbontás már elfogadható volt ( $R=0,93$ ) és a kromatografálási idő is 7 perc alatt maradt. Tovább növelve az oszlophosszat a felbontás már nem nőtt számottevően. Alapvonal elválasztást a maximális oszlophossz esetén sem lehetett elérni. A mérés és a kiértékelés az optimális tartományban mindig reprodukálható volt.

Az *áramlási sebesség* hatását is vizsgáltam a kromatográfias elválasztásra, 0,2 és 1 ml/min között változtatva az áramlást (3. táblázat). Arra a következtetésre jutottam, hogy a 0,6 ml/min áramlási sebesség használata optimális. Ezt az áramlási sebességet használva a felbontás 0,97 volt, míg ennél nagyobb sebességeknél a 0,9 - es érték alá csökkent a felbontás.

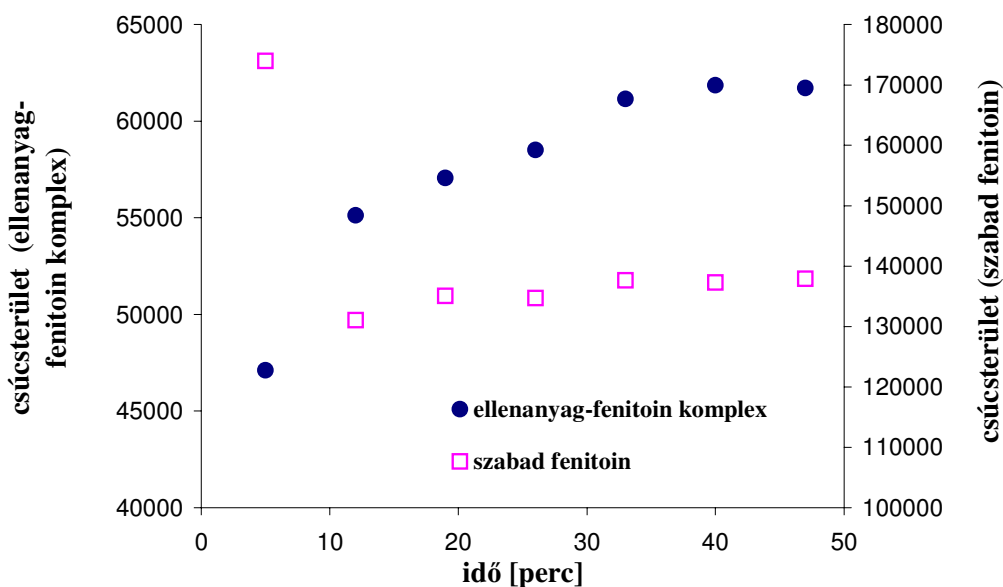
**3. táblázat.** Az áramlási sebesség hatása a gélkromatográfias elválasztásra (oszlophossz= 5,6 cm)

Áramlási sebesség (ml/min)	Kromatografálási idő (min)	Felbontás (R)
0,2	16,5	1,01
0,3	12,0	1,02
0,4	8,0	1,04
0,5	7,0	0,93
0,6	6,0	0,97
0,7	5,0	0,85
0,8	4,2	0,74
0,9	3,7	0,66
1,0	3,0	0,51

#### 2.3.1.3.2. Az immunreakció időtartamának optimalizálása

Az immunreakció időtartama (az inkubációs idő) befolyásolja a mérés érzékenységét, valamint az analízis időtartamát. Az inkubálási idő optimalizálására, az ellenanyag antigénekhez való hozzáadása után a reakciót különböző időtartamokig hagytam végbemenni, majd a reakcióterméket az áramló oldatos rendszerbe injektáltam. A mérések során azt tapasztaltam, hogy 40 perc inkubálási idő eltelte után már nem nőtt tovább az immunkomplex csúcsterülete, ami arra utal, hogy beállt

az immunreakció egyensúlya (7. ábra). Az inkubálási időt ezért 40 percre választottam. A mérések során optimált paramétereket és az optimumértékeket a 4. táblázat foglalja össze.



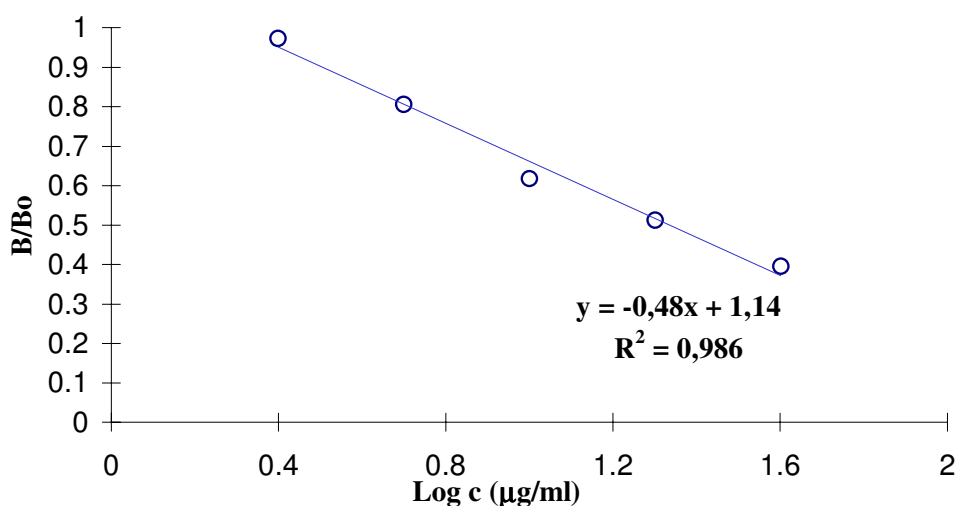
7. ábra Az inkubálási idő optimalálása

4. táblázat Az elválasztást befolyásoló paraméterek optimalálása

Változó	A tanulmányozott tartomány	Optimális érték
Gélkromatográfiás töltet	Sephadex G - 25 Bio-Gel P - 2 Akrilex P - 4	Akrilex P - 4
Áramlási sebesség (ml/perc)	0,2-1	0,6
Oszlophossz (cm)	3,8-6,2	5,3-5,6
Eluens módosító	Nátrium-klorid 0,1 M Acetonitril 0-20 %	Nátrium-klorid 0 % Acetonitril 0 %
Inkubálási idő (perc)	7-60	40

### 2.3.1.3.3. Fenitoin meghatározása a batch módszerrel

A fentiekben leírt módszerrel meghatároztam humán szérumminta fenitointartalmát. Fenitoin szérumstandardokkal kalibrációs egyenest vettem fel 2,5-40  $\mu\text{g/ml}$  fenitoin koncentrációtartományban. A koncentrációszintenként négy párhuzamossal mért kalibrációs egyenes egyenlete a következő:  $y = -0,48x + 1,14$ ,  $R^2 = 0,986$  (8. ábra). Az így kapott egyenes segítségével meghatároztam egy kontroll szérumminta fenitointartalmát. A kontroll szérum általam mért fenitoin koncentrációértéke 13,6  $\mu\text{g/ml}$  volt. Ez nagyon jól egyezett a minta névleges koncentrációértékével, ami 13,4  $\mu\text{g/ml}$  volt.

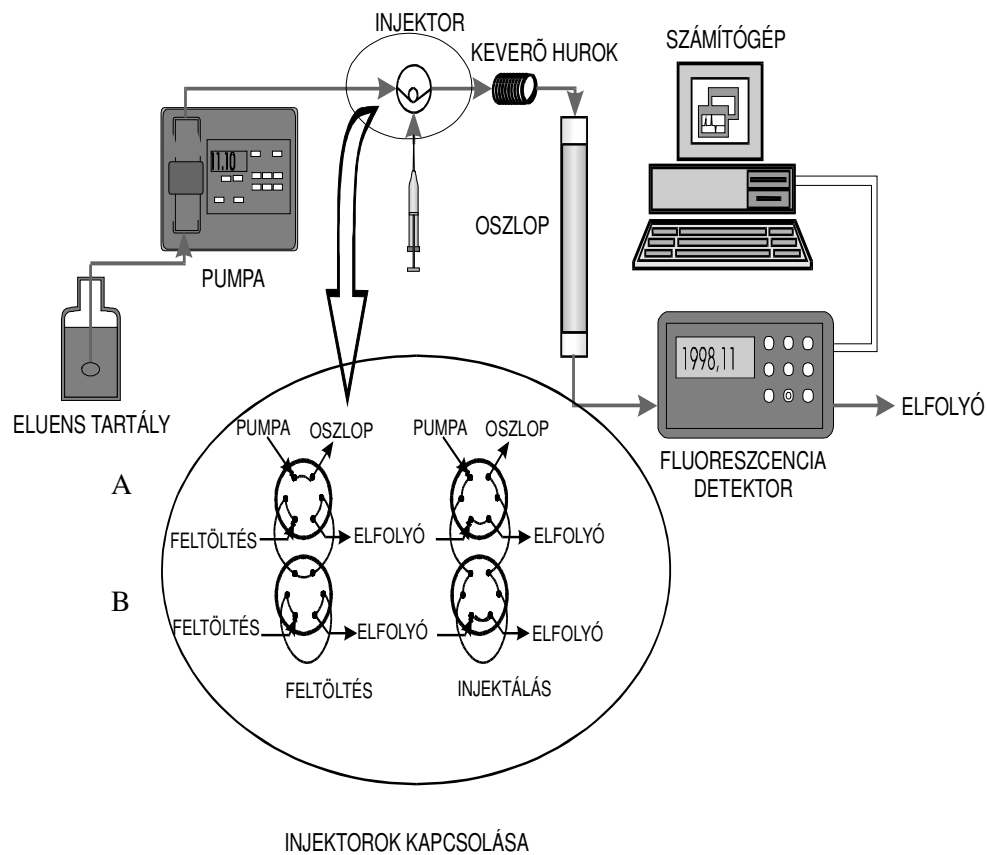


8. ábra Fenitoin humán szérumból mért kalibrációja batch módszerrel

### 2.3.1.4. Az áramlásmegszakításos módszer kidolgozása

Mivel a kidolgozott batch eljárás sebességmeghatározó folyamata (inkubálás) miatt a minták analízisideje hosszú volt, úgy gondoltuk, hogy a módszer továbbfejlesztésére van szükség ahhoz, hogy versenyképes legyen a klinikai módszerekkel. Az inkubálási idő csökkentése az érzékenység bizonyos fokú csökkenésével jár együtt. Ugyanakkor, ha a batch módszerrel olyan körülmények között mértünk volna, amikor még nem állt be az immunreakció egyensúlya, valószínűleg jelentősen romlott volna a mérés ismételhősége az injektlás

előkészítésére fordított idő rossz reprodukálhatósága miatt. Az inkubálási idő jelentős csökkenése önmagában nem okoz gondot, lévén, hogy a detektálás módszere (fluoreszcens) megfelelően érzékeny. Ezért döntöttünk úgy, hogy az immunreakciót is az áramló oldatos rendszerben "játsszadjuk le". Az áramló oldatos rendszerek különösképp alkalmasak olyan mérésekre, ahol nagy precizításra és pontos időzítésre van szükség. Az áramlásmegszakításos immuneljárás kidolgozása során a 9. ábrán vázolt mintabeviteli rendszert építettem ki.



**9. ábra** Az áramlásmegszakításos rendszer

Két injektort kapcsoltem egymásba az alábbi módon: a B injektort az A injektor hurkába kötöttem be. A mintafeltöltés során, az A injektor hurkát az előzetesen összekevert fluoreszcensen jelölt fenitoin és jelöletlen fenitoin szérumstandard (vagy minta) 7,5:1 arányú elegyével töltöttem fel, míg a B injektor hurkát ellenanyaggal töltöttem fel. Amikor a B injektort átforgattam injektálás helyzetbe, annak tartalma átkerült az A injektor hurkába, a két antigén keverék

szegmens közé. Amikor az A injektort az injektálás helyzetbe forgattam át, akkor az eluensáram kimosta az antigén-ellenanyag keveréket az injektorok után elhelyezett keverőhurokba. A keverék keverőhurokba érkezése után az áramlást adott időre leállítottam, ezáltal időt hagyva a jelölt illetve jelöletlen fenitoin ellenanyaghoz való kötődésének. Az áramlás újraindítása után az immunreakció termékei a géلكromatográfiás oszlopon kerültek szétválasztásra, majd fluoreszcens detektálás következett. Az A hurok térfogata  $2 \times 34 \mu\text{l}$  volt, míg a B hurok térfogata  $8 \mu\text{l}$ . Így egy minta mérése során (a hurkok átmosására szükséges reagenstérfogatot is beszámítva)  $150 \mu\text{l}$  antigént (A hurok) és  $20 \mu\text{l}$  ellenanyagot használtam fel (B hurok). Ez a batch módszerhez képest jelentős reagensmegtakarítást is jelentett.

#### *2.3.1.4.1. Az inkubálási idő hatásának vizsgálata*

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam az inkubálási idő hatását a módszer érzékenységére, az injektálás után (miután a reagensek bejutottak a keverőhurokba) különböző időtartamokra megállítottam az áramlást. Kalibrációs egyeneseket vettem fel  $2,5\text{-}40 \mu\text{g/ml}$  fenitoin koncentrációtartományban, mindegyik koncentrációsinten négy párhuzamossal, ily módon pontosság- valamint megbízhatóságvizsgálatot végeztem 10, 5 illetve 2,5 perc áramlás-megszakítást alkalmazva. Az 5. táblázat a különböző áramlásmegszakítási időkkel mért reprodukálhatósági adatokat tartalmazza. A mért adatok a biológiai minták validált mérésénél ajánlott 15%-on belül vannak minden esetben. A mérések során azt tapasztaltam, hogy 2,5 perc alatt már megfelelő mennyiségű immunkomplex keletkezik (a módszer érzékenysége megfelelő), ami lehetővé teszi a fenitoin mennyiségi meghatározását az általam mérni kívánt koncentrációtartományban. Ezért az általam beállított legrövidebb időtartamot, azaz 2,5 percet választottam az áramlásmegszakítás időtartamának. Így egy minta analízisideje, beleértve az inkubálási időt is, 10,5 perc volt.

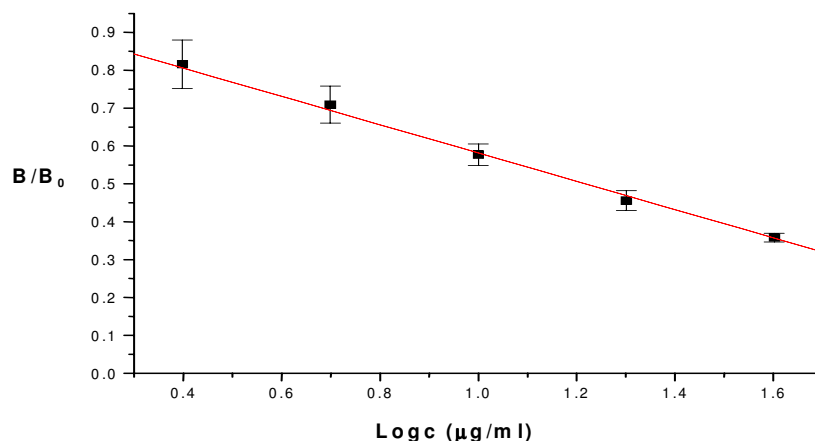
**5. táblázat** Az áramlásmegszakítás vizsgálata

Névleges koncentráció (µg/ml)	Számított koncentráció átlag ± S.D.	Pontosság (%)	Torzítatlanság (%)	Áramlásmegszakítás időtartama (perc)
2,5	2,39 ± 0,06	2,63	-4,43	10
5	5,25 ± 0,61	11,65	5,02	10
10	9,77 ± 0,33	3,33	-2,31	10
20	22,12 ± 0,89	4,01	10,59	10
40	37,19 ± 1,97	5,31	-7,04	10
2,5	2,66 ± 0,39	14,65	6,25	5
5	4,49 ± 0,49	10,97	-10,22	5
10	10,10 ± 1,46	14,48	1,01	5
20	22,65 ± 1,96	8,66	13,24	5
40	37,62 ± 3,63	9,62	-5,94	5
2,5	2,13 ± 0,31	14,30	-14,65	2,5
5	5,71 ± 0,37	6,48	14,11	2,5
10	11,16 ± 1,15	10,32	11,63	2,5
20	19,76 ± 2,28	11,54	-1,18	2,5
40	37,09 ± 3,90	10,54	-7,27	2,5

**2.3.1.5. Az immunanalitikai módszer validálása**

Az általam kidolgozott gélkromatográfiás elválasztáson alapuló áramló oldatos immuneljárást fenitoin szérumból történő meghatározására validáltam. Linearitásvizsgálatot, valamint napon belüli és napok közötti megbízhatóságvizsgálatot végeztem a 2,5-40 µg/ml fenitoin koncentrációtartományban.

A kalibrációs egyenest 5 párhuzamos, egymás utáni napon mért kalibráció átlagolásából határoztam meg. Az egyenesillesztés a legkisebb négyzetek módszerével történt. A kapott egyenes egyenlete:  $y = -0,37x + 0,95$  és az illesztés során kapott regressziós koefficiens értéke  $R^2 = 0,998$  volt. (10. ábra)



**10. ábra** Fenitoin humán szérumból való meghatározása során mért kalibrációs egyenes (n=5)

A kalibrációs mérésekből a módszer ún. napok közötti megbízhatóságát is meghatároztam. A pontosságot, a párhuzamos mérések során kapott értékek középérték körüli szórásaként adtam meg (relatív standard deviáció, RSD%). A torzítatlanság mindkét esetben azt fejezi ki, hogy párhuzamos méréseink átlaga mennyire tér el a névleges értéktől. A számolt átlag koncentrációkat, a pontosságot, és a torzítatlanságértékeket az 5 párhuzamos mérésre a 6. táblázatban tüntettem fel. A napon belüli megbízhatóságot 4 párhuzamossal 5 koncentrációsinten határoztam meg (6. táblázat). Mind a napok közötti, mind a napon belüli pontosság- és torzítatlanságértékek kisebbek, mint 15%, illetve  $\pm 15\%$ , ami megfelel a bioanalitikai módszereknél elfogadott határértéknek. A nominális és a mért koncentrációk eltéréseinek ellenőrzése során az egy napon mért értékeknek a nominálistól való eltérése a különböző napokon mért értékeknek a nominálistól való eltérésénél nagyobbak adódtak, de az exakt statisztikai összehasonlítás (Wilcoxon teszt<sup>184</sup>) alapján a különbség nem szignifikáns.

