



POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Zakład Materiałów Polimerowych i Węglowych

PRACA DOKTORSKA

MEMBRANY Z ODCISKAMI MOLEKULARNYMI

mgr inż. Rajmund Kielczyński

promotor: **dr hab. inż. Marek Bryjak**

WROCŁAW 2005

1. STRESZCZENIE PRACY

W pracy dokonano charakterystyki dwóch typów membran z odciskami molekularnymi, mogących rozdzielać izomery optyczne alkaloidów z rodzaju Cinchona.

Pierwsze badania miały na celu poznanie składu i zdolności samoorganizowania się kompleksu monomery-wzorzec, który w wyniku polimeryzacji wbudowany zostawał w matrycę polimerową. Jest to pierwszy etap tworzenia odcisku molekularnego. Miareczkowanie roztworu cynchoniny (CIN) kwasem metakrylowym (MAA) prowadziło do samoorganizacji kompleksów, a proces ich tworzenia śledzono za pomocą widm UV-VIS. Zmiany absorbancji, które po pewnym czasie osiągnęły maksimum odpowiadały wykorzystaniu wszystkich możliwych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczką cynchoniny a cząsteczkami monomeru funkcyjnego. Jednocześnie nie stwierdzono niekorzystnego wpływu dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA) na formowanie się kompleksów. Na podstawie uzyskanych widm oraz po przeprowadzeniu komputerowego modelowania oddziaływań kwas metakrylowy-cynchonina stwierdzono, że w obsadzeniu jednej cząsteczki alkaloidu brały udział trzy cząsteczki kwasu. Uwzględniono to przy doborze składu mieszanin reakcyjnych do syntezy złożów chromatograficznych i membran monolitycznych. Kolejne etapy modelowania umożliwiły poznanie miejsc, w których dochodziło do oddziaływań wodorowych pomiędzy cząsteczkami alkaloidu i kwasu. Szereg obliczeń pozwolił także na wyznaczenie sumarycznych wartości energii wiązań wodorowych tworzących się kompleksów. Analogicznych obliczeń dokonano z cynchonidyną (CID), będącą antypodą optyczną cynchoniny.

Przed rozpoczęciem badań nad syntezą membran litych za celowe uznano przeprowadzenie klasycznej polimeryzacji blokowej. Koniecznym wydawało się podjęcie prób przeniesienia doświadczeń z syntezy materiałów chromatograficznych na preparatykę membran monolitycznych. Jako monomeru funkcyjnego i środka sieciującego użyto odpowiednio kwasu metakrylowego i dimetakrylanu glikolu etylenowego (MAA i EGDMA). Otrzymane w wyniku polimeryzacji materiały, po zmieleniu i wymyciu wzorca cynchoninowego (CIN), testowane były w chromatografii cieczowej. Odpowiednie warunki procesu łącznie z właściwie dobranym eluentem pozwoliły na określenie selektywności sorbentów polimerowych w stosunku do izomerów optycznie czynnych alkaloidów. Ponadto standaryzacja przygotowanych kolumn pozwoliła przyjąć, że były one podobnie upakowane, a porowatość materiału nie zmieniała się w nich zasadniczo. Analiza chromatograficzna wypełnień wskazała na różnice w oddziaływaniach pomiędzy alkaloidami a sorbentami. Cynchonina podawana na kolumnę zatrzymywana była dłużej niż jej antypoda optyczna

cynchonidyna (CID). Wprowadzanie dodatkowych grup karboksylowych, przez wzrost ilości kwasu metakrylowego w kopolimerze, oraz zwiększanie stężenia odcisków powodowało pojawienie się większych ilości miejsc prawidłowo rozpoznających cynchoninę, co obserwowano przez wyższe wartości współczynników enancjoselektywności α . Skład mieszanin reakcyjnych E ii 0.9, E iii 0.9, E ii 0.8 oraz E iii 0.8, a także ich polimeryzacja prowadziły do otrzymania sorbentów ze znaczną selektywnością, sięgającą nawet 7.4. Z kolei żadne ze złożeń E 1.0 (bez kwasu metakrylowego) w sposób selektywny nie zatrzymywało cynchoniny. Ważnym spostrzeżeniem było blokowanie się kolumn podczas analiz chromatograficznych. Dotyczyło to sorbentów E iv 0.9, E iv 0.8, E iii 0.75 oraz E iii 0.7. Jeśli w pierwszych dwóch przypadkach przyczyną blokowania była zaburzona struktura sieci oraz silne oddziaływania kwas octowy-sorbent, to w pozostałych dwóch powodem było słabo usieciowane złożenie. Prowadziło to również do dominacji wolnych grup karboksylowych w stosunku do tych, rozlokowanych w odciskach molekularnych i uwydatnienia się niespecyficznego sorpcji cząsteczek cynchoniny. Enancjoselektywność sorbentów E iii 0.9 i E iii 0.8 określono dodatkowo, prowadząc proces chromatograficzny w różnych temperaturach. Wzrost temperatury przyczynił się do spadku współczynnika selektywności do 2.8-3.6. Powodem mógł być prawdopodobny wpływ oddziaływań dyspersyjnych bądź też powstawanie dodatkowych silnych wiązań w kompleksie odcisk-sorbowana cząsteczka na skutek zmian konformacyjnych cynchoniny pod wpływem wzrostu temperatury.

Doświadczenia zebrane z syntezy i analizy sorbentów polimerowych pozwoliły na testowanie kompozytowych membran monolitycznych (dyfuzyjnie specyficznych). Do ich przygotowania wybrano niektóre z układów, użytych przy syntezie sorbentów, które następnie polimeryzowane były w porach membrany filtracyjnej. W zależności od składu takiej mieszaniny reakcyjnej po polimeryzacji *in situ* otrzymano różne typy odcisków molekularnych. Wymywanie cząsteczek wzorca z matrycy polimerowej zwalniało odciski, nadając tym samym membranie selektywność. Spodziewano się, że im rozmieszczenie grup karboksylowych, pochodzących od kwasu metakrylowego, pozostanie bardziej komplementarne w stosunku do cząsteczek wzorca tym wolniej będą one transportowane. Badania membran monolitycznych z odciskami molekularnymi przyniosły dość niejednoznaczne rezultaty. Membrany charakteryzowały się różną przepuszczalnością i właściwościami selektywnego transportu wobec stosowanych enancjomerów. Mimo to wydawało się, że kiedy membrany otrzymywano z EGDMA i EGDMA-MAA zachowywały się one dość przewidywalnie: preferencyjnie transportowały cynchoninę, gdy w membranie „umieszczono” odciski tego alkaloidu. Ponadto strumienie obu alkaloidów przez membrany z EGDMA były większe w porównaniu ze strumieniami otrzymanymi przez

membrany EGDMA-MAA, gdzie cząsteczki cynchoniny efektywniej wylapywane były przez odciski. Równoległe też obserwowano, że strumienie alkaloidów zwiększały się przy jednoczesnym wzroście stężenia odcisków cynchoniny, a stereoselektywność takich membran nie była wyższa niż 1.25. Obserwowana szybsza dyfuzja cynchoniny przez membranę, w porównaniu z sorbentem, w których ta sama cząsteczka cynchoniny wymywana była dłużej tłumaczone jest różnymi mechanizmami rozdziału w obu układach. Dla membran EGDMA i EGDMA-MAA z odciskami cynchonidyny, cząsteczki tego alkaloidu transportowane były szybciej niż cynchoniny, a współczynnik selektywności tych membran wynosił od 1.1 do 3.0. Obserwowano jednak mniejszą przepuszczalność alkaloidów, kiedy w membranie zwiększano stężenie odcisków cynchonidyny. Różnice pomiędzy właściwościami membran z odciskami cynchoniny i cynchonidyny wynikały z ich odmiennych konfiguracji, a także z różnych struktur samych membran, które mogły mieć postać porowatego układu lub swoistego żelu. Łączy je jednak to, że grupy karboksylowe powodowały wolniejszą dyfuzję alkaloidów. Membrany otrzymane z wykorzystaniem innego środka sieciującego TEGDMA (dimetakrylan glikolu trietylenowego) wykazały złożoną zależność pomiędzy mechanizmem transportu a parametrami syntez. Zauważono, że obecność odcisków prowadziła do niedużego wzrostu strumieni obu alkaloidów, przy czym membrany te cechowały się zasadniczo efektywniejszym przenoszeniem cynchonidyny. Co zaskakujące, największą selektywnością 3.7 wyróżniła się membrana z TEGDMA, otrzymana przy najwyższej z badanych zawartości cynchoniny w mieszaninie reakcyjnej.