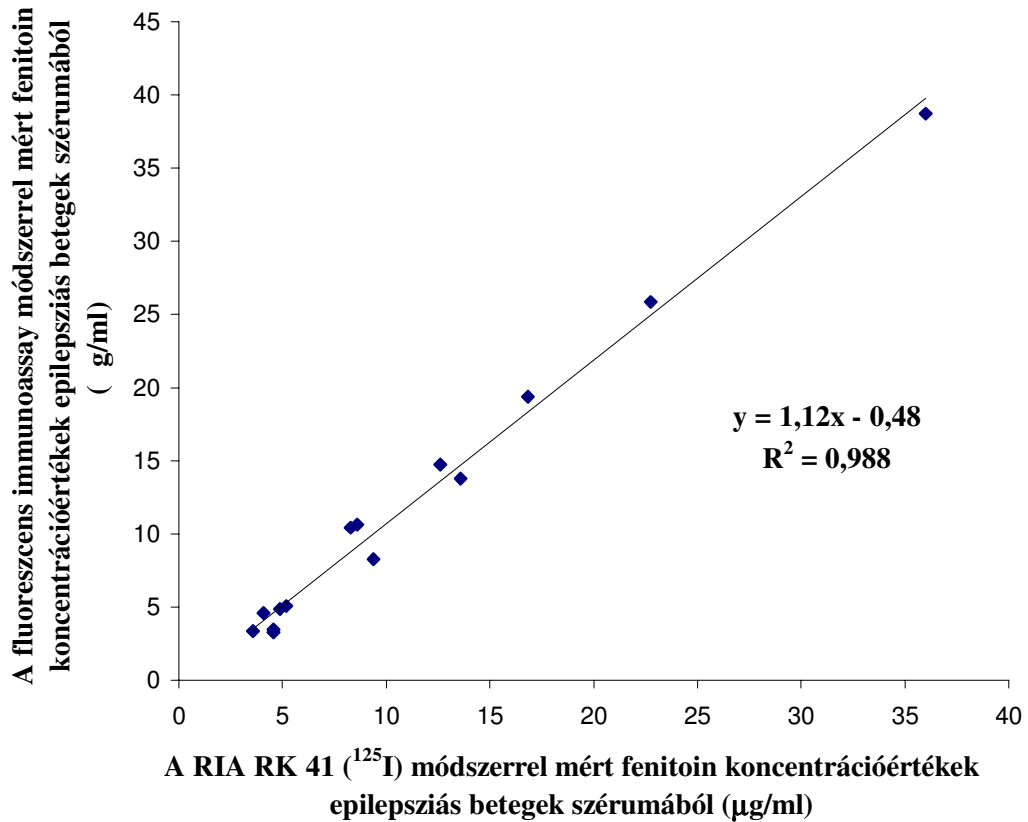


**6. táblázat** A megbízhatóságvizsgálat adatai

Névleges koncentráció (µg/ml)	Számított koncentráció ± S.D. (µg/ml)	Pontosság (%)	Torzítatlanság (%)
Napok közötti megbízhatóság vizsgálata			
2,5	2,53 ± 0,26	10,07	1,28
5	4,75 ± 0,38	8,09	-5,03
10	10,37 ± 1,37	13,18	3,69
20	21,49 ± 1,78	8,30	7,46
40	37,98 ± 1,85	4,86	-5,05
Napon belüli megbízhatóság vizsgálata			
2,5	2,18 ± 0,30	14,19	-12,76
5	5,63 ± 0,65	4,48	12,70
10	11,27 ± 1,15	10,25	12,72
20	19,87 ± 2,27	11,46	-0,64
40	37,12 ± 3,88	10,46	-7,21

#### 2.3.1.5.1. Az eljárás összehasonlítása egy elfogadott analitikai módszerrel

Az általam kidolgozott áramló oldatos immunanalitikai eljárás klinikai alkalmazhatóságának vizsgálatára összehasonlító méréseket végeztem egy már referenciának számító klinikai módszerrel. A referencia módszer radioimmunoassay módszer volt, mely jelölő ágensként  $^{125}\text{I}$  izotópot alkalmazott. Az összehasonlító mérések elvégzése céljából egy kórházból kaptunk szérummintákat olyan betegektől, akik betegségük kezelésére fenitointartalmú gyógyszert kaptak. A begyűjtött mintákat mindkét módszerrel megmértük. A 11. ábra az áramló oldatos immunanalitikai eljárással mért fenitoin koncentrációértékek és a radioimmunanalitikai módszerrel mért koncentrációértékek korrelációját mutatja.



**11. ábra** Az áramló oldatos rendszerrel és a RIA módszerrel mért fenitoin tartalmú szérumminták koncentráció értékének (µg/ml) összehasonlítása

A korrelációs koefficiens értéke  $R^2=0,988$  volt, amely azt mutatja, hogy az általam mért értékek jól egyeznek egy, a fenitoin mérésére referenciamódszernek számító klinikai módszer eredményeivel. Ezzel bizonyítást nyert, hogy az általam kifejlesztett áramló oldatos immunanalitikai eljárás alapuló módszer sikerrel alkalmazható a klinikai analízisben szérumminták fenitoinkoncentrációjának meghatározására a terápiás tartományban.

### **2.3.2. FENOBARBITÁL MEGHATÁROZÁSA HUMÁN SZÉRUMBÓL ÁRAMLÓ OLDATOS IMMUNANALITIKAI MÓDSZERREL**

Bizonyítani akartuk, hogy az előző fejezetben ismertetett áramló oldatos immunanalitikai rendszer könnyen adaptálható (alkalmazható) más kis molekulatömegű gyógyszer meghatározására is. Ezért célvegyületként egy másik, epilepszia kezelésére is használatos gyógyszert, a fenobarbitált választottam.

#### **2.3.2.1. Az immunanalitikai módszer kiválasztása**

Lévén a fenitoin és a fenobarbitál hasonló sajátságúak (a fenobarbitál molekulatömege 234 Da, a terápiás tartománya 20-40 µg/ml, a mérni kívánt koncentrációtartomány 5-80 µg/ml) a fenobarbitál meghatározására ugyanazt az immunanalitikai eljárást alkalmaztam, akárcsak a fenitoin esetén, kompetitív eljárás alapján fluorezcens immuneljárást.

A kalibrációs egyenesek felvételekor, a fenitoinhoz hasonlóan a különböző koncentrációjú fenobarbitál szérumstandardokkal mért immunkomplex csúcsterületének (B) és a 0 koncentrációjú fenobarbitál szérumstandard immunkomplex csúcsterületének (B<sub>0</sub>) arányát ábrázoltam a fenobarbitál szérumstandardok koncentráció logaritmusának (logc) függvényében. A kalibrációs egyenes illesztésekor szintén a legkisebb négyzetek módszerét alkalmaztam.

#### **2.3.2.2. Az immunreagensek kiválasztása**

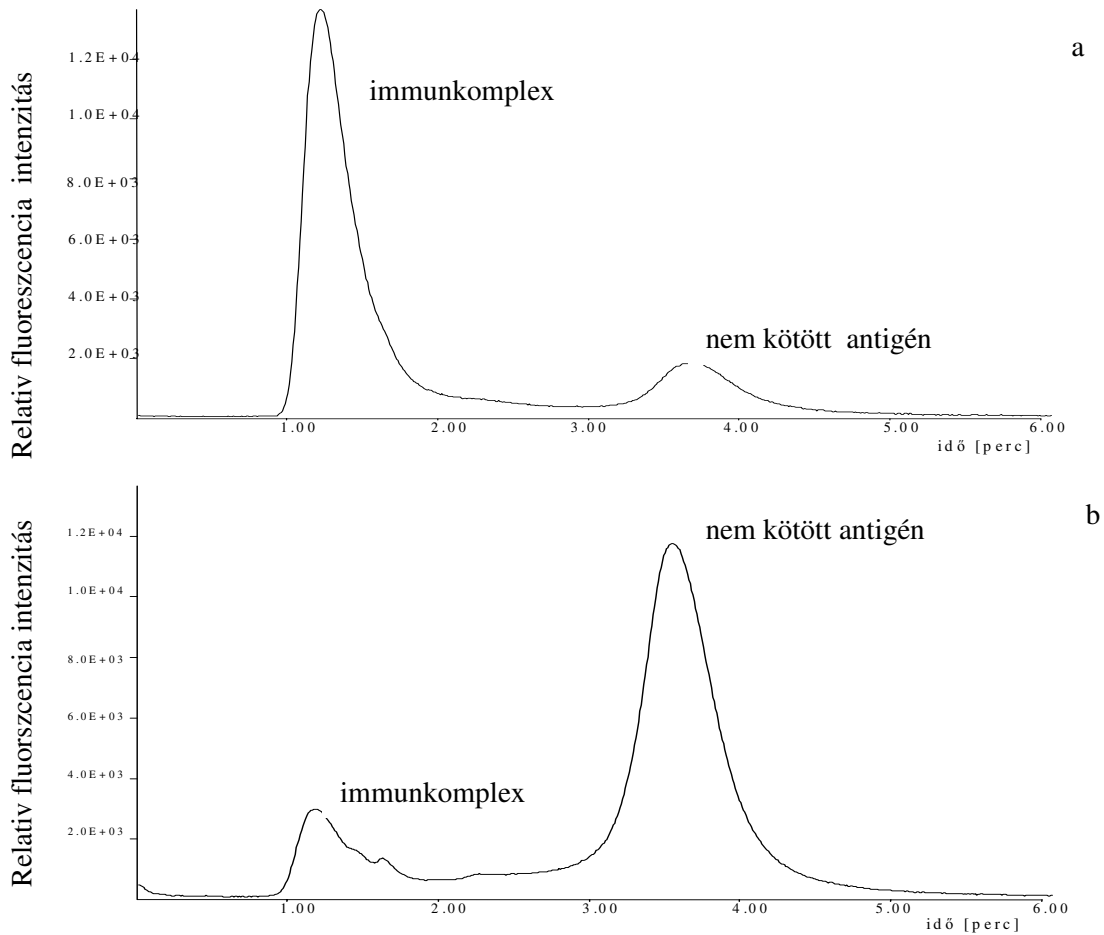
Az immuneljáráshoz szükséges immunreagensek a fenitoin méréshez hasonlóan egy, a fluorezcencia polarizációhoz kifejlesztett, kereskedelmileg kapható immunkészletből származtak. Így ebben az esetben is rendelkezésemre állt a fenobarbitál ellenanyaga, a fluorezcensen jelölt fenobarbitál és a különböző koncentrációjú fenobarbitál szérumstandardok. A fenobarbitál kontroll szérummintákat én állítottam elő, úgy, hogy vak szérumhoz ismert mennyiségű fenobarbitált adtunk. A kontroll szérumkoncentrációk 5, 20 és 40 µg/ml voltak. A mérési eljárás során az immunanalitikai készlet leírásában javasolt ellenanyag-antigén aránnyal dolgoztam 1:8,5 (v/v). A jelöletlen antigén (fenobarbitál

szérumstandard vagy ismeretlen szérumminta) és a fluoreszcensen jelölt antigén (fluoreszcensen jelölt fenobarbitál) aránya 1:7,5 (v/v) volt.

### 2.3.2.3. Az immunanalitikai eljárás optimalálása

#### 2.3.2.3.1. A kromatográfiás elválasztás optimalálása

A hatékonyabb és gyorsabb elválasztás elérése céljából egy nagyhatékonyságú, gyárilag töltött gélkromatográfiás előtét oszlopot iktattam az áramló oldatos rendszerbe. Az új oszloppal jobb elválasztást és 3 perccel rövidebb kromatografálási időt sikerült elérnem (12. ábra), mint a fenitoin mérése esetén.

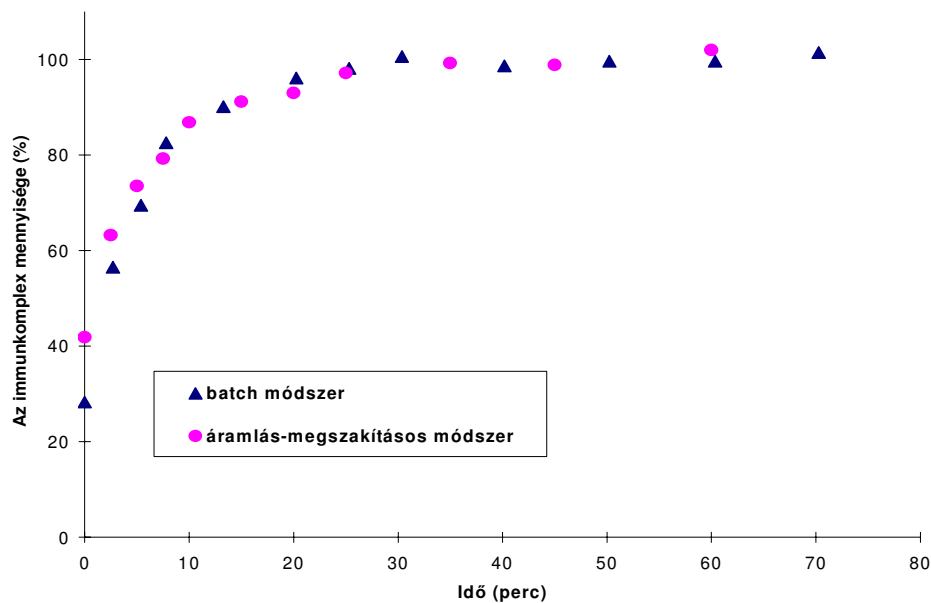


**12. ábra** A 0  $\mu\text{g/ml}$  (a) és a 80  $\mu\text{g/ml}$  (b) fenobarbitál szérumstandard kromatogramjai

### 2.3.2.3.2. Az immunreakció időtartamának optimalása

Az inkubálási időt, azaz az immunreakció egyensúlyának beállításához szükséges időt megmértem batch, valamint áramlásmegszakításos módszerrel is. A batch kísérletek során az ellenanyag antigénkeverékhez való hozzáadása után a reakciót különböző időtartamokig hagytam végbemenni, majd a reakcióterméket az áramló oldatos rendszerbe injektáltam. Az áramlásmegszakításos kísérletek során az egyik hurkot az antigének keverékével, a másik hurkot az ellenanyaggal töltöttem fel, majd a hurkokat injektálási helyzetbe fordítottam és injektáltam őket az áramló oldatos rendszerbe. Miután az immunreagensek beértek a keverőhurokba, az áramlást különböző időközökre leállítottam.

A 13. ábrán a két módszerrel mért immunkomplex mennyiségét tüntettem fel az inkubálási idő függvényében. Az immunkomplex mennyiségét százalékban fejeztem ki, 100%-nak az egyensúlyi mennyiséget tekintve.



**13. ábra** Az immunkomplex mennyiségének változása az inkubálási idő függvényében

Az adatokat megvizsgálva azt látható, hogy 30 perc eltelte után nem nő az immunkomplex mennyisége, ami arra utal, hogy ekkorra már beáll az immunreakció

egyensúlya. A batch és áramlásmegszakításos módszerrel mért adatokat összevetve azt tapasztaltuk, hogy a rövid inkubálási időktől eltekintve mindkét módszerrel ugyanakkora immunkomplex-mennyiséget kapunk, ami azt bizonyítja, hogy az áramló oldatos rendszerben tökéletes a keveredés, vagyis ugyanúgy megy végbe az immunreakció, mint a batch módszernél.

#### **2.3.2.4. Az áramlásmegszakításos immunreakció optimalálása**

Mivel a 30 perces egyensúlyi idő alkalmazása jelentősen megnövelte volna egy minta analízis idejét, ebben az esetben is a nem egyensúlyi immunreakció mellett, azaz az áramlásmegszakításos módszer mellett döntöttem. Megvizsgáltam, hogy nem egyensúlyi körülmények között dolgozva milyen a szelektivitás és az ismételhetőség. Az immunreagensek keverőhurokba való beérkezése után 10, 5 és 2,5 percre leállítottam az áramlást, időt hagyván az immunreakció végbemeneteléhez. A méréseket az 5 µg/ml koncentrációjú fenobarbitál szérumstandarddal végeztem, 6 párhuzamost mérve minden egyes áramlásmegszakítási idő esetén. A mért adatokat a 7. táblázat tartalmazza. A relatív standard deviáció értékek azt mutatják, hogy már 2,5 perc áramlásmegszakítás is elegendő ahhoz, hogy jól ismételhető eredményeket érjek el.

#### **7. táblázat.** Az áramlásmegszakítás időtartamának optimalálása

Koncentráció (µg/ml)	Áramlásmegszakítás időtartama (min)	Csúcsterület átlag ± S.D.	Pontosság (%)
5	10	$(2,48 \pm 0,01) \times 10^5$	4,1
5	5	$(2,22 \pm 0,10) \times 10^5$	4,9
5	2,5	$(1,85 \pm 0,07) \times 10^5$	3,8

A 2,5 perces áramlásmegszakítást alkalmazva azonban azt tapasztaltam, hogy a legnagyobb mérni kívánt koncentrációszinten (80 µg/ml fenitoinkoncentrációnál) már nem elegendő ennyi inkubálási idő ahhoz, hogy megfelelő érzékenységgel tudjak mérni, ugyanis túl kevés a keletkezett immunkomplex mennyisége (a mérések pontossága meghaladta a 20%-ot). Ezért az eljárás során az 5 perces áramlásmegszakítást alkalmaztam. Így egy minta analízis ideje, az inkubálást is

beleértve 10 perc volt. Az 5 perces áramlásmegszakítást alkalmazva az immunreakció hatásfoka ~ 70% volt.

### 2.3.2.5. Az immunanalitikai módszer validálása

A kidolgozott gélkromatográfias elválasztáson alapuló áramló oldatos immuneljárást fenobarbitál szérumból történő meghatározására validáltam. Linearitásvizsgálatot, napon belüli és napok közötti pontosság-, valamint megbízhatóságvizsgálatot végeztem az 5-80 µg/ml fenobarbitál koncentrációtartományban (5; 10; 20; 40 és 80 µg/ml koncentrációszinteken).

A kalibrációs egyenest 5 párhuzamos, egymás utáni napon mért kalibráció átlagolásából határoztuk meg. A kapott egyenes egyenlete:  $y = -0,34x + 0,88$  és az illesztés során kapott regressziós koefficiens értéke  $R^2 = 0,997$  volt.

A kalibrációs mérésekből meghatároztam a módszer napok közötti megbízhatóságát. Az öt különböző napon mért, a kontroll fenobarbitál szérummintákból számolt átlagkoncentrációkat, a megfelelő relatív standard deviációkat és az eltérés értékeket a 8. táblázatban tüntettem fel.

### 8. táblázat. A megbízhatóságvizsgálat adatai

Névleges koncentráció (µg/ml)	Számított koncentráció ± S.D. (µg/ml)	Pontosság (%)	Torzítatlanság (%)
Napon belüli megbízhatósági adatok			
5,0	4,6 ± 0,5	10,1	-8,3
20,0	20,8 ± 1,1	5,4	4,1
40,0	42,0 ± 2,3	5,5	5,0
Napok közötti megbízhatósági adatok			
5,0	5,1 ± 0,5	9,5	1,0
20,0	21,8 ± 1,6	7,3	9,2
40,0	43,8 ± 3,3	7,5	9,4

A számítás során a kalibrációs mérési pontokból számított egyenes egyenlete alapján nyert koncentrációkat összehasonlítottam az általunk bemért koncentrációkkal, és az

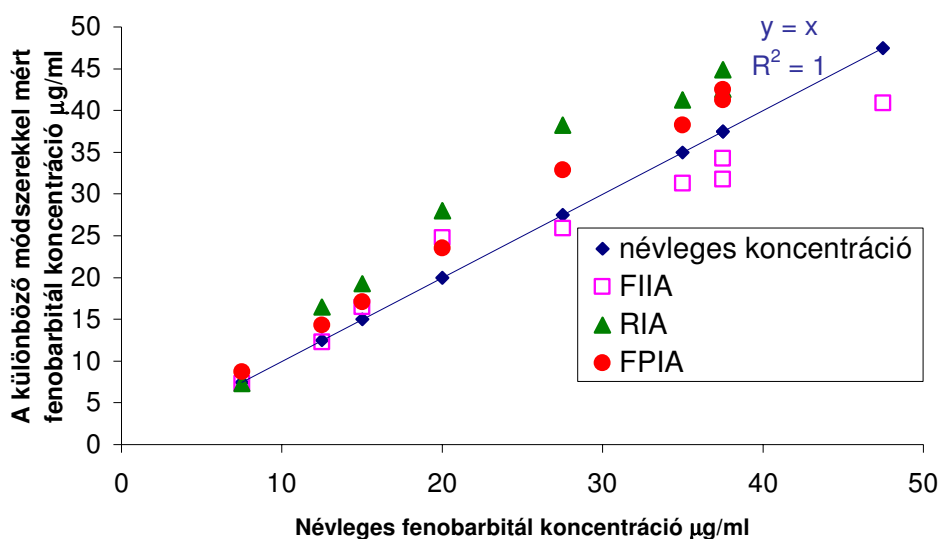
eltérést százalékban fejeztem ki. A napon belüli pontosságot és torzítatlanságot 5 párhuzamossal 3 koncentráció szinten határoztam meg, szintén a fenobarbitál kontroll szérumminták segítségével (8. táblázat). Mind a napok közötti, mind a napon belüli pontosság- és szórásértékekre 15% alatti értéket kaptam, ami megfelel a bioanalitikai módszereknél elfogadott értéknek.

#### *2.3.2.5.1. Az eljárás összehasonlítása elfogadott analitikai módszerekkel*

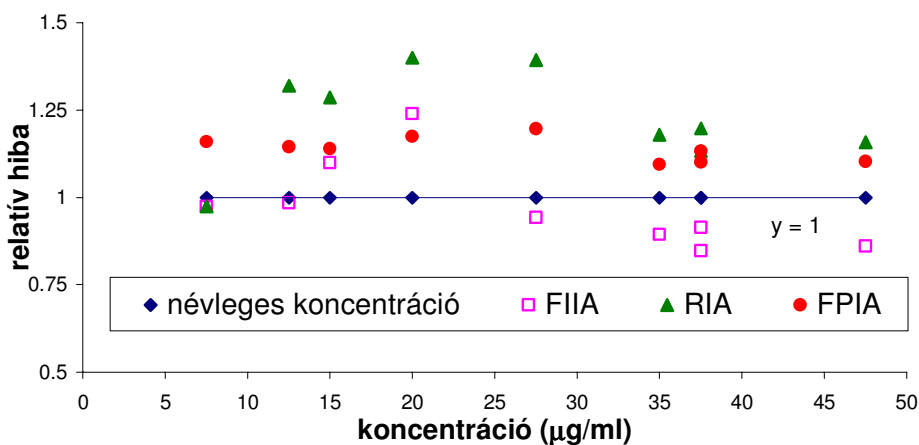
Az áramló oldatos immunanalitikai eljárás klinikai alkalmazhatóságának vizsgálatára összehasonlító méréseket végeztem, két referenciamódszernek számítógépes klinikai módszerrel. Az egyik referenciamódszer egy  $^{125}\text{I}$  izotópos radioimmunoassay (RIA) volt, a másik referenciamódszer egy fluoreszcencia polarizációs immuneljárás (FPIA) volt. Mivel nem tudtunk beszerezni fenobarbitállal kezelt betegek szérummintáit, az összehasonlító mérések elvégzése céljából vak szérumhoz fenobarbitált adtunk, úgy hogy a koncentráció az 5-80  $\mu\text{g/ml}$  fenobarbitál koncentrációtartományban legyen. A szérummintákat mindhárom módszerrel megmértük. A 14. ábrán az áramló oldatos immunanalitikai eljárással és a másik két referenciamódszerrel mért fenobarbitál koncentrációértékeket ábrázoltam a névleges fenobarbitál koncentrációértékek függvényében. Az 14. ábra adataiból látható, hogy az áramló oldatos eljárással a névleges koncentrációhoz képest kisebb koncentrációt mértem, míg a két referenciamódszer esetén a nominális koncentrációértékhez képest magasabb értéket mértek. A három módszer esetén kiszámolt eltérések négyzetösszege (9. táblázat) azt mutatja, hogy a FPIA módszer esetén a legkisebb az eltérés, így megbízhatóbb mérést tesz lehetővé. A 15. ábra alapján a módszerek relatív hibáit összehasonlítva az látható, hogy a FPIA és RIA módszerek hibái nagyságra hasonlóak, míg a RIA módszer esetén a relatív hiba nagyobb.

A fentiek alapján elmondható, hogy az általunk kifejlesztett áramló oldatos immunanalitikai eljárás alapján alapuló módszer sikerrel alkalmazható a klinikai analízisben szérumminták fenobarbitálkoncentrációjának meghatározására a terápiás tartományban.





14. ábra A három módszerrel (FIIA, RIA és FPIA) mért fenobarbitál koncentrációértékek változása a névleges fenobarbitálkoncentráció függvényében



15. ábra A három módszer (FIIA, RIA és FPIA) esetén számolt relatív hibák változása a névleges koncentráció függvényében

9. táblázat A három módszer esetén számolt elérések négyzetösszege

N=9	FIIA	RIA	FPIA
Eltérések négyzetösszege	1328,2	6135,7	1827

### 3. MOLEKULÁRIS LENYOMATOT TARTALMAZÓ POLIMEREK

#### 3.1. IRODALMI RÉSZ

Az analitikai kémiában tapasztalható növekvő igény a gyors, nagy érzékenységgű és nagy szelektivitású módszerek iránt, új módszerek kidolgozásához, új típusú anyagok megjelenéséhez vezet, amik eleget tehetnek a kívánt követelményeknek. A biológiai felismerő rendszerek az utóbbi években a tudóstársadalom érdeklődésének középpontjába kerültek, mivel az ezekben a rendszerekben lejátszódó folyamatok megismerésének segítségével, nagy érzékenységgű és nagy szelektivitású kémiai módszerek kidolgozására nyílik lehetőség. A legtöbb biológiai folyamatnak, mint pl. az ellenanyag-antigén kötődés, az enzim-szubsztrátum reakciók, a receptorokon való kötődés stb. egy-egy szelektív molekuláris felismerési lépés képezi az alapját. Ez a molekuláris felismerési lépés egy adott „gazda” (host) struktúrájának megfelelő „vendég” (guest) kiválasztását és bekötődését foglalja magába.

A kutatókat régóta foglalkoztatja a kérdés, hogy olyan anyagokat állítsanak elő, melyeknek molekuláris felismerő tulajdonságai a biológiai felismerő rendszerekéhez hasonló szelektivitási tulajdonságokkal rendelkeznek. A stabil, könnyen és gyorsan előállítható, molekuláris felismerésre alkalmas anyagok, melyek szelektív és erős kötés kialakítására képesek különböző molekulákkal, fontos szerepet játszhatnak a gyors és érzékeny analitikai módszerek kidolgozásában. Néhány évtizeddel ezelőtt Wulff és Sarhan<sup>53</sup> olyan eljárást dolgoztak ki, amelynek segítségével szelektív kötőhelyeket hoztak létre térhálós szerkezetű polimerekben. A módszert *molekuláris lenyomatképzési eljárásnak* nevezzük. A molekuláris lenyomatképzés során rendkívül stabil, szelektív molekulafelismerő tulajdonsággal rendelkező anyagokat, polimereket állíthatunk elő. Az irodalmi összefoglaló további részében, egy rövid történeti áttekintést követően, a molekuláris lenyomatképzési eljárásokat, az előállított polimerek kémiai, illetve analitikai alkalmazhatóságát, valamint az előállított lenyomatok sokszínűségét szeretném röviden bemutatni.

### 3.1.1. Polimerek molekuláris emlékezettel - rövid történeti áttekintés

Bár a molekuláris lenyomatok és a molekuláris lenyomatképzési eljárások főleg az utóbbi időben tettek szert nagy népszerűsége, ha a történeti alapokat szeretnénk felkutatni, egészen az ezerkilencszázharmincas évekig kell visszamennünk. Főként három kutató nevét kell ezekből az időkből megemlítenünk, akik munkájuk során ún. molekuláris lenyomatokat állítottak elő.

Elsőként Poljakov<sup>54</sup> foglalkozott a molekuláris felismerés jelenségével, mikor kutatásai során szilikagéleket vizsgált kromatográfiás alkalmazás céljából. Kísérletei során Poljakov a szilikagélt a nátrium-szilikát oldat megsavanyításával, polimerizáció útján állította elő. A géles szilika polimer megszárítva merev szerkezetűvé vált. Az előállított polimer kötési tulajdonságainak vizsgálatára a szárítási folyamatot több adalékanyag (benzol, toluol, xilol) jelenlétében is elvégezte. A kísérletei során azt tapasztalta, hogy  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  iniciátor használata esetén, összehasonlítva a három adalékanyag kötődését a polimerhez, annak az adalékanyagnak volt nagyobb a megkötődése, amelynek a jelenlétében történt a polimer szárítása. A szárítás során használt adalékanyag nagyobb mértékű kötődését, az adalékanyag hozzáadása következtében a szilikagél szerkezetében beállt változásokkal magyarázta.

Jó egy évtizeddel Poljakov munkáját követően, Paulingot<sup>55</sup> a biokémiai folyamatok és a biomolekulák kutatása vezette a molekuláris felismerés irányába, miközben az ellenanyagok képződési mechanizmusát tanulmányozta. A kísérletei során szérum globulinokat inkubált különböző antigének (additívok) jelenlétében, mint pl. metilénkék, arzénsavszármazékok, majd ezeket kicsapta. Az antigének eltávolítása után az újonnan nyert ellenanyagok hatékonyabbak voltak az előállításuk során jelenlévő antigének kicsapására, mint azoknak az anyagoknak a kicsapására melyek az antigénekéhez hasonló szerkezettel bírtak. Bár ma már ismert, hogy a fenti elmélet az ellenanyagok képződésére nem állja meg a helyét, mégis ezek a biológiai rendszerekkel végzett kísérletek indították el Dickeyt a további kutatások útján.

Dickey<sup>56</sup>, a Poljakov és Pauling által leírtak alapján kezdte meg kísérleteit. Szintén szilikagélt állított elő nátrium-szilikát savkatalizálta polikondenzációjával, mely polimerizációt alkil-narancs festék jelenlétében végezte. A festék kimosása után a

kísérletek azt bizonyították, hogy a festék jelenlétében előállított polimer jelentős szelektivitást mutatott a festékre. A Dickey által leírt szilikagél polimerizációs eljárás abban különbözött a Poljakov által leírtól, hogy ő az adalékanyag jelenlétében végezte a polimerizációt, akárcsak Pauling az inkubálást az szérum globulin esetén.

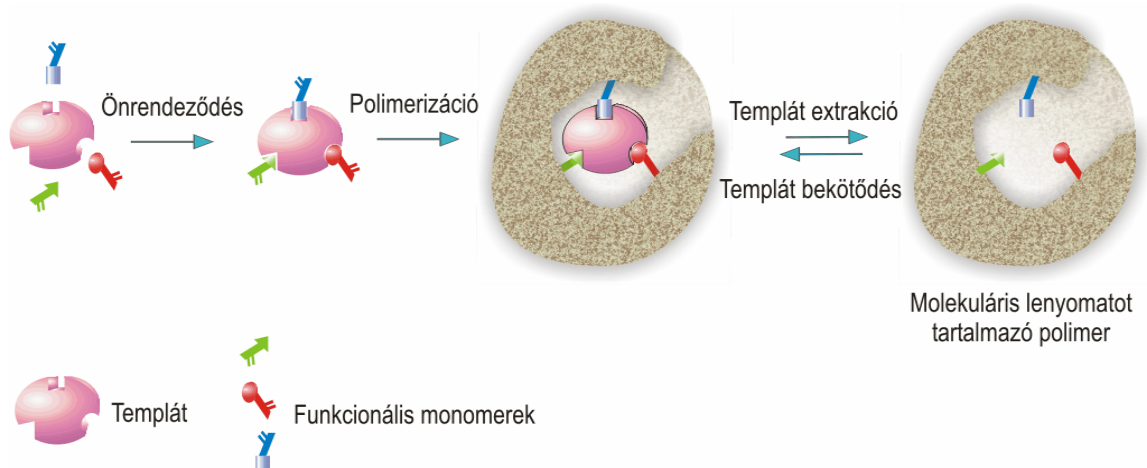
A fentiekben leírt szorbensnek voltak azonban hátrányai is. Csak azokra az anyagokra volt sikerrel alkalmazható, amelyek adszorbeálódtak a szilikagélre, illetve idővel a felismerés csökkent és a polimer sem volt mindig reprodukálható. Dickey a molekuláris felismerést a mosás során el nem távolított, a polimer szerkezetében "ragadt" festékmolekuláknak tulajdonította. A későbbiek során többen is tanulmányozták, és próbálták magyarázni a jelenséget. Valószínűsítették, hogy a polimerben ragadt, mosással el nem távolítható molekulák elindítanak egy kristályosodási folyamatot, ami által ún. klaszterek jönnek létre a pórusokon belül. Ennek a klaszter mechanizmusnak tulajdonították a polimerek molekuláris felismerő tulajdonságát.

A hetvenes évek elején, a Wulff<sup>53</sup> és munkatársai által bevezetett új módszerek, széles utat nyitottak a molekuláris lenyomatképző eljárások és alkalmazhatóságuk előtt. Az általuk kidolgozott eljárás során egy megfelelő monomert (ún. funkcionális monomert), mely funkciós csoportja(i) segítségével alkalmas kovalens vagy nem kovalens kötések kialakítására a lenyomatmolekulával (templát), kopolimerizációnak vetettek alá egy ún. keresztkötő anyag jelenlétében. A lenyomatmolekula eltávolítása után a polimer szerkezetében így olyan kötőhelyek keletkeztek, melyek funkciós csoportjaik elhelyezkedésének köszönhetően alkalmasak voltak a lenyomatmolekula szelektív megkötésére. A polimer szerkezetében ugyanis a stabil térhálós szerkezetnek köszönhetően rögzült funkciós csoportok megfelelő térbeli elhelyezkedése elősegítette a lenyomatmolekula szelektív kötődését. A fentiekben leírt eljárás során Wulff és munkatársai egy szacharidot, a fenil- $\alpha$ -D-mannopiranozidot választották lenyomatként, míg a monomer szerepét a 4-vinil-fenil-bórsav játszotta. A bórsavészter létrejötte után következett a polimerizáció, mely a főlegben adagolt keresztkötő jelenlétében, gyökös polimerizáció útján ment végbe. Az előállított polimerből a lenyomatot egy egyszerű mosási lépéssel távolították el, vizet, illetve víz-metanol elegyet alkalmazva

hidrolizálták az észter kötést. Az előállított polimer alkalmas volt a lenyomatmolekula szelektív megkötésére. Ez volt az első olyan munka, amelyben reverzibilis kovalens kötések segítségével molekuláris lenyomatot alkottak. Wulff és Sarhan úttörő munkáját követően, egyre több cikk jelent meg az irodalomban, melyben molekuláris lenyomatok előállítását írták le különböző technikákat használva.