Drugi typ membran, tzw. membrany afinitywne, otrzymywano metodą mokrej inwersji faz z uwzględnieniem techniki molekularnego wdrukowania cząsteczki cynchoniny (lub cynchonidyny). Do formowania membran użyto trzech nowo syntezowanych kopolimerów akrylonitrylu i kwasu akrylowego (P[AN-co-AA]), różniących się ciężarem cząsteczkowym. Stwierdzono doświadczalnie, że badane membrany charakteryzowały się zbliżonymi parametrami średniej wielkości porów μ i szerokości rozkładu σ . Oznaczało to, że struktura otrzymanych membran nie jest powiązana ze średnią masą cząsteczkową kopolimerów. Odciski otrzymywano po usunięciu cząsteczek wzorca z matrycy polimerowej membrany. Analiza widm IR potwierdziła tezę, że płukanie membran powodowało ekstrakcję wzorca z układu, a istotnym elementem był wybór odpowiedniego ekstrahenta. Właściwe badania miały na celu określenie właściwości sorpcyjno-separacyjnych membran. Sorpcję permeatu oceniono podczas równoważenia membrany w roztworze alkaloidu bądź też w trakcie filtracji tegoż roztworu przez membranę. Membrana z poliakrylonitrylu wykazała bardzo słabe zdolności wiązania alkaloidu, niezależnie od tego czy w matrycy polimerowej odciskano wzorzec czy też nie. Wprowadzenie do układu polimerowego grup

karboksylowych znacznie podniosło zdolności sorpcyjne uformowanych z takiego materiału membran. Zauważono, że membrany P[AN-co-AA] z odciskami molekularnymi efektywniej zatrzymywały cząsteczki tego alkaloidu, którego wcześniej użyto jako wzorca. Im stężenie odcisków było wyższe tym lepszy był efekt sorpcji. Stwierdzono ostatecznie, że najlepszymi właściwościami sorpcyjno-separacyjnymi cechowała się membrana otrzymana z kopolimeru PAAN t o współczynniku selektywności 1.45. Pomimo, że membrany z kopolimerów PAAN r1 i PAAN r4 sorbowały oba alkaloidy, jakość pozostawionych w nich odcisków wydawała się gorsza. Świadczyły o tym małe różnice we współczynnikach wdrukowania otrzymane podczas filtracji obu alkaloidów.

W omówionych sorbentach, membranach monolitycznych i afinitywnych typu MIP istotną rolę odgrywają obecne w polimerze ugrupowania polarne. Powodują one odpowiednie ustawienie się transportowanych cząsteczek związku w odciskach molekularnych, przez co medium zdolne jest do selektywnej sorpcji substancji. Jednocześnie ocena stereoselektywności MIP-ów wskazuje, że istnieje optymalny stosunek pomiędzy monomerem funkcyjnym i wzorcem, który powinien dawać polimer cechujący się odpowiednią selektywnością wiązania oraz stosunkowo wysoką specyficznością.

2. CEL PRACY

Celem pracy było otrzymanie dwóch typów *membran z odciskami molekularnymi* (Molecularly Imprinted Membranes, MIM), określenie procedur ich przygotowania oraz poznania kluczowych elementów decydujących o ich enancjoselektywności czy też właściwościach sorpcyjno-separacyjnych. Układy te stanowią:

- ***membrany monolityczne*** (lite, permselektywne), zawierające odciski w całej swojej objętości, zdolne do rozdziału izomerów optycznych. Do tworzenia tego typu membran wykorzystano doświadczenia z syntezy *sorbentów monolitycznych*, jako materiałów chromatograficznych,
- ***membrany afinitywne*** (porowate), zawierające odciski zlokalizowane głównie w cienkiej warstwie na powierzchni porowatej podpory, zdolne do selektywnej sorpcji jednego z enancjomerów.