*Mosbach* kutatócsoportja, a '80-as években<sup>57-59</sup> kovalensen nem kötött monomerből és templátból előállított polimerek szintézisét tanulmányozta. 1994-ben<sup>60</sup> jelent meg az első cikk melyben leírták nem-kovalens eljárás útján előállított molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer szintézisét. A polimerizációt megelőzően önrendeződés következik be, azaz a funkcionális monomer és a lenyomatmolekula között másodlagos kötőerőkkel történő komplexképzés jön létre. Az első lépésben a lenyomatmolekulát (L-fenil-alanin, L-PheAN) és a funkcionális monomert (metakrilsav, MAA) alacsony polaritású oldószer segítségével oldatba vitték. Ezt követte a keresztkötő (etilén-glikol-dimetakrilát, EDMA) hozzáadása, majd a polimerizáció, melyet az iniciátor hozzáadása után alacsony hőmérsékleten, fotokémiai úton végeztek. Az előállított polimert dörzsoszárban összetörték, majd különböző oldószerek segítségével extrahálták a lenyomatmolekulát a polimerből. Ily módon a templátmolekulát az enantiomer párjához képest szelektíven megkötő, molekuláris lenyomatot tartalmazó polimert nyertek.

Az 16. ábrán a nem kovalens molekuláris lenyomatképzés sémáját szemléltetem.



**16. ábra** A nem kovalens molekuláris lenyomatképzés

### 3.1.2. Molekuláris lenyomatképzési eljárások

Az alábbi fejezetben a főbb molekuláris lenyomatképzési eljárásokat mutatom be a teljesség igénye nélkül.

#### 3.1.2.1. Kovalens eljárással készült polimerek

A kovalens vagy „előrendezett” eljárással készült polimerek esetén a polimerizációt megelőzően a monomer és a templát között erős, de reverzibilis (azaz megfelelő reagenssel könnyen bontható) kovalens kötést hoznak létre. A jelentős mennyiségű keresztkötő anyag hozzáadása és a polimerizáció után a megszilárdult polimerből, a templátot kötő kovalens kötések hasításával és a templát extrakciójával alakulnak ki a szelektív felismerőhelyek a polimerben.

A Wulff és Sarhan által 1972-ben leírt első, kovalens módon előállított polimer királis kötőhelyeinek köszönhetően racém keverékek elválasztására szolgált. Ezt követően számos példát találhatunk az irodalomban kovalens úton előállított polimerekre. Főként olyan polimereket írtak le, ahol a kovalens kötések Schiff-bázisok és aminosavszármazékok segítségével valósították meg. A kovalens eljárás egyik előnye, hogy ismert a funkcionális monomer és a templát közti reakció sztöchiometriája, ezáltal a szelektív kötőhelyek is könnyebben jellemezhetők. Másik előnye az eljárásnak, hogy lehetőség nyílik kettő vagy több, különböző funkcionális csoport bevitelére a kötőhelyekbe, ami nagy jelentőséggel bírhat katalitikus aktivitással rendelkező kötőhelyek létrehozásában.

Akad azonban néhány hátrány is. Ezek főleg abból adódnak, hogy kevés olyan reverzibilis kovalens kötést ismerünk, amelyek stabilak a polimerizáció során, ugyanakkor könnyen felbomlanak, amikor a templát extrakciójára kerül sor. Szintén hátrány, hogy lassú a kinetika a kovalens kötés kialakulásakor, illetve a felhasadásakor és a bekötődés folyamata során. A templát teljes extrakciója is meglehetősen nehéz feladat, hiszen általában csak 90%-os hatásfok érhető el. Eltekintve néhány olyan esettől, amikor intenzív mosási lépésekkel sikerül a templátot eltávolítani (pl. Schiff-bázisok), az esetek túlnyomó többségében (amidok, ketálok, karbonsavészterek)

lényegesen drasztikusabb lépéseket kell alkalmaznunk. A 10. táblázatban néhány kovalens eljárással előállított molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer irodalmi hivatkozásait foglaltam össze.

**10. táblázat** A kovalens lenyomatképzésben alkalmazott néhány templát

Templát	Hivatkozás	Templát	Hivatkozás
tesztoszteron	61	androszt-5-enol	62
L-fenil-alanin	63	L-dopa	64
szialsav	65	galaktóz	66
kasztaszteron	67	fruktóz	66

A fentiekben a kovalens eljárással készült és kovalens kötődés alapján működő polimereket tekintetem át. Léteznek azonban olyan polimerek is, amelyek kovalens szintézissel készülnek és nem-kovalens kötődés alapján történik a molekulafelismerés<sup>68</sup>. Ezáltal a korábban tárgyalt lassú kötődés kiküszöbölhető, míg a kötőhelyek létrehozása továbbra is jól defineált módon, kovalens szintézissel valósul meg. Az első ilyen polimert Sellergren és Andersson<sup>69</sup> állították elő 1990-ben. Az előállított polimer szelektivitást mutatott ( $\alpha=1,26$ ) az L-*p*-amino-fenil-alanin-etilészterére, mely a polimer előállítására felhasznált templát (N'-propionil-L-2-amino-3-(4-hidroxi-fenil)-1-propanol-di-akrilóil-észter) analógja volt.

Szintén a kovalens szintézis kategóriájába sorolhatjuk a Whitcombe és munkatársai<sup>70</sup> által a koleszterin meghatározására bevezetett, úgynevezett „sacrificial spacer” módszert, amely tulajdonképpen a kovalens és nem-kovalens eljárás elemeit ötvözi. Ez a kovalens-nem kovalens eljárás sikeresen használja ki a kovalens szintézis és a nem-kovalens bekötődés kínálta előnyöket, de ritkán alkalmazható mivel csak hidroxicsoporttal rendelkező templátok esetében volt sikeres.

### **3.1.2.2. Fémionkoordinációs kötésen alapuló szintézisek**

A fémionkomplexekben levő koordinatív kötések elegendően erősek lehetnek ahhoz, hogy lenyomatképzés során bekövetkezzen a templát funkcionális monomer

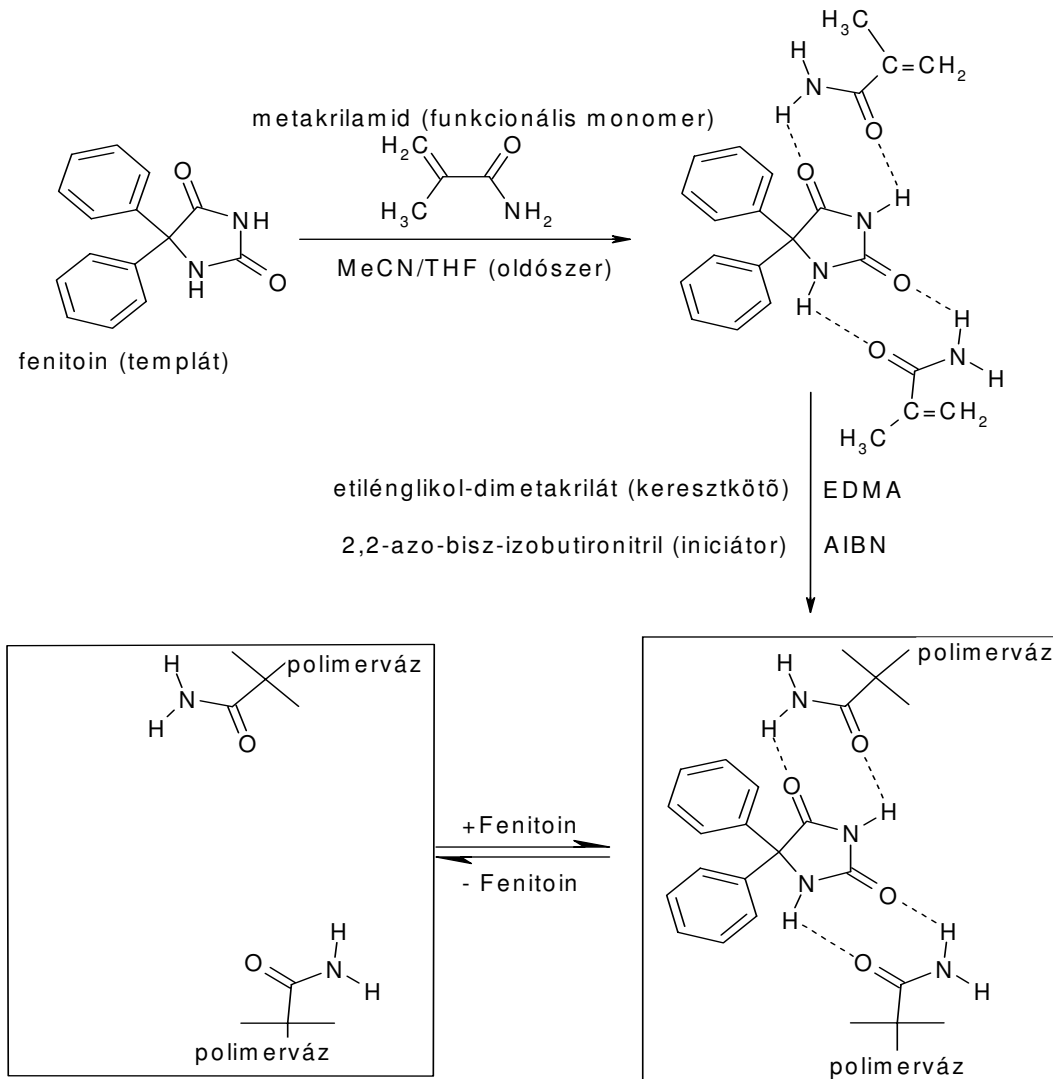
általi komplexbe vitele. Arnold<sup>71</sup> és kutatócsoportja szerves molekulák lenyomatképzését valósította meg ezzel a technikával. Monomerként főként a  $\text{Cu}^{2+}$  N-(4-vinil-benzil)-imino-diecetsavval<sup>72,73</sup> képzett komplexét használták, míg lenyomatként bisz-imidazolokat, aminosavakat és monoszacharidokat alkalmaztak. Az Arnold munkacsoportja által bevezetett technikát a későbbiekben más kutatócsoportok is alkalmazták. Egy igen különleges alkalmazást írt le Jenkins<sup>74</sup>.  $\text{Eu}^{3+}$  komplexképző alkalmazásával a Szarin és Szomán nevű ideggázok mérésére alkalmas szenzort fejlesztettek ki ezt a lenyomatképzési eljárást alkalmazva.

### **3.1.2.3. Nem kovalens eljárással készült polimerek**

Mivel munkám során kizárólag ezt a technikát alkalmaztam a fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek előállításánál, ezért részletesebben kitérek erre az eljárásra, és bemutatom a szintézisek során alkalmazott anyagok (funkcionális monomer, templát, keresztkötő, oldószer, iniciátor) széles tárházát. Amint azt a történeti áttekintésben is láthattuk, a nem-kovalens eljárást először Mosbach és kutatócsoportja alkalmazták. A technika egyszerűségének és gyorsaságának köszönhetően ezt követően igen nagy népszerűsége lett<sup>75-83</sup>. Az elmúlt évek folyamán az irodalomban közölt molekuláris lenyomatok jelentős részét ezt az eljárást alkalmazva állították elő.

Az eljárás három fő lépésből áll. Az első lépés során a *templát és a monomer önrendeződése* történik, majd ezt követi a *polimerizáció* és végül a *templát extrakciója* a polimerből. A templátnak a polimer mátrixból való eltávolítása után a polimerben megüresedett felismerő helyek maradnak vissza, melyek specifikusak a mintamolekulára. A felismerő helyek formája, térállása, valamint a rajtuk lévő funkcionális csoportok szelektív kötőhelyeket eredményeznek, amiket a polimerváz stabilizál, és ezáltal lehetővé válik a templát szelektív kötődése. A fentiekben tárgyalt három lépést az általam előállított fenitoin lenyomatot tartalmazó új polimer előállítási sémáján szemléltetem (17. ábra).





**17. ábra** Fenitoin lenyomatképzése

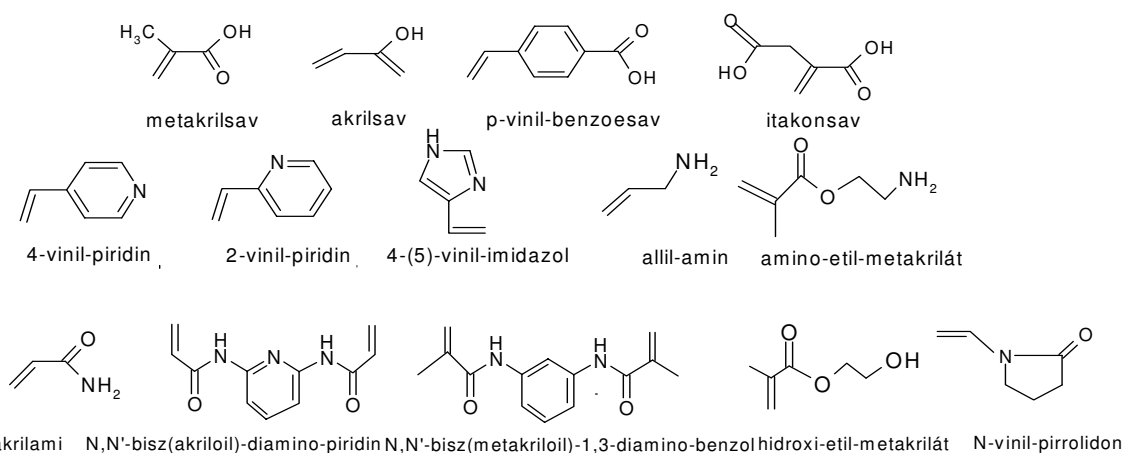
Az eljárás rendkívül egyszerű. A templátot, ami lehet maga a mintamolekula, amelyre szelektív polimert szeretnénk előállítani, vagy a molekula analógja, egy lehetőleg nem poláros oldószerben oldjuk, és hozzámérjük a funkcionális monomert. Ezt követően önrendeződés következik be, amikor is kialakul egy komplex, amit a templát és a funkcionális monomer alkotnak, és amit gyenge intermolekuláris kölcsönhatások tartanak össze (pl. ionos vagy hidrofób kölcsönhatás, hidrogénhíd, van der Waals vagy  $\pi$ - $\pi$  kötés). A következő lépés a keresztköző hozzámérése a polimerizációs elegyhez, majd ezt követi a polimerizáció, melyet valamilyen iniciátor segítségével indítunk el. A polimerizáció előtt kialakult komplexek merev térhálós

szerkezet kialakulásával stabilizálódnak. A polimerizáció végbemehet hő (termikus polimerizáció) vagy fény (fotopolimerizáció) hatására, a polimerizáció időtartama mindkét esetben meghaladja a 16 órát. A keletkezett szilárd tömbpolimert kalapáccsal darabokra törjük, majd dörzsmozsárban szemcsékre őröljük. Ezt követően a templát extrakciója következik, amit általában Soxhlet extrakció segítségével valósítunk meg, valamilyen poláros oldószerrel. Az extrahált polimert szitálással méret szerinti frakciókra osztjuk. A teljes előállítási folyamat körülbelül 3-4 napig tart.

A polimerizációban résztvevő komponensek mindegyike jelentős szerepet játszik a szintézisben és nagymértékben befolyásolja az előállított polimer felismerési tulajdonságait. A továbbiakban ezekre szeretnék bővebben kitérni.

### 3.1.2.3.1. Funkcionális monomerek

Bár a funkcionális monomer a lenyomatot tartalmazó polimernek csak kis százalékát alkotja, kulcsfontosságú szerepet játszik a lenyomatképzésben. A funkcionális monomer kiválasztásának fő szempontja, hogy a monomer funkciós csoportjai és a templát között specifikus kölcsönhatások tudjanak létrejönni. A monomer kiválasztásánál figyelembe kell vennünk azt is, hogy milyen az oldhatósága, milyen reakciókba léphet a keresztkötővel, és hogy mibe kerül. A leggyakrabban alkalmazott funkcionális monomereket a 18. ábrán tüntettem fel.



**18. ábra** A nem kovalens lenyomatképzési eljárás során leggyakrabban alkalmazott funkcionális monomerek

Láthatjuk, hogy a nem kovalens eljárás során használnak savas, bázikus és semleges monomereket is. A funkcionális monomer kiválasztása minden esetben a mintamolekulán levő funkciós csoportoktól függ.

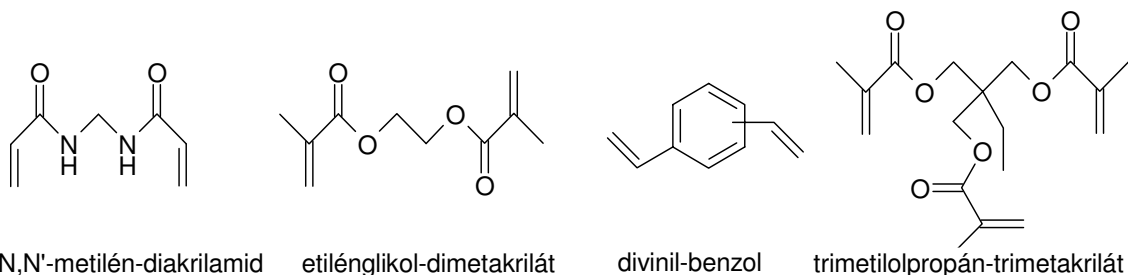
#### *3.1.2.3.2. Oldószer*

A polimerizációs oldószer kiválasztása során a fő szempont az, hogy a polimerizációs elegy komponenseit oldatba vigyük. Ugyanakkor figyelembe kell vennünk, hogy milyen hatást gyakorol az oldószer a templát-monomer komplex kialakulására, valamint azt is, hogy milyen lesz az előállított polimer porozitása és felülete. A nem kovalens eljárással előállított polimerek esetén a nem poláros oldószer a leggyakrabban használtak, mint pl. az acetonitril, a diklór-metán, a kloroform vagy a toluol. Ismeretesek azonban olyan rendszerek is, ahol polárosabb oldószereket alkalmaztak, mint például metanolt, tetrahidrofuránt vagy dimetilformamidot. A vizes közegben történő polimerizáció megvalósítása még mindig kihívást jelent a kutatók számára. Számos kísérlet történt ugyan vizes közegben történő polimerizációra, de az előállított polimerek szelektivitása jóval alul maradt a várakozásokhoz képest. A vizes közegben történő polimerizáció fő akadályát az képezi, hogy a víz erős dipólus- és hidrogénhid-képzésre is hajlamos, ezért nem kedvez a monomer-templát komplex létrejöttének. Emellett a polimerizációs keverék oldhatósága is rosszabb vizes közegben.