3. OMÓWIENIE LITERATURY

3.1. Wstęp - membrany i technologie membranowe

Zastosowanie membran oraz procesów membranowych w różnych gałęziach przemysłu nie jest czymś nowym. Co więcej, technologie membranowe są jednymi z bardziej dynamicznie rozwijających się obszarów aktywności współczesnych inżynierów. Ocenia się, że rocznie suma wydatków związana z ich sprzedażą sięga 20 miliardów euro, i z roku na rok zwiększa się średnio o kolejne 10 %.

Zainteresowanie tematyką membranową trwa od dwóch wieków, choć proces rozdziału membranowego znany jest od bardzo dawna. Terminem membran definiuje się dodatkową fazę rozdzielającą dwie inne fazy, działającą w transporcie masy jako pasywna lub aktywna przegroda, co umożliwia selektywny rozdział składników lub frakcji w złożonych układach. Po raz pierwszy wykorzystano je w produkcji wina i warzeniu piwa. Technologia oczyszczania zawiesin przez sedymentację osadu i filtrację na tkaninach była wdrożeniem pierwszych skutecznych separacji membranowych. Powstająca na tkaninie warstwa substancji filtrowanej doskonale zatrzymywała cząstki koloidalne. Otrzymany klarowny przesącz alkoholowy (permeat) stanowił pożądany produkt końcowy. Innym ciekawym przykładem może być proces produkcji papieru czerpanego, w którym właściwym produktem był osad zbierany na filtrach. Technologię tę stosują się nadal, a papier otrzymywany w ten sposób jest nadal uważany za luksusowy materiał. Przełomem w pracach nad zjawiskiem transportu membranowego było wykorzystanie błon naturalnych: świńskich pęcherzy i jelit. W ich wyniku odkryto zjawisko osmozy. Od połowy XIX w. rozpoczęły się powolne acz systematyczne postępy w dziedzinie membranologii. Trwały one aż do przełomu lat 60. XX w. Jednak pomimo znajomości zjawiska separacji membranowej, będącej podstawą opracowania zasad termodynamiki (równanie van't Hoffa) oraz opisu zjawiska transportu masy (I i II prawo Ficka) istniało stosunkowo słabe zainteresowanie procesami membranowymi, nie mówiąc już o ich stosowaniu na skalę przemysłową. Często procesy te określano mianem kuriozalnych technik laboratoryjnych. Punktem zwrotnym w technologiach membranowych było opracowanie przez Loeba i Sourirajana sposobu otrzymywania wysokowydajnych, a jednocześnie selektywnych membran asymetrycznych z polimerów używanych do produkcji włókien syntetycznych [1]. Dalszy gwałtowny rozwój technik membranowych wynikał nie tylko z opanowania technologii tworzenia membran, ale również z możliwości wykorzystania coraz lepszych materiałów. Właśnie w tamtym okresie obserwowano się największą dynamikę wzrostu produkcji polimerów [2]. Następnym

krokiem było opracowanie procesów z udziałem membran kompozytowych, które cechuje duża trwałość i wytrzymałość. Selektowność takich membran wynika głównie z celowo dobranych właściwości, takich jak zwilżalność, rozpuszczalność i właściwości elektryczne, w kolejnych warstwach. Obecnie membrany kompozytowe zdominowały rynek membranowy.

Drugą generację procesów membranowych tworzą zjawiska preferencyjnego transportu przez membrany pełniących rolę sztucznej powierzchni międzyfazowej. W ten sposób opracowano całe spektrum procesów membranowych takich jak destylacja membranowa [3], ekstrakcja membranowa [4] czy absorpcja membranowa [5]. Oddzielną grupę stanowią membrany do kontrolowanego uwalniania składników. Znalazły one szerokie zastosowanie m.in. w medycynie oraz w nowoczesnej agrotechnologii. Dzięki nim możliwe jest dozowanie preparatów (leków, nawozów), których dawki muszą być zachowane na odpowiednio stałym poziomie [6].