#### *3.1.2.3.3. Keresztkötők*

A keresztkötők maguk is monomerek és feladatuk, hogy biztosítsák a polimer térhálós szerkezetének kialakulását. A térhálós szerkezet kialakítása és stabilizálása mellett döntően befolyásolják az előállított polimer porozitását és hidrofóbicitását is. Mivel a polimerizáció a keresztkötő nagy feleslegének jelenlétében megy végbe, így a lenyomatot tartalmazó polimer végső tömegének 80-90%-át a keresztkötő képezi. A polimer százalékos összetételét tekintve tehát főkomponens, így döntő szerepet jut neki

a polimerizációs elegy oldatba vitele során. A keresztkötők általában folyadékok, melyek jól oldódnak szerves oldószerekben, de nem mindig azokban, amiket a nem kovalens eljárások során a leggyakrabban alkalmaznak. Ezért a keresztkötő oldhatósága meghatározó faktor a legtöbb esetben. A leggyakrabban alkalmazott keresztkötők szerkezeti képleteit a 19. ábrán tüntettem fel.

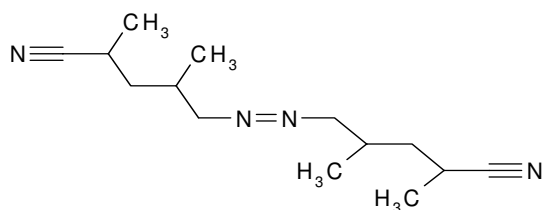


N,N'-metilén-diakrilamid    etilénglikol-dimetakrilát    divinil-benzol    trimetilolpropán-trimetakrilát

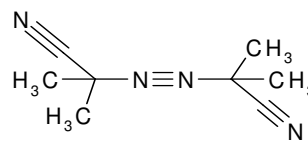
**19. ábra** A nem-kovalens lenyomatképzés során leggyakrabban alkalmazott keresztkötők

#### 3.1.2.3.4. Iniciátorok

Az iniciátorok utoljára kerülnek a polimerizációs elegybe. Az irodalomban közölt cikkek túlnyomó részében két iniciátort használnak molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek előállítására: a 2,2'-azo-bisz-(2,4-dimetil-valeronitrilt) (ABDV) és a 2,2'-azo-bisz-izobutironitrilt (AIBN) (lásd 20. ábra). Hő vagy fény hatására az iniciátorok elbomlanak, és N<sub>2</sub>-vesztés mellett két metastabil gyök keletkezik, ezek indítják be a polimerizációs folyamatot. Az oxigén elektronakceptor tulajdonságából adódóan elszívhatja az elektront a gyököktől, ami a polimerizáció leállításához vezethet, ezért az iniciátor bemérése után a polimerizációs elegyet oxigén-mentesítjük nitrogén buborékolatva át a polimerizációs elegyen. Az irodalomban közölt adatok alapján termikus polimerizáció esetén 40°C-t alkalmaznak ABDV használata esetén, míg 60°C-t AIBN esetén. A fotopolimerizációt az esetek túlnyomó többségében 15°C-on végzik. Találunk azonban olyan irodalmi adatokat is, amelyek azt igazolják, hogy a kétféle polimerizáció kombinálásával is jó eredményeket érhetünk el.



2,2'-azo-bisz-(2,4-dimetil-valeronitril) (ABDV)



2,2'-azo-bisz-izobutironitril (AIBN)

## 20. ábra A nem-kovalens eljárás során alkalmazott iniciátorok

### 3.1.2.3.5. Templátok

Az irodalmat tanulmányozva arra a következtetésre juthatunk, hogy az évek folyamán exponenciálisan nőtt azoknak a cikkeknek a száma, melyekben molekuláris lenyomatképzésről olvashatunk<sup>84-89</sup>. A technika megjelenése óta, a kutatók impozáns számú vegyületet alkalmaztak mintamolekulaként a lenyomat készítése során. A több száz mintamolekula között található gyógyszereket<sup>90-99</sup>, herbicideket<sup>100-104</sup>, aminosavakat<sup>81,105-108</sup>, peptideket<sup>109-115</sup>, hormonokat<sup>116,117</sup> és ezek származékait vagy egyéb biológiai fontossággal bíró vegyületeket. Amit általánosságban elmondhatunk ezekről a mintamolekulákról az az, hogy ezek szerves oldószerekben oldódnak, molekulatömegük kisebb, mint 1000 Da és olyan funkciós csoportokat tartalmaznak, melyek valamilyen gyenge intermolekuláris kölcsönhatás kialakítására képesek funkcionális monomerekkel.

### 3.1.3. A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek tesztelése

A polimerek tesztelését megelőzően fontos, hogy a templátot teljes mértékben eltávolítsuk a polimerből, különben a további mérések során a mintamolekulánk folyamatosan „szivárogni” fog a polimermátrixból (bleeding), ami zavarólag hathat. A polimer kromatográfiás töltésként való alkalmazása esetén a mintamolekula folyamatos szivárgása kevésbé okoz gondot, hiszen ez csak alapvonal változásban jelenik meg. Amennyiben szilárd fázisú extrakciós töltésként alkalmazzák, a „bleeding” jelentősen

befolyásolhatja a kapott eredményeket. Különösen igaz ez azokban az esetekben, amikor nyomanalízisről van szó<sup>118</sup>.

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimereket általában kromatográfias úton vagy egyensúlyi bekötődéses módszerekkel tesztelik. Kromatográfias tesztelés céljából a különböző méretű polimerszemcséket (az 5  $\mu\text{m}$  körüli vagy a 25-36  $\mu\text{m}$  szemcsetartományba tartozókat) nagynyomású pumpák segítségével HPLC oszlopba töltik, így lehetőség nyílik a polimerek gyors tesztelésére. Megvizsgálhatjuk az előállított polimerek szelektivitását a mintamolekulára és annak szerkezeti analógjaira, a különböző oldószerek és a hőmérséklet hatását a mintamolekula bekötődésére. Ennek érdekében különböző koncentrációjú mintamolekula-oldatokat (vagy a mintamolekula analógjait tartalmazó oldatokat) injektálunk az oszlopra, és nyomon követjük a retenciós idők változását az egyes paraméterek változtatása során. Lehetőség nyílik a polimerek szelektív kötőhelyeinek jellemzésére is (pl. kötőhelyek száma, affinitása stb.) a frontális kromatográfia alkalmazásával<sup>119-123</sup>. A frontális mérések során különböző koncentrációjú mintamolekulát tartalmazó oldatokat áramoltatunk keresztül a polimeroszlopon és mérjük az áttörést, azaz a kötőhelyek telítődésének idejét. Ily módon adszorpciós izotermákat nyerhetünk, amelyek a kötött mintamolekula egyensúlyi koncentrációját ábrázolják a szabad mintamolekula koncentráció függvényében. Az adszorpciós izotermák segítségével különböző modelleket alkalmazva számíthatjuk ki a szelektív kötőhelyek számát vagy az affinitási konstansokat.

Pontosabb információt kaphatunk a szelektív kötőhelyekről, amennyiben az egyensúlyi bekötődési módszert választjuk. Az egyensúlyi mérések során különböző mennyiségű mintamolekulát adunk adott mennyiségű polimerhez, majd megvárjuk, hogy beálljon az egyensúly. Az egyensúly beállta után megmérjük a mintamolekula koncentrációját az oldatban, majd ebből következtetünk a bekötődött templát mennyiségére. Amennyiben radioaktív izotóppal vagy fluoreszcensen jelölt mintamolekula áll rendelkezésünkre, úgy lehetőség nyílik a nagy kötőkapacitású szelektív kötőhelyek számának pontos meghatározására. Az egyensúlyi mérések esetén nem kell számolnunk sem a diffúziós sebességgel, sem a lassú bekötődési sebességgel,

ami különösen vonzóvá teszi ezt a módszert a kovalens úton előállított polimerek tesztelésére.

### **3.1.4. Molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek alkalmazása az analitikai kémia területén**

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek az analitikai kémia számos területén széleskörű alkalmazásra találtak: a nagyhatékonyságú elválasztástechnikákban: folyadékkromatográfiában<sup>85,124</sup>, kapilláris elektro-kromatográfiában és kapilláris elektroforézisben<sup>125-131</sup>, továbbá a szilárd fázisú extrakcióban<sup>89,94,101,132,133</sup>, az immunanalitikában és a szenzorkutatásban<sup>86,134-136</sup>. Alkalmazzák őket a kémia egyéb területein is, mint pl. a kémiai katalízisben. A továbbiakban a teljesség igénye nélkül szeretném bemutatni az analitikai területeken elért eredményeket, és bemutatni néhány érdekes alkalmazást.

#### **3.1.4.1. Molekuláris lenyomatok a nagyhatékonyságú elválasztástechnikákban**

A legelterjedtebb módszer a lenyomatot tartalmazó polimerek vizsgálatára álló fázisként való alkalmazásuk a folyadékkromatográfiában. Nagyon sok kitűnő összefoglaló cikk jelent meg a közelmúltban, melyekben részletesen olvashatunk ezekről az alkalmazásokról. Mivel könnyen és gyorsan nyerhetünk információkat, a kromatográfiás alkalmazásokat elsősorban a polimerek szelektivitásának vizsgálatára és a kötőhelyek jellemzésére használják. Így gyorsan kiszűrhetővé válnak a kevésbé „sikeres” polimerizációs eljárással készült polimerek.

Számos példát találhatunk az irodalomban racémek elválasztására<sup>77,85,137-139</sup> (aminosavak, aminosavszármazékok, peptidek, karbonsavak, aminok), amikor álló fázisként molekuláris lenyomatot tartalmazó polimereket alkalmaznak. Sok esetben a lenyomatot tartalmazó polimerekkel elért szelektivitási tényezők jobbak a kereskedelemben kapható királis oszlopokon mért értékeknél. Ezek az eredmények különösen vonzóvá teszik a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek alkalmazását

a gyógyszeriparban, mivel a hatóság recém keverékek esetén szorgalmazza a gyógyszerek enantiomerekre való szétválasztását. Ha rendelkezésünkre áll egy „optikailag” tiszta templát, úgy előállíthatunk egy olyan, királis elválasztásra alkalmas polimert, ahol előre ismert az enantiomereválasztás során az elúciós sorrend, ami a kereskedelmileg kapható királis oszlopokról nem mondható el. Meg kell említenünk ugyanakkor, hogy egy ilyen oszlopon a kis hatékonyság miatt csak limitált számú racémet tudunk elválasztani, míg a kereskedelmileg kapható oszlopok esetén ez a szám nagyobb.

A folyadékromatográfiai alkalmazásoknak határt szab, hogy a templátromatográfiai mérése esetén aszimmetrikus, erősen elnyúlt csúcsalak figyelhető meg<sup>140,141</sup>. Ez a csúcsalak több tényező együttes hatásának tulajdonítható. A csúcsciszéledés egyik oka az oszlopba töltött polimerszemcsék méretbeli különbségének tudható be, hiszen a polimer előállítása után, amikor porítjuk és szitáljuk a polimert, nem tudjuk megvalósítani a különböző méretű szemcsék teljes szétválasztását, csak mérettartományokra tudjuk szétválasztani a szemcséket. Mivel a polimer szemcsék alakja sem egységes, nem gömbszimmetrikus, ezért a kötőhelyek hozzáférhetősége is változó, így a diffúziós tulajdonságok is változnak az egyes szemcsék esetén, ami szintén csúcsciszéledést eredményez.

Szintén befolyással van a csúcsalakra a polimermátrixban keletkező szelektív kötőhelyek heterogenitása is, vannak ugyanis nagyobb és kisebb kötéseerősségű helyek. A templátot kis koncentrációban injektálva a nagyobb kötéseerősségű helyek kötik meg a molekulát. Nagyobb koncentrációjú minta felvitele esetén az „erős” kötőhelyek telítődnek, és a kötődés a kisebb kötéseerősségű kötőhelyeknek tudható be, ami a retenciós idő csökkenéséhez, valamint kiszéledett csúcsalak kialakulásához vezet. Mindez a polimer nagy kötéseerősségű kötőhelyeinek kis kapacitásával magyarázható.

Az utóbbi időben előrelépések történtek abban, hogyan lehetne a csúcsciszéledést és az alacsony kapacitás problémáját megoldani. Legtöbbször a polimerizációs módszer megváltoztatásában látják a megoldást. Olyan módszereket dolgoztak ki, melyek segítségével lehetővé válik gömb alakú szemcsék előállítása, így sokkal homogénebb alakú és méretű szemcséket nyerhetünk. Ez azonban még nem



oldja meg a kötőhelyek heterogenitásának problémáját, ami jelentősebb szerepet játszik az aszimmetrikus csúcskiszélesedésben, mint a heterogén szemcsék.

A molekuláris lenyomatok alkalmazása a kapilláris kromatográfiában és kapilláris elektroforézisben sok előnyhöz juttatta a felhasználókat. Szemben a módosított szilikagél alapú töltött oszlopoknál tapasztalt gondokkal, ahol nehézkes volt az oszlopok töltése a vékony kapilláris miatt, könnyen képződtek buborékok a rendszerben a mérések folyamán, nem voltak stabilak hosszú távon az oszlopok, itt a lenyomatot tartalmazó polimer alapú álló fázist *in situ* hozzák létre a kapillárisban filmbevonásos technikával vagy monolit eljárással. Általában ezek az eljárások lényegesen egyszerűbbek, mint megtölteni egy kapilláris oszlopot. Akárcsak a folyadékkromatográfiás technikák esetén, itt is elsősorban királis elválasztásra találunk példákat az irodalomban. A 11. táblázatban olyan anyagokat soroltam fel, melyeknek kromatográfiás elválasztására molekuláris lenyomatot tartalmazó polimert alkalmaztak.

#### 11. táblázat Molekuláris lenyomatok alkalmazása a kromatográfiában

Minta	Hiv.	Technika	Minta	Hiv.	Technika
atrazin	104,142,143	LC	sziálsav	144	LC
aminosavak	105	LC	efedrin	145	TLC
nikotin	146	LC	S-propranolol	147	CEC
naproxen	148	LC	R-propranolol	147	CEC
tesztoszteron	61	LC	pentamidine	149	CEC
timolol	150	LC	propranolol	130	CE
glükóz	151	LC	L-fenil-alanin	81	CEC

#### 3.1.4.2. Molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek alkalmazása az immunanalitikában

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimereket szokás mesterséges ellenanyagoknak is nevezni, hiszen azzal a szándékkal hozták őket létre, hogy helyettesítsék a természetes ellenanyagokat. A molekuláris lenyomatok megjelenése után nem is kellett sokat várni, hisz 1993-ban Vlatakis és munkatársai beszámoltak az

első olyan immunoassay eljárásról, ahol diazepam és teofillin lenyomatot tartalmazó polimereket alkalmaztak a fenti gyógyszerek mérésére szérumból. Az eljárást elnevezték molekuláris lenyomatot tartalmazó szorbens assay-nek (MIA, molecularly imprinted sorbent assay). Az EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) eljárással mért összehasonlító mérések eredményei jó egyezést mutattak a lenyomatot tartalmazó polimerekkel mért értékekkel. A különböző anyagokkal elvégzett keresztreakciók is teljes hasonlóságot mutattak az ellenanyagok és a lenyomatot tartalmazó polimerek esetén. Ez a cikk mérföldkőnek számított, ezt követően több olyan cikk is megjelent, ahol az ellenanyagokat lenyomatot tartalmazó polimerekkel helyettesítették. A 12. táblázatban összefoglaltam néhány olyan molekulát, melyeknek mérésére a MIA eljárást alkalmazták.

### 12. táblázat Molekuláris lenyomatok alkalmazása az immunoassay módszerekben

Minta	Mátrix	Hivatkozás
diazepam	humán szérum	152
teofillin	humán szérum	152
atrazin	víz	78
kloramfenikol	marha szérum	153
kortizol	szérum	154

Az utóbbi évek jelentős eredménye, hogy a polimerizációs eljárások finomításával és a bekötődési paraméterek optimalálásával, a kezdeti  $\mu\text{M}$ -os kimutatási határt sikerült eltolni egészen a  $\text{nM}$ -os értékig<sup>155</sup>, ami alkalmassá teszi a módszer használatát a gyógyszeriparban. Igaz ugyan, hogy ma többnyire még radioaktív jelöléssel érnek el átütő eredményeket, de megjelentek már a fluoreszcens jelölést tartalmazó, molekuláris lenyomatot alkalmazó immuneljárások is.

A lenyomatot tartalmazó polimerek bizonyos körülmények között éppen olyan szelektívek lehetnek, mint az ellenanyagok. Ráadásul a kémiai, mechanikai és hőstabilitásuk is sokkal nagyobb, mint az ellenanyagoké és szobahőmérsékleten hosszú ideig, változatlanul megőrzik szelektivitásukat. További kutatások szükségesek azonban, hogy versenyképessé válhassanak az ellenanyagok mellett, főként a biológiai

mátrixban történő alkalmazhatóságukat illetően. A legfőbb gond a templát szivárgásának a problémája, ami jelentősen zavarhatja a kimutatási határ csökkentésére irányuló törekvéseket. Amennyiben sikerül megoldani a kötőhelyek heterogenitásának problémáját, valamint növelni a nagy kötési energiájú kötőhelyek számát a polimerben a hátrányok nagy része eltűnne. A polimerizációs körülmények további optimalása (a monomer-templát komplex stabilizálása, újabb polimerizációs technikák) valamint a posztpolimerizációs kezelések (kémiai vagy fizikai) kidolgozása ígéretes törekvéseknek látszanak ezeknek a ma még meglévő problémáknak a megoldására. A 13. táblázatban a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek ellenanyagokkal szembeni előnyeit, illetve hátrányait foglaltam össze.

### **13. táblázat** A MIP-ek előnyei és hátrányai az ellenanyagokéhoz képest

---

#### ELŐNYÖK

---

Az ellenanyagokéval összemérhető affinitási konstansok

Gyors, egyszerű és olcsó előállítás

Nincs szükség immunizációra, állatkísérletekre

Nagy mechanikai, kémiai és hőstabilitás

Szobahőmérsékleten való tárolhatóság

Kis molekulákra is alkalmazható, nincs szükség konjugációra

Jól működnek szerves oldószerekben

---

#### HÁTRÁNYOK

---

Kötőhelyek heterogenitása

A templát szivárgása (bleeding)

Erőteljesebb nem specifikus kötődések

Limitált alkalmazhatóság vizes közegben

Alacsonyabb kötőkapacitás

---

### **3.1.4.3. Molekuláris lenyomatok alkalmazása a szenzorkutatásban**

Az utóbbi néhány év irodalmát tanulmányozva azt tapasztaljuk, hogy egyre nagyobb az érdeklődés a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek, mint potenciális receptorok alkalmazása iránt a szenzorkutatás terén<sup>156,157</sup>. Bár a lenyomatok szenzorként való alkalmazása még „gyerekcipőben jár” érdekes alkalmazásokkal találkozhatunk.

Amennyiben a mintamolekulánk optikai úton detektálható, úgy a lenyomatot tartalmazó polimert használhatjuk egyszerű adszorbensként a mintamolekula dúsítására, majd ezt követően valamilyen detektálási módszert alkalmazva mérjük az optikai jelét. Mosbach és kutatócsoportja<sup>158</sup> száloptikás szenzort alkalmazott az L-danzil-fenil-alanin sztereoszelektív meghatározására. A szenzor válaszideje azonban meghaladta a 4 órát, ami meglehetősen lassúvá tette a meghatározást. Az előbb említett kutatócsoport egy, a morfin meghatározására alkalmas szenzort is kifejlesztett, mely a 0,1-1 µg/ml tartományban stabilan működött. Akárcsak az előző esetben, a válaszidő itt is meglehetősen hosszúnak bizonyult. Egy másik kutatócsoport áramló oldatos körülmények között, fluoreszcens detektálást alkalmazva PAH-ok<sup>159</sup> mérésére fejlesztett ki szenzort, mely jól működött a ng/l tartományban.

Ha a mintamolekula nem alkalmas mérhető analitikai jel kibocsátására, valamilyen jeladó ágenst építenek be a polimermátrixba. Ezekben az esetekben, ha megtörténik a mintamolekula szelektív kötődése, az rendszerint valamilyen mérhető, fizikai-kémiai változással jár: pl. az emissziós hullámhossz változása, a fluoreszcencia kioltása vagy az abszorpciós hullámhossz eltolódása.

A Szomán ideggáz hidrolízistermékének lenyomatképzésével a Szarin és Szomán nevű ideggázok detektálására alkalmas, lumineszcens mérési elven alapuló szenzort fejlesztett ki Jenkins és kutatócsoportja<sup>74</sup>. Ez volt az első olyan szenzor, melynek hordozható formáját is megalkották. A szenzor válaszideje alig 8 perc volt. Szintén gyakorlati alkalmazást célzott meg Arnold és kutatócsoportja a molekuláris lenyomatot tartalmazó glükóz szenzor előállításával. Érdekes ötletnek bizonyulhat továbbá a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek és a kvarckristály

mikromérleg<sup>160</sup>, valamint a felületi plazmon rezonancia<sup>161</sup> módszerek kombinációja. A közelmúltban mindkét módszer alkalmazására jelentek meg cikkek.

#### **3.1.4.4. Molekuláris lenyomatok alkalmazása a szilárd fázisú extrakcióban**

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek talán egyik legígéretesebb alkalmazási területe szilárd fázisú extrakcióban való alkalmazásuk. A polimerszemcséket porításuk és a megfelelő mérettartományra való szétválasztásuk után üres, a szilárd fázisú extrakciónál használatos oszlopokba (50-200 mg) vagy az on-line technikák esetén kis, pár cm-es HPLC előtétszlopba töltik. A molekuláris lenyomatot tartalmazó szilárd fázisú extrakciós technika során (MISPE, molecularly imprinted solid phase extraction) ugyanazokat a lépéseket alkalmazzuk, mint egy közönséges szilárd fázisú extrakciós töltet esetén: kondicionálás, mintafelvétel, szelektív mosás és végül a minta eluálása az oszlopról. A *mintafelvétel* során olyan oldószert kell alkalmaznunk, amely stabilizálja a polimerben levő szelektív kötőhelyek és a mintamolekula között kialakuló kölcsönhatásokat (rendszerint hidrogénhidás kötések). A *szelektív mosás* esetén is ugyanez érvényes az oldószere, de azt a szempontot is figyelembe kell venni, hogy az oldószerek el kell távolítania a nem specifikusan kötött szennyezőket a polimermátrixból. A mintamolekula *elúciója* során olyan oldószert használnak (rendszerint poláros oldószerek), amelyik alkalmas a templát és a kötőhelyek közötti szelektív kötés felszakítására, azaz a mintamolekula elúciójára.

Molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer alkalmazását a szilárd fázisú extrakcióban elsőként Sellergren valósította meg 1994-ben, amikor pentamidin lenyomatot tartalmazó polimer segítségével vizeletminták pentamidinkoncentrációját határozta meg. Ezt követően számos molekuláris lenyomatot tartalmazó polimert alkalmaztak szilárd fázisú extrakciós töltetként különböző mátrixokban (lásd 14. táblázat) különféle vegyületek meghatározására. A módszereket három csoportba oszthatjuk: *on-line*, *off-line* és *impulzusszerű elúciót* (PE, pulsed elution) alkalmazó

MISPE eljárások. A 14. táblázatban néhány molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer szilárd fázisú extrakciós alkalmazását foglaltam össze.

**14. táblázat** Példák MISPE eljárásokra

Minta	Mátrix	Eljárás	Hivatkozás
pentamidin	humán vizelet	off-line	162
7-hidroxi-kumarin	vizelet	off-line	163
klenbuterol	vizelet	off-line	118
atrazin	marha máj	off-line	164
propranolol	patkányepe, kutyaplazma	off-line	165
szameridin	humán plazma	off-line	166
nikotin	rágógumi	off-line	167
tamoxifen	humán vizelet és plazma	off-line	92
terbutilazin	vízminták	off-line	168
triazin	víz, vizelet és almaextraktum	on-line	168
4-nitro-fenol	víz minta	on-line	169-171
nikotin	szivar	PE	172
teofillin	szérum	PE	173

Mivel az *off-line MISPE* eljárás teljesen megegyezik a hagyományos SPE eljárással itt. is mintafelvitelről, szelektív mosási lépésről és elúcióról beszélhetünk, majd a mintamolekula kromatográfiás detektálása következik. A megfelelő oldószerek kiválasztása kulcsfontosságú szerepet játszik egy MISPE mérési protokoll kifejlesztése során. Több irodalmi hivatkozást is találunk, melyek szerint a lenyomatot tartalmazó polimerek felismerési tulajdonsága abban az oldószerben lesz a legjobb, amelyben a polimerizáció végbement, illetve ha a polimerizációs oldószernél polárosabb oldószert használunk<sup>168,174</sup>, az a mintamolekula retenciójának csökkenéséhez vezethet. Ugyanakkor leírtak olyan MIP-eket is, amelyekre a fenti állítások nem igazak. Talán minden MISPE protokoll sikere abban rejlik, hogy a saját mintamolekulánk esetén megtaláljuk azt az oldószert, ami a legideálisabb a polimer működésére. Szintén irodalmi adatok támasztják alá a tényt, hogy az oldószer víztartalma is jelentős

befolyással van a mintamolekulánk visszatartására a lenyomatot tartalmazó polimeren<sup>155,175</sup>. Amennyiben a szelektív mosási lépés során az oldószer víztartalma eléri a néhány százalékot, jelentősen csökken a mintamolekula retenciója, így előfordulhat, hogy nem csak a nem specifikusan kötött szennyező komponenseket mossuk le az oszlopról, hanem a mintamolekulánkat is. Szintén fontos, hogy az elúció során a felvitt mintát teljes mértékben eluáljuk az oszlopról, ugyanis az esetlegesen a pórusokban maradt mintakomponensek meghamisítják a méréseket. A technika alkalmazásával, mint ahogyan a 14. táblázatból láthatjuk, komplex biológiai mintákban (plazma, vizelet, máj extraktum, epe) tudták mérni a kívánt komponenst.

*On-line* eljárások során a polimert kis méretű, HPLC méréseknél használatos előtétoszlopba töltik. Az oszlopot általában az injektorhurokba kötik be, és a polimert a minta dúsítására használják, majd a mozgó fázis összetételének megváltoztatásával eluálják a mintamolekulát a lenyomatot tartalmazó oszlopról. A technikát először Bjarnason alkalmazta vízminták triazintartalmának meghatározására<sup>100</sup>. Érdekes módon a technika megjelenése óta, szinte kizárólagosan csak gyomirtók (ametrin, atrazin, 4-nitro-fenol) lenyomatát tartalmazó polimerek szilárd fázisú extrakciós vizsgálatára használták, többnyire vízmintákban (folyóvíz, csapvíz).

Az *on-line* MISPE eljárások közé sorolhatjuk az *impulzusszerű elúciós* technikát, melyet Mullett és munkatársai<sup>91</sup> alkalmaztak először teofillin meghatározására szérumból. Egy teofillin lenyomatot tartalmazó polimer oszlopra, mely *on-line* módon volt kötve a detektorhoz 20 µl kloroformmal hígított teofillintartalmú szérumot injektáltak. Kloroformot használva mozgó fázisként a teofillin teljes egészében megkötődött az oszlopon, míg a többi szennyező komponens eluálódott az oszlopról (kb. 2 perc). Ezt követően 20 µl metanolt injektáltak az oszlopra, mely elősegítette a teofillin elúcióját a lenyomatot tartalmazó oszlopról, így lehetővé vált detektálása. A technikát nikotin és 4-amino-piridin mérésére is alkalmazták, mindkét esetben 20 µl mintából mértek és a kromatográfiás idő 6 perc körül alakult.

Ahogy azt az előző alkalmazásoknál is láttuk, a legfőbb kihívás itt is az, hogy a polimer előállítás után a templát molekulát teljesen extrahálják a polimermátrixból,

hiszen így tudunk csak megbízhatóan nyomelem-analízist végezni. Sok megoldás született a mintamolekula „folyamatos szivárgásának” kiküszöbölésére. Ezek közül a legígéretesebb talán az Andersson által javasolt megoldás, ami templátként a mintamolekula egyik analógját használta. Ezáltal a templát szivárgása nem okozott pozitív hibát a mintamolekula mérése során, hiszen kromatográfiás módon sikerült elkülönítenie a két anyagot egymástól. Természetesen az optimális mintamolekula analóg megtalálása, akár csak a polimerizációs körülmények optimálása, minden esetben külön kihívást jelent a vegyész számára.



### **3.2. MOLEKULÁRIS LENYOMATOT TARTALMAZÓ POLIMEREK ALKALMAZÁSA FENITOIDIN MEGHATÁROZÁSÁRA HUMÁN PLAZMÁBÓL**

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek analitikai vizsgálata új kutatási tématerülete csoportunknak. Egy 1998 őszen indult Európai Unió projekt kapcsán, melyben 7 ország 8 kutatócsoportja vett részt, kerültünk közelebbi kapcsolatba ezzel a tématerülettel. A projekt a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek (molecularly imprinted polymers, MIP) analitikai kémiai alkalmazhatóságának feltárására irányult. A projekten belül, csoportunk feladata az előállított polimerek analitikai mintaelőkészítésben való alkalmazhatóságának vizsgálata volt.

Csoportunk főként gyógyszermolekulák, fenitoidin, nifedipin, tramadol és egy növényvédőszer, a terbutilazin molekuláris lenyomatát tartalmazó polimereket vizsgált. Az én feladatom fenitoidin lenyomatot tartalmazó polimer előállítása, és ennek valamint a tramadol molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer alkalmazhatóságának vizsgálata volt a mintaelőkészítésben. Doktori dolgozatomban a fenitoidin molekuláris lenyomatot tartalmazó polimer előállítását és a vele való méréseket, és az elért eredményeket ismertetem.

### **3.3. KÍSÉRLETI RÉSZ**

#### **3.3.1. Alkalmazott mérőműszerek és eszközök**

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek előállításához 14 mm-es átmérőjű üvegcsöveket használtam, melyeket hőkezelés útján zártam le. A kis mennyiségű polimerek (mini-MIP) előállításához 1,5 ml-es üvegcséket használtam, melyeket szilikon/teflon szeptummal (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) zártam le. A polimerek előállítása során a fotopolimerizációhoz nagynyomású higanygőz lámpát (Philips, HPL 125 W) alkalmaztam, amely egy 15°C-ra beállított vízfürdőbe került, míg a termikus polimerizáció során 60°C-ra beállított vízfürdőt alkalmaztam. Az így nyert polimert kalapács segítségével összetörtem, majd mozsárban porítottam. A lenyomat (templát) molekula kivonását a polimerből Soxhlet extrakcióval végeztem,

THF/ecetsav=95:5 arányú elegyével. A polimerek szitálását a megfelelő mérettartomány elérése céljából 25 illetve 36  $\mu\text{m}$ -es Merck (Merck, Darmstadt, Németország) szitákkal végeztem vizes közegben. A polimerek kromatográfiás töltésként való tesztelése céljából a 25-36  $\mu\text{m}$  frakciójú polimereket 125x4 mm-es HPLC oszlopokba töltöttem nagynyomású pumpa segítségével 300 bar nyomáson MeOH/víz=80:20 arányú elegye segítségével, oszloponként kb. 0,6 g-ot.

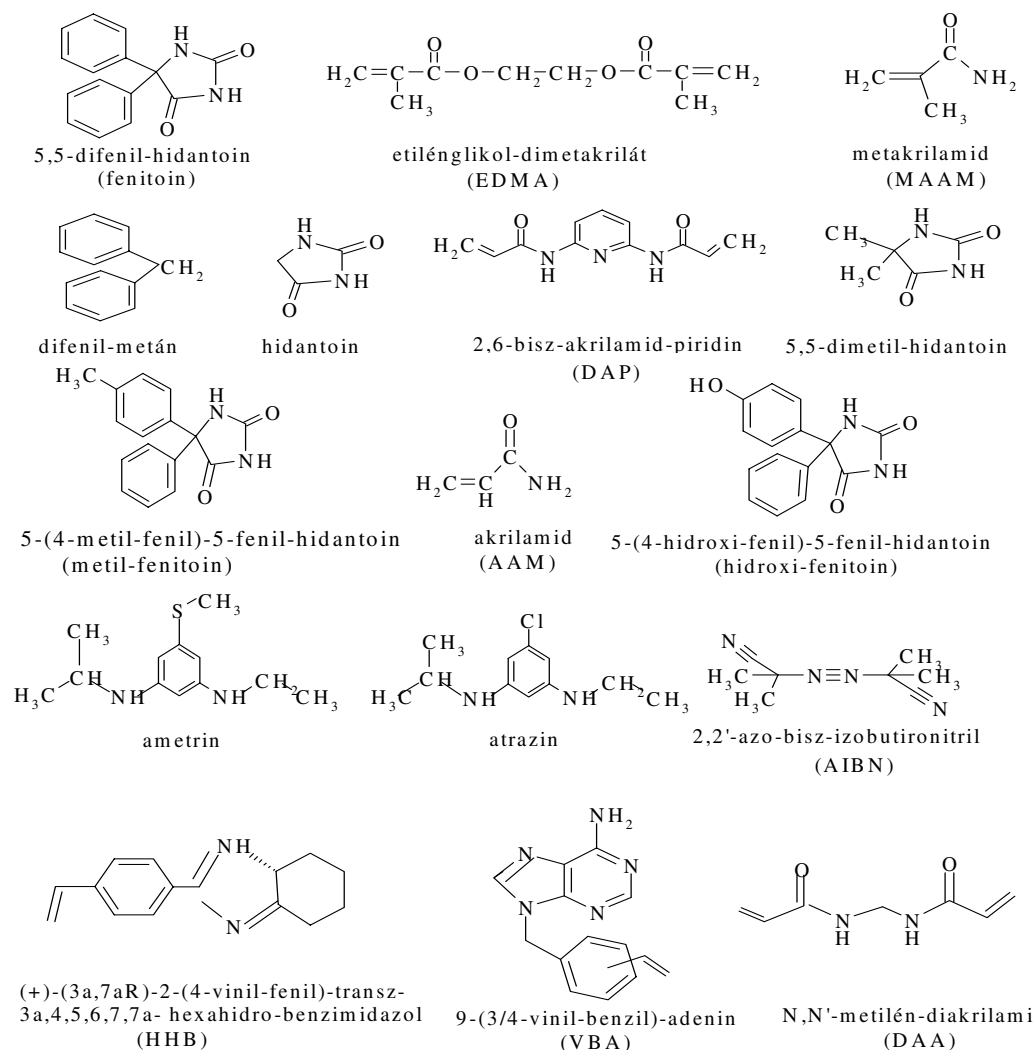
A mintaelőkészítés során a polimereket üres 2 ml-es, szilárd fázisú extrakciónál alkalmazott polipropiléncsővekbe töltöttem. A csövek aljára 2  $\mu\text{m}$ -es szűrő került, majd mindegyik csőbe 50 mg polimert (vagy fenitoin lenyomatot tartalmazó vagy kontroll polimert) mértem be analitikai mérlegen a 25-36  $\mu\text{m}$  frakcióból. Ezt követően lemostam az esetlegesen a cső falán maradt polimer szemcséket, majd a polimerek tetejére is 2  $\mu\text{m}$ -es szűrő került. A mintaelőkészítés során a szilárd fázisú extrakcióra vákuum kádat alkalmaztam (Macherey-Nagel GmbH Co, Düren, Németország). Az oldószerek bepárlását TurboVap LV (Zymark Corporation, Hopkinton, USA) bepárlóval végeztem nitrogén áramban.