Wykorzystanie membran do separacji dotyczy wyodrębniania, frakcjonowania, oczyszczania i zagęszczania składników. Dotychczas, najliczniejsze i najwzszechstronniejsze zastosowanie znalazły tzw. ciśnieniowe procesy membranowe. Obserwuje się dużą tendencję wprowadzania tych technik do takich dziedzin jak przemysł farmaceutyczny [7], spożywczy [8, 9], chemiczny [10, 11], energetyczny [12, 13], ochronę środowiska naturalnego [14, 15], uzdatnianie [16, 17] i oczyszczanie wód różnego pochodzenia [18, 19], detoksykacja powietrza [13] itp. W medycynie znalazły zastosowanie w sztucznych organach takich jak nerka, płuco, trzustka czy skóra [20].

Poszukiwanie coraz to nowszych metod separacji prowadzi do projektowania procesów hybrydowych z udziałem membran [21]. Tendencja prowadzonych badań skierowała się z technologii wytwarzania membran na podniesienie efektywności procesów membranowych. Zasadniczą rolę pełni obecnie umiejętność doboru optymalnych parametrów procesowych, konieczna do automatycznej kontroli procesów. Opracowywaniu nowych sposobów wytwarzania membran sprzyja rozwój chemii polimerów i inżynierii materiałowej. Tajemnica sukcesu materiałów polimerowych tkwi w ich szerokim spektrum właściwości, niskiej cenie oraz łatwości, z jaką mogą być modyfikowane i przetwarzane. Jednak efektywne i ekonomicznie opłacalne wykorzystanie membran polimerowych, optymalne sterowanie oraz zapewnienie ich długotrwałej pracy wciąż pozostaje otwartym polem działalności dla współczesnych inżynierów. Ważne odnotowania jest również i to, że prace nad wykorzystaniem technik membranowych były realizowane w ramach 5 Europejskiego Programu Ramowego i zostały wpisane w priorytety Programu 6.

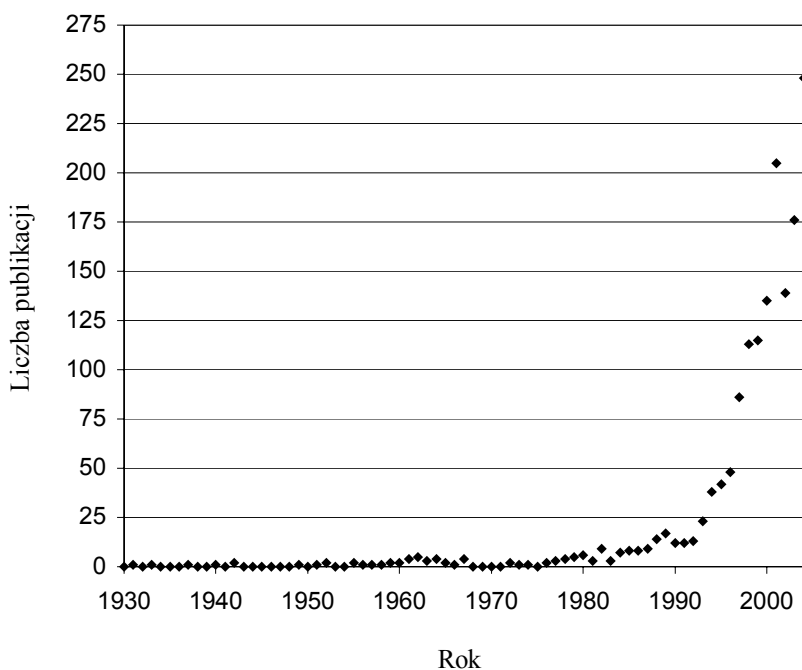
Niewątpliwą zaletą procesów membranowych jest możliwość prowadzenia ich w sposób ciągły. Z tego powodu obserwuje się wciąż nie słabnące zainteresowanie membranami, również tymi, które w swym założeniu naśladować mają naturalne układy biologiczne – membran opartych na strukturze polimeru, zawierającego odciski molekularne, zdolnych do rozdziału mieszanin racemicznych, ale również do wydzielania substancji o szczególnym znaczeniu.