A fenitoin templát kromatográfiás meghatározására ODS Hypersil (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) analitikai oszlopot (200 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) és ODS Hypersil (Bio Separation Technologies Ltd., Budapest, Magyarország) előtétoszlopot (20 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) alkalmaztam. A mozgó fázis metanol/acetonitril/foszfát puffer (0,01M, pH=4,8) 30/30/40 (v/v/v) elegye volt, melyet Kontron Model 420 típusú HPLC (Kontron, Svájc) pumpa segítségével áramoltattam keresztül a rendszeren 1 ml/perc áramlási sebességgel. A mintabevitelre Rheodyne (Rheodyne, Cotati, CA, USA) hatutas injektort használtam 20  $\mu\text{l}$  huroktérfogattal. A fenitoin detektálását Jasco FP-970-es (Jasco International, Tokyo, Japán) változtatható hullámhosszú UV-VIS detektorral végeztem 240 nm-en. Az adatgyűjtést a Borwin 1.21 kromatográfiás szoftver irányításával (JMBS Developpements, Le Fontanil, Franciaország) egy 486-os IBM AT számítógép végezte.

### 3.3.2. Felhasznált anyagok és vegyszerek

A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek készítéséhez használt fenitoint (5,5-difenil-hidantoin), etilén-glikol-dimetakrilátot (EDMA), metakrilamidot (MAAM), akrilamidot (AAM), N,N'-metilén-diakrilamidot (DAA) a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) cégtől vásároltuk (21. ábra). További három monomert a Johannes Gutenberg Egyetem (Mainz) Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén szintetizáltak: 9-(3/4-vinilbenzil)-adenin (VBA), 2,6-bisz-(akrilamid)-piridin (DAP) és (+)-(3a,7aR)-2-(4-vinil-fenil)-transz-3a,4,5,6,7,7a-hexa-hidro-bezimidazol (HHB). Az iniciátort, 2,2-azobisz-izobutironitrilt a Janssen cégtől szereztük be. A kromatográfiás tesztelés során használt difenil-metánt, hidantoint, 5,5-dimetil-hidantoint, 5-(4-metil-fenil)-5-fenil-hidantoint és a 5-(4-hidroxi-fenil)-5-fenil-hidantoint szintén a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. Az ametrin és atrazin a Novartis (Bázel, Svájc) ajándéka volt. A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerekkel való mérés folyamán felhasznált oldószerek (dimetil-formamid, acetonitril, tetrahidrofurán, metanol, diklór-metán, nitrometán, aceton, kloroform, toluol, hexán) HPLC tisztaságúak voltak (Merck, Romil, Carlo Erba). A mérés során felhasznált ecetsav (Fluka, St. Louis, USA) analitikai tisztaságú volt. A foszfátpufferek készítésére használt  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  és  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  analitikai tisztaságú volt, és a Reanal (Reanal, Budapest, Magyarország) cégtől vásároltuk.

A miniMIP eljárás során nem került sor az oldószerek további tisztítására. A molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek nagyobb mennyiségben való előállítására előtt az oldószereket desztillációnak vetettük alá.



**21. ábra** A fenitoin lenyomatkészítés és tesztelés során használt anyagok szerkezeti képletei

### 3.3.3. Kalibrációs és minőségellenőrző minták készítése

A kalibrációs minták készítésekor 1,6 mg/ml-es fenitoin törzsoldatot készítettem metanolban. Ebből az oldatból metanolos hígítással készítettem el azokat a kalibrációs oldatokat, amiket a plazmaminták elkészítésére használtam: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 és 0,8 mg/ml fenitoinoldatokat. A kalibrációs plazmaminták készítésére 3,9 ml plazmához 100 µl-t mértem a kalibrációs fenitoinoldatokból, így nyertük a 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 és 40,0 µg/ml kalibrációs plazmastandardokat. A kalibrációs plazmastandardokat 1 ml-es

Eppendorf-csövekbe mértem, mindegyik csőbe 250  $\mu\text{l}$ -t, majd ezt követően  $-20^\circ\text{C}$ -ra fagyasztottam a mintákat. A minőségellenőrző minták készítése során először négy különböző koncentrációjú fenitoinoldatot készítettem. Analitikai mérlegen 1,25; 3,75; 12,5 és 15 mg fenitoint mértem be, majd a bemért mennyiségeket 5 ml metanolban oldottam. Az így keletkezett fenitoinoldatokat (0,25; 0,75; 2,5 és 3,0  $\mu\text{g/ml}$ ) használtam a minőségellenőrző plazmaminták készítésére. A készítés során 8,91 ml plazmához 90  $\mu\text{l}$ -t mértem a fenti oldatokból, így nyertük a 2,5; 7,5; 25 és 30  $\mu\text{g/ml}$ -es minőségellenőrző plazmamintákat. Ezeket is kimértem 1 ml-es Eppendorf-csövekbe, mindegyik csőbe 750  $\mu\text{l}$ -t, majd  $-20^\circ\text{C}$ -ra fagyasztottam a mintákat. A belső standard törzsoldat készítésére 10 mg 5-(4-metil-fenil)-5-fenil-hidantoint mértem be analitikai mérlegen és beoldottam 100 ml metanolban. Ebből az oldatból 20  $\mu\text{l}$ -t használtam a plazmaminták készítésére.

### **3.3.4. A lenyomatképzés során alkalmazott eljárások**

#### **3.3.4.1. A mini-MIP szintézis**

A templát (fenitoin) és a funkcionális monomer bemérése után, az oldószer (oldószerkegely) hozzáadása következett, majd ezt követően a keresztkötőt pipettáztam az elegyhez. Amennyiben a polimerizációs elegy nem oldódott fel, az oldószer összetételének további optimálása következett - rendszerint tetrahidrofurán hozzáadásával - mígnem áttetsző oldatot kaptam. Ezután következett az iniciátor hozzámérése a polimerizációs elegyhez, majd egy szilikongumi szeptum segítségével lezártam az edényt. Mivel az oxigén jelenléte gátolja a polimerizáció végbemenetelét, a polimerizáció elindítása előtt 5 percen át egy injekciós tű segítségével, a szeptumon keresztül nitrogént buborékolattam a polimerizációs elegybe, miközben jégen hűtöttem az edényt, hogy megakadályozzam a polimerizáció idő előtti beindulását. Ezt követően az előkészített polimerizációs elegyet fotopolimerizációnak vettem alá.

A polimerizáció során az üvegedényeket kb. 10 cm távolságra, körkörösén egy UV-lámpa köré helyeztem (nagynyomású higanygőz-lámpa), amely egy  $15^\circ\text{C}$ -ra termosztált vízfürdőbe merült. A polimerizáció első 30 perce során az üvegcső-

reaktorokat többször is megforgattam, hogy minden oldalról egyformán érje őket az UV-fény. A polimerizációs elegyek megszilárdulása általában a huszadik és a harmincadik perc között következett be.

**15. táblázat** A mini-MIP készítés során használt anyagok és oldószer

	Templát ( $\mu\text{mol}$ )	Monomer ( $\mu\text{mol}$ )	Keresztkötő (EDMA, $\mu\text{mol}$ )	Oldószer ( $\mu\text{l}$ )
AAM akrilamid	12,5	50	250	58 $\mu\text{l}$ MeCN 12 $\mu\text{l}$ THF
MAAM metakrilamid	12,5	50	250	52 $\mu\text{l}$ MeCN 18 $\mu\text{l}$ THF
DAA N,N'-metilén-diakrilamid	12,5	50	250	40 $\mu\text{l}$ MeCN 70 $\mu\text{l}$ DMF
DAP 2,6-bisz-(akrilamid)-piridin	12,5	50	250	30 $\mu\text{l}$ MeCN 48 $\mu\text{l}$ THF
VBA 9-(3/4-vinil-benzil)-adenin	3,12	12,5	62,5	26,6 $\mu\text{l}$ toluol 53,3 $\mu\text{l}$ DMF
HHB (+)-(3a,7aR)-2-(4-vinil- fenil)-transz-3a,4,5,6,7,7a hexahidro-benzimidazol	6,25	36	250	28 $\mu\text{l}$ MeCN 15 $\mu\text{l}$ THF 18 $\mu\text{l}$ DMF

A mini-MIP szintézis során a reagensek arányát (15. táblázat) egy korábbi irodalmi hivatkozás alapján választottuk, mely szerint a templát : funkcionális monomer : keresztkötő aránya 12,5  $\mu\text{mol}$  : 50  $\mu\text{mol}$  : 250  $\mu\text{mol}$  volt<sup>176</sup>. A nagyobb mennyiségű funkcionális monomer és keresztkötő jelenléte a monomer-templát komplex stabilitását biztosítja a polimerizáció előtt és közben. Ezek a mennyiségek, egy szintézis során általában használatos reagensmennyiség 80-ad részét képezik. A mini-MIP eljárás során a polimerizációs elegy mennyisége lehetőség szerint nem haladhatta meg a 120  $\mu\text{l}$ -t, ugyanis az előállított polimernek vékony, pár milliméter vastagságú

rétegnek kellett lennie ahhoz, hogy hatékonyan tudjuk tesztelni a későbbiekben. Mivel a bemért keresztkötő etilén-glikol-dimetakrilát (EDMA) mennyisége 47,5  $\mu\text{l}$  volt (250  $\mu\text{mol}$ ), ezért próbáltam maximum 75  $\mu\text{l}$  oldószert használni a polimerizációs reagensek feloldására. A bemért iniciátor (AIBN) mennyisége mindig 1 mg volt. A polimerizációt 20 órán keresztül végeztem. Mindegyik esetben kontroll polimer is készült, ami abban különbözött a MIP-től, hogy a polimerizációs elegy nem tartalmazott fenitoint.

### **3.3.4.2. Mini-MIP tesztelés**

Az előállított mini polimerek vizsgálata két tesztelési lépcsőn alapszik. Az első lépés során a templátmolekula polimerből való visszanyerését vizsgáljuk, a polimerizáció során használt oldószerben, míg a második lépés során a templát MIP-hez való bekötődését követjük nyomon a kontroll polimerhez viszonyítva, szintén a polimerizációs oldószerben.

A *visszanyerés tesztelése* során a polimereket tartalmazó üvegedényekbe 1-1 ml-t mértem be abból az oldószerkeletből, amiben a polimerizációs reakció végbement. Ezt követően 1 óra ultrahangozás következett majd megmértem, hogy mennyi fenitoin oldódott ki a polimerekből. A mérés során 10  $\mu\text{l}$ -t injektáltam az oldószerkeletből a kromatográfiás rendszerbe, és mértem a kioldódott fenitoin mennyiségét. A kromatográfiás mérések során Phenomenex Luna C18 (5 $\mu\text{m}$ ) 150 x 40 mm oszlopot; acetonitril/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 M pH=2,8 60/40 eluent és UV-detektálást (230 nm) használtam. Ezt követően egy éjszakán át, hagytam tovább ázni a polimereket az oldószerkeletben, majd ismét megmértem a kioldódott fenitoin mennyiségét. Az első tesztelési lépcső eredményeként azokat a polimereket tekintjük megfelelőnek, ahol a templát visszanyerése a polimerből rossz (a visszanyerési határfok jóval alacsonyabb, mint 100%). A második tesztelési lépésre a templát teljes kinyerése után kerülhet sor. Ennek érdekében többszörös mosási lépéseket alkalmaztam. Friss oldószert (vagy oldószerkeletet) (950  $\mu\text{l}$ ) és a hidrogénhidás kötések felszakadását elősegítő, ecetsavat (50  $\mu\text{l}$ ) mértem mindegyik polimerhez, majd 1 óra ultrahangozás következett. Éjszakára állni hagytam a polimereket szobahőmérsékleten az oldószerben, majd reggel lemértem

az oldószer templáttartalmát. Ezt négyszer ismételt meg egymás után, addig, míg már nem oldódott ki több fenitoin. Ezt követően egy éjszakán át oldószermentesen 30°C-on tartottam a polimereket. Majd ismételt az oldószeres és ecetsavas mosás és 1 óra ultrahangozás következett. Ezt követően ismét lemértem az oldószeres fenitointartalmát, és azt tapasztaltam, hogy több fenitoin már nem oldódott ki a polimerekből. Az ecetsav teljes eltávolítására 2x1 ml oldószerkeletet mértem be mindegyik polimerhez, és 15 perces ultrahangozást alkalmaztam. A kontroll polimereket is alávetettük az összes mosási és ultrahangozási lépésnek ugyanúgy, mint lenyomatot tartalmazó párjaikat.

A második lépésben, az első tesztelés során "megfelelt" polimerek kötőképességét vizsgáljuk a kontroll polimerekhez viszonyítva. A fenitoin *bekötődésének vizsgálatára* mindegyik polimerhez, a kontroll polimereket is beleértve 1-1 ml 0,5 mM fenitoin oldatot pipettáztam. Ezután 1 óra ultrahangozás következett, majd 20 órán keresztül szobahőmérsékleten hagytam, hogy a fenitoin bekötődjön a polimerekhez. Ezt követően megmértem az oldat fenitointartalmát, amiből következtetni tudtam a kötődött fenitoin mennyiségére. Azokat a polimereket ajánlatos később nagyobb mennyiségben előállítani, ahol a legnagyobb különbséget mérjük a MIP és kontroll polimer templát kötőképességében.

### **3.3.5. Fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek preparatív méretben való előállítása**

A szintézis során használt EDMA-t és THF-t frissen desztilláltuk a polimerizáció elindítása előtt, míg az acetonitrilt molekulaszita segítségével tettük vízmentessé. Akárcsak a mini-MIP szintézis esetén, az iniciátort (AIBN, 100 mg) a polimerizációs elegy feloldódása után adtam a rendszerhez.

A nitrogén beáramoltatása után a polimerizációs elegybe (10 perc) a csövet légmentesen lezártam. Eközben jégen hűtöttem a polimerizációs keveréket. A polimerizáció ugyanolyan körülmények között ment végbe, mint a mini-MIP szintézis során, a polimerizáció időtartama szintén 20 óra volt. A polimerek megszilárdulása a polimerizáció első 30 percében ment végbe. A 20. óra eltelte után az üvegcsöveket



összetörtem, majd kivettem belőlük a polimert. Az előállított polimerek, rigid szerkezetű fehér polimertömbök voltak. Két funkcionális monomert alkalmazva termikus (60°C) és fotopolimerizáció (hu, 15°C) útján is állítottam elő polimereket. Mindegyik esetben kontroll polimer is készült, amikor is a polimerizáció a templát jelenléte nélkül ment végbe, így összesen nyolc polimert állítottam elő. A preparatív szintézis során felhasznált anyagok mennyiségét a 16. táblázatban foglaltam össze.

**16. táblázat** A fenitoin lenyomatot tartalmazó polimer összetevőinek táblázata

Fenitoin	Monomer	Acetonitril	Tetrahydrofuran	EDMA	AIBN
MAAM					
504,5 mg (2 mmol)	680,8 mg (8 mmol)	8,32 ml	2,88 ml	7,6 ml (40 mmol)	100 mg
AAM					
504,5 mg (2 mmol)	568 mg (8 mmol)	9,28 ml	1,92 ml	7,6 ml (40 mmol)	100 mg

### 3.4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

#### 3.4.1. Fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek szintézise

##### 3.4.1.1. Előzetes megfontolások

Mivel a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek szintézise több komponens egyidejű, bonyolult kölcsönhatásán alapszik a sikeres molekuláris lenyomatképzési eljárás inkább a kémiai intuíción alapszik, mintsem pusztán a racionális megfontolásokon. Egy szintézis felépítése során kiindulópontként maga a lenyomat (templát) molekula szolgál, pontosabban a *molekula fizika- kémiai sajátosságai*. Ismeretes volt számunkra, hogy a fenitoin meglehetősen rosszul oldódik alacsony polaritású, hidrogénhidás kölcsönhatás létrehozására nem alkalmas oldószerekben, mint pl. kloroform, diklór-metán, toluol, acetonitril. Az ezekben az oldószerekben való oldhatóság azért volt számunkra különösen fontos, mert ezek a leginkább használatos oldószerek a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek szintézise során. Éppen ezért különösen nehéz feladat volt a polimerizációs oldószer kiválasztása, hiszen olyan oldószert kellett találnunk, amelyben a fenitoin és a polimerizációhoz szükséges összes többi anyag is jól oldódik.

A fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek szintézisére a fenitoin gyengén savas jellegénél fogva ( $pK=8,2$ ), feltehetően inkább a bázikus monomerek alkalmasak, amelyekkel egyszeres, vagy többszörös hidrogénhidás kölcsönhatás alakulhat ki. A fenitoin hidantoin gyűrűjében található két aminocsoporton keresztül terveztük létrehozni a templát-monomer kapcsolódást. Egy polimerizációs előkísérletben a szintéziseket végző kutatócsoport jó néhány, a nem kovalens szintézisek során gyakran használt funkcionális monomer alkalmasságát vizsgálta a fenitoin MIP előállítására. Az előkísérlet során előállított fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek kötőképességét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a polimerek nem mutatták a várt felismerést a fenitoinra. Egyedül az akrilamid funkcionális monomerrel előállított polimerek esetén észleltünk csekély szelektivitást a fenitoinra, azonban ez túl kevésnek bizonyult ahhoz, hogy a polimert a későbbiekben a mintaelőkészítésben alkalmazhassuk. Ezért a

polimerizációs körülmények további optimalizálására volt szükség ahhoz, hogy a megfelelő szelektivitású polimert nyerjük.

### **3.4.1.2. Polimerizációs előkísérletek a mini-MIP eljárással**

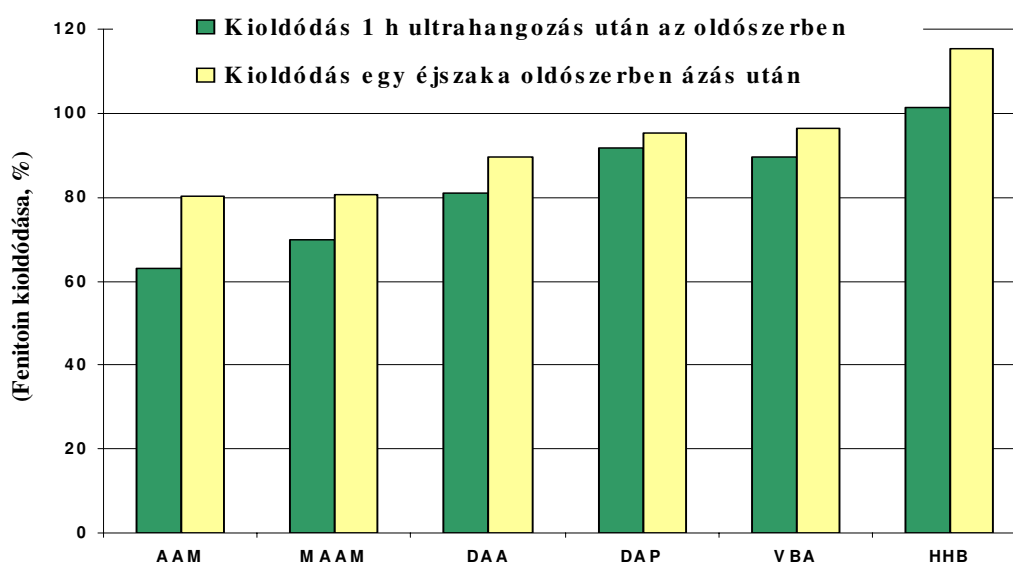
Ahhoz, hogy megfelelő felismerési tulajdonsággal rendelkező MIP-et állítsunk elő, több, a szintézisben kulcsfontosságú paramétert kell optimalnunk. Ilyenek például a funkcionális monomer típusa és koncentrációja, a keresztkötő, az oldószer, az iniciátor, a polimerizációs reakció hőmérséklete és nyomása. Ezért gyakorlati szempontból különösen hasznos az olyan technika alkalmazása, amely gyors szintézist tesz lehetővé, és párhuzamosan több, különböző módon előállított polimer vizsgálata lehetséges. Ez úgy valósítható meg, hogy jelentősen csökkentjük a szintézis során előállított polimer mennyiségét, azaz miniaturizáljuk a szintézist, ami által lehetőség nyílik a polimerek in situ tesztelésére és a megfelelő szelektivitású polimerek gyors kiválasztására. Ezt a technikát mini-polimerizációs (mini-MIP) eljárásnak nevezik<sup>177</sup>. A fenitoin molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek előállítására és gyors tesztelésére mi is a mini-MIP technikát alkalmaztuk, hogy kiválaszthassuk a szintézis optimális paramétereit.

Hat különböző funkcionális monomer alkalmazását vizsgáltam a fenitoin lenyomatot tartalmazó polimerek előállítására a mini-MIP eljárás során. Az előzetes tesztelés adataiból, valamint egy irodalomban megjelent közlemény alapján<sup>178</sup> tudtuk, hogy az akrilamid funkcionális monomerrel előállított fenitoinpolimerek, bár csekély mértékben, de szelektivitást mutattak a fenitoinra, így az *akrilamid* (AAM) funkcionális monomert ismét teszteltük, de ezúttal csökkentettük a polimerizációs oldószer polaritását. A *metakrilamidot* (MAAM) és az *N,N'-metilén-diakrilamidot* (DAA), melyek ugyancsak hidrogénhidás kölcsönhatás kialakítására alkalmas monomerek, szintén beiktattuk a tesztelni kívánt funkcionális monomerek csoportjába. Ezekon kívül még három új funkcionális monomert vizsgáltunk. Ezek a *2,6-bisz(akrilamid)-piridin* (DAP), melyet sikerrel alkalmaztak barbiturátok molekuláris lenyomatképzésére<sup>179</sup>, a *9-(3/4-vinil-benzil)-adenin* (VBA) és a *(+)-(3a,7aR)-2-(4-vinilfenil)-transz-3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-bezimidazol* (HHB). A VBA funkcionális monomerként való alkalmazására azért került sor, mert az irodalomban találtunk hivatkozást arra, hogy a 9-etil-adenin a

fenitoinnal 2:1 arányú komplexben kristályosodik<sup>180</sup>. A HHB új monomer, melyet még nem alkalmaztak molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek előállítására.

A polimerizációs reagensek oldatbavitele az általában használt polimerizációs oldószerekben különösen nehéz feladatnak bizonyult a komponensek kis oldhatósága miatt. Mivel a bemért fenitoin, funkcionális monomer és keresztkötő mennyiségek nem oldódtak fel sem diklór-metánban, sem toluolban, sem kloroformban vagy acetonitrilben, ezért bizonyos mennyiségű polárosabb oldószer hozzáadására is szükség volt az oldatbavitelhez, mint pl. tetrahidrofurán vagy dimetil-formamid (DMF). A dimetil-formamidot csak abban az esetben használtam, ha tetrahidrofuránnal nem értem el a kívánt eredményt. Az oldószerkelet végső összetételét mindig úgy választottam meg, hogy a lehető legkevesebb, hidrogén hidas kölcsönhatásra képes oldószer legyen az elegyben. Ezen oldószerek túl nagy mennyiségben való alkalmazása ugyanis ahhoz vezet, hogy a templát és a funkcionális monomer nem egymással, hanem az oldószerrel alakítja ki a hidrogénhidas kölcsönhatást. A különböző funkcionális monomereket tartalmazó polimerizációs elegyek esetén alkalmazott oldószer összetételeket a 15. táblázat szemlélteti.

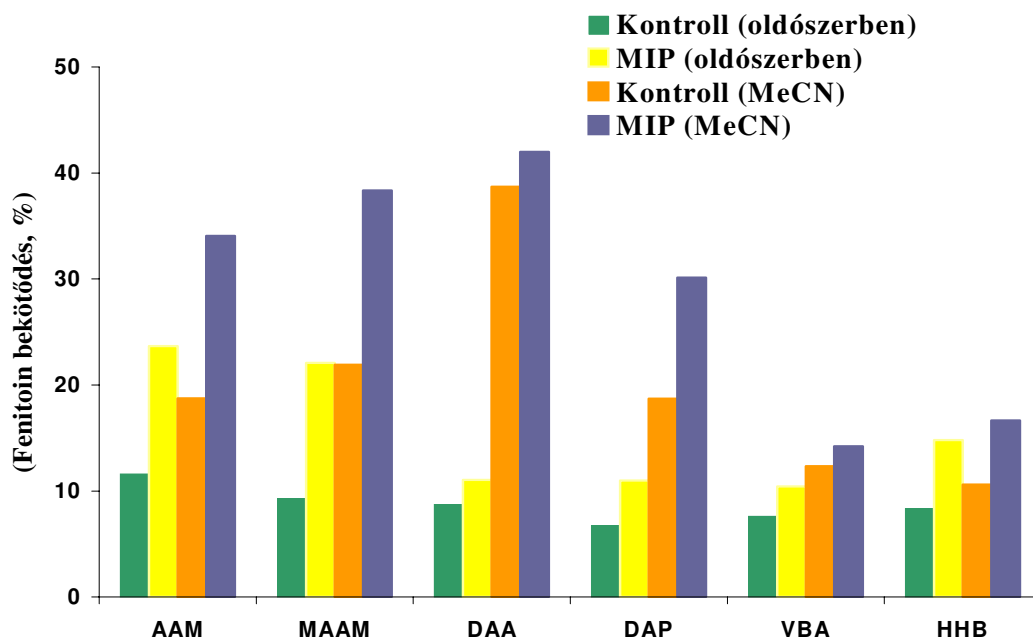
Elvégeztem a szintetizált mini-MIP-ek visszanyerésvizsgálatát. A különböző polimerekből kioldódott fenitoin mennyiségeket a 22. ábra szemlélteti.



**22. ábra** Fenitoin kioldódása a polimerizációs oldószerben

A templát visszanyerési tesztet a polimerizációs oldószerben (oldószerkegelyben) végeztem, mert mint az irodalmi részben láthattuk, sok esetben a polimer abban a közegben mutatja a legjobb felismerést, amelyben készült. Egy adott polimer esetében a templát teljes vagy magas százalékban való visszanyerése arra utal, hogy a polimer nem fogja felismerni a templátot (vagy csak nagyon kis mértékű lesz a felismerés), tehát így kiszűrhetjük a nem megfelelő polimereket. Az AAM és MAAM funkcionális monomert tartalmazó polimerek esetén a templát visszanyerése 1 óra ultrahangozás után 70% alatt volt, azonban a többi funkcionális monomert tartalmazó polimer esetében jóval ezen érték felett. Ez arra utal, hogy valószínűleg ez utóbbi polimerek nem fogják a várt felismerést mutatni fenitoinra.

Mielőtt továbbléptem volna a polimerek tesztelésében, a fenitoint teljes mennyiségében el kellett távolítani a polimerekből. A fenitoin bekötődést a polimerizációs oldószerben és acetonitrilben is megmértem. A polimerizációs oldószerben és acetonitrilben mért százalékos fenitoin bekötődést a 23. ábra szemlélteti.



**23. ábra** Fenitoin kötődése a MIP és kontroll polimerhez a polimerizációs oldószerben és acetonitrilben

Az ábrát tanulmányozva megállapítható, hogy a legnagyobb különbséget a fenitoin bekötődésben a kontrollhoz képest az AAM és MAAM funkcionális monomereket tartalmazó polimerekkel értünk el. A fenti polimerek esetében a fenitoin lenyomatot tartalmazó polimer esetén mért fenitoin kötődés több mint kétszerese a kontroll polimerrel mért értéknek. Kicsit rosszabb értéket mértem a DAP és HHB funkcionális monomerekkel készült polimerek esetén. A VBA funkcionális monomert tartalmazó polimer esetén a kedvezőtlen bekötődési arány azzal magyarázható, hogy a dimetil-formamid oldószer kedvezőtlen közeg a monomer-templát komplexképződésre. Valószínű, hogy az oldószer maga is hidrogénhidas kölcsönhatásba lép (külön-külön) a fenitoinnal és a monomerrel, és ezáltal jelentősen rontja a valószínűségét a templát-monomer komplex létrejöttének. Hasonló a magyarázat a DAA monomert tartalmazó polimer szelektivitására.

A polimerizációs oldószerben és az acetonitrilben mért fenitoinmegkötődési értékeket összehasonlítva megállapítható, hogy esetünkben az acetonitril kedvezőbb közeg a fenitoin kötődésére, mint a polimerizációs oldószer, ugyanis acetonitrilből sokkal nagyobb bekötődést mértünk mindegyik polimerrel.

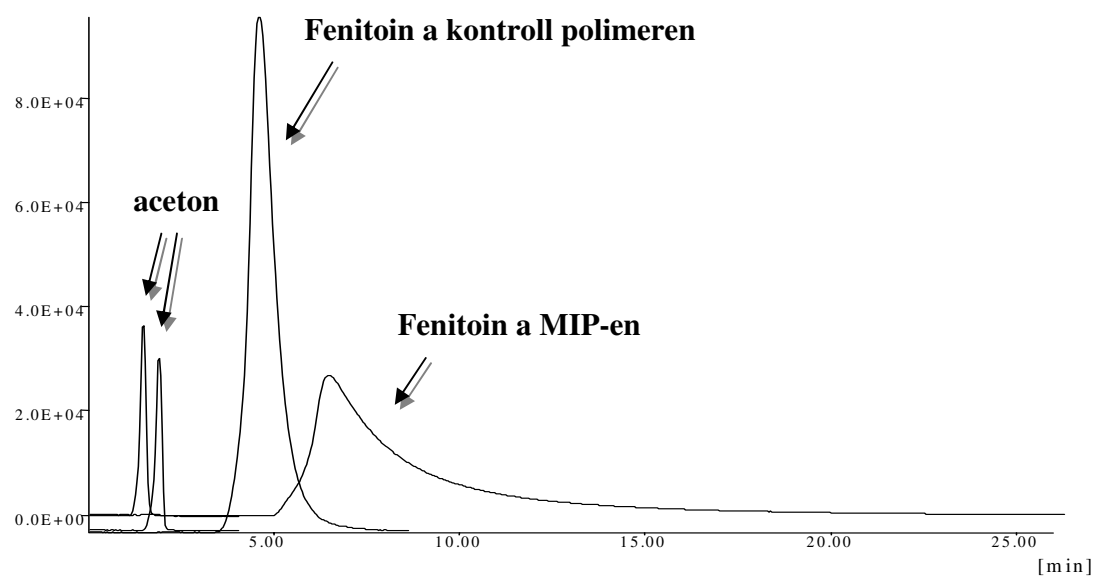
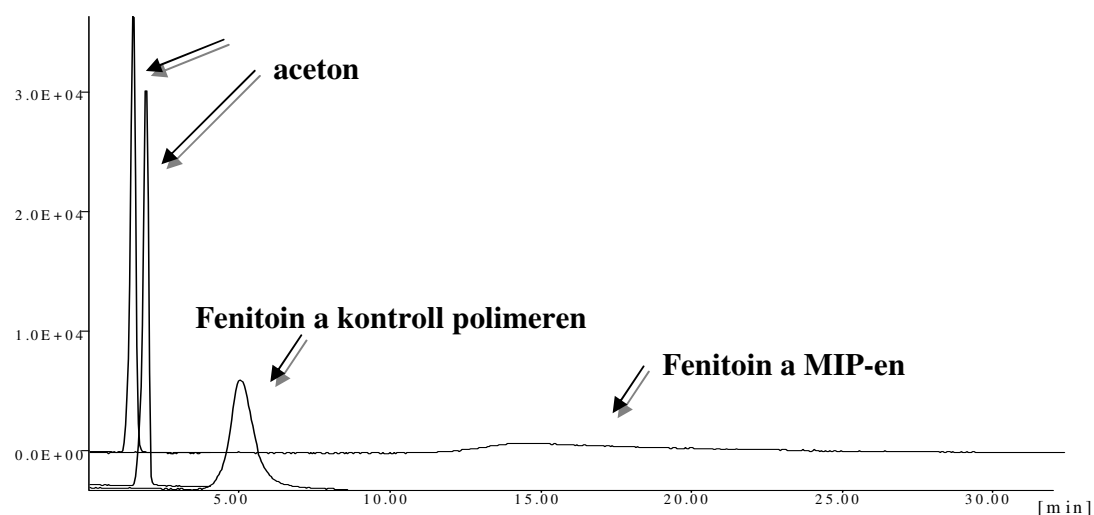
### **3.4.1.3. Az optimális polimerek preparatív előállítás**

A mini-MIP tesztelések alapján két funkcionális monomert találtunk alkalmasnak fenitoin lenyomat készítésére, az AAM és MAAM funkcionális monomerrel készült polimereket, így ezeket szintetizáltam nagy mennyiségben (16. táblázat) a kísérleti részben leírt módon.

### **3.4.2. A preparatív méretben előállított polimerek kromatográfiás tesztelése**

A fenitoin lenyomatot tartalmazó polimereket és a kontroll polimereket oszlopba töltésük után kromatográfiás álló fázisként teszteltük, hogy meggyőződjünk a kötőhelyek létezéséről a MIP-ekben. A tesztelés során két különböző eluensösszetételt használtam az ún. standard eluenst, amely acetonitril/víz/ecetsav 92,5/2,5/5 elegye és

tiszta acetonitrilt. A MIP illetve a kontroll polimerekkel töltött oszlopok tesztelése során 20  $\mu$ l 1 illetve 10 mM fenitoinoldatokat injektáltunk az oszlopokra, 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva. A detektálás 240 nm-en, UV-detektor segítségével történt.



**24. ábra** A MAAM funkcionális monomerrel készült kontroll és MIP polimerek kromatográfiás tesztelése acetonitrilben 1 és 10 mM fenitoin injektálása esetén (1ml/perc, injektált térfogat 10  $\mu$ l)

A MAAM funkcionális monomerrel, fotopolimerizáció útján készült polimer, illetve a megfelelő kontroll polimer acetonitriles oldószerben való mérése során kapott kromatogramokat a 24. ábrán szemléltetem. Összevetve a MIP-en mért fenitoin retenciót és csúcsalakat a kontroll polimeren mérttel, látható a lenyomatképzés hatása a MIP-ben. A fenitoin retenciója jóval nagyobb a MIP-en mint a kontroll polimeren, ami arra utal, hogy a MIP-en erősebb fenitoin kötőhelyek vannak, mint a kontroll polimeren. A MIP-en mért kromatogramok esetén elnyúlt, aszimmetrikus kromatográfiás csúcsalakat észleltünk mindkét injektált koncentráció esetén. Ez a jelenség, ahogy az irodalmi részben is olvasható, karakterisztikus a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek esetén. Amint az a kromatogramokon látható a retenció jelentősen csökkent a nagyobb koncentrációjú fenitoin injektálása esetén. Ez a jelenség is a molekuláris lenyomatot tartalmazó polimerek gyakran tapasztalt sajátja, amit a nagy kötőerősségű kötőhelyek telítődésével magyaráznak. A 25.a és 25.b ábrákon a különböző polimereken, kétféle eluenssel mért  $k'$  értékeket ábrázoltam: acetonitrilben (a) és az ún. standard eluensben (b). A holtterefogat ( $t_0$ ) mérésére acetont injektáltam.

A polimerek szelektivitása sokkal jobb volt acetonitrilben, mindkét monomer illetve mindkét polimerizációs eljárás esetén, mint a standard eluensben. Mindegyik polimer esetében acetonitrilben kiszámoltuk a szelektivitást, azaz a MIP és kontroll polimerrel mért kapacitás faktorok arányát (ezt a szakirodalomban imprinting factor-nak, IF, nevezik). A MAAM funkcionális monomerrel készült polimerek esetében sokkal jobb szelektivitási értékeket értünk el, mint AAM esetén.

Ez az eredmény is azt támasztja alá, hogy nagy jelentőséggel bír a megfelelő oldószer és monomer kiválasztása, akár a nagyon kis szerkezetbeli különbségek is jelentősen befolyásolhatják a molekuláris felismerést. Mivel a termikus úton szintetizált, MAAM funkcionális monomert tartalmazó polimerrel észleltem a legjobb fenitoin felismerést, ezért a további kísér