3.2. Polimery z odciskami molekularnymi

3.2.1. Stan obecny

Pierwsze prace dotyczące *polimerów z odciskami molekularnymi* (Molecularly Imprinted Polymers, MIP) sięgają początków lat 70. XX wieku. Wtedy to Wulff i Sarhan przedstawili nową technikę tworzenia specyficznych miejsc receptorowych w matrycy polimerowej [22]. Technika ta, zwana *wdrukowaniem molekularnym*, pozwala nadać materiałowi polimerowemu specyficznych właściwości, które decydowały o selektywnym rozpoznawaniu określonego typu cząsteczek. Do 1970 roku pojawiło się około 40 różnych opracowań opisujących koncepcyjnie podobne podejście w drukowania, z tym że „tworzenie” miejsc rozpoznających prowadzono w złożach krzemionkowych [23]. W początkach lat 30. XX w. Polyakov, jako jeden z pierwszych zajął się badaniem zdolności sorpcyjnych odpowiednio preparowanych żeli krzemionkowych wobec benzenu, toluenu i ksyłenu. Z kolei Dickey, w dwie dekady później, po spolimeryzowaniu sorbentu krzemionkowego w obecności cząsteczek barwnika oranżu metylowego otrzymał materiał polimerowy, który selektywnie wiązał swoiste cząsteczki, w przeciwieństwie do sorbentu kontrolnego.

Gwałtowny rozkwit techniki w drukowania molekularnego nastąpił jednak na początku lat 90. ubiegłego wieku. Wzrastające zainteresowanie tematyką polimerów z odciskami molekularnymi, zdolnych do naśladowania biologicznych systemów rozpoznawania, zwłaszcza stereoizomerów, najlepiej ilustruje liczba ukazujących się publikacji, Rys. 1.



Rys. 1. Dynamika wzrostu zainteresowań polimerami typu MIP [24].

Skupienie uwagi na tego typu materiałach polimerowych wynikać może z powrotu do idei Paulinga z 1940 r. [23]. W swej teorii wnioskował, że przeciwciała są tworzone jedynie w odpowiedzi na obecność antygeny, który traktowany jako wzorzec jest bodźcem do syntezy przeciwciał. Sugerował on ponadto, że wszystkie przeciwciała posiadały identyczną strukturę pierwszorzędową, a ich selektywność, wywoływana przez antygen, wynikała jedynie z różnic w konformacji. Chociaż teoria Paulinga była po części niepoprawna, zainspirowała szereg znaczących badań, które ostatecznie poprowadziły do wzrostu zainteresowań polimerami z odciskami molekularnymi.

W bazie danych Society of Molecular Imprinting [24] podane jest, iż do tej pory opublikowano 1642 prace oryginalne i 294 przeglądowne poświęcone tej tematyce. Wyraźnie widać wzrastające zainteresowanie tą grupą polimerów wykorzystywanymi do separacji różnych substancji. Oprócz koncepcji Paulinga głównymi powodami tego zainteresowania są: możliwość tworzenia układów MIP z dostępnych i tanich monomerów, sterowania procesem „tworzenia” takich polimerów w trakcie syntezy oraz otrzymywania różnych końcowych form MIP (od nieregularnego ziarna sorbentu poprzez strukturę monolityczną aż po membranę afinitywną) [25]. Jednak najistotniejszą sprawą jest umiejętne wykorzystanie właściwości polimerów z odciskami molekularnymi, które potrafią doskonale naśladować obiekty naturalne – enzymy czy też przeciwciała. Stąd wykorzystanie powinowactwa wybranych substancji do otrzymanych polimerów negatywnych umożliwia selektywne ich wydzielanie.

Jednym z ciekawszych odkryć ostatnich lat była udana próba wdrukowania cząsteczki wzorca w pojedynczą makrocząsteczkę, stanowiącą wysoce rozgałęziony polimer nazywany dendrymerem [26]. Zimmerman i Suslick, którym udało się tego dokonać, otrzymali struktury swym wyglądem przypominające muszelki. Specyficznie wiązały one cząsteczki porfiryny, a nie przyjmowały innych. Jak zapewniają autorzy tych badań, użycie jednej makrocząsteczki dendrymeru zamiast wielu do tworzenia pojedynczego miejsca rozpoznawania, było szybsze i znacznie skuteczniejsze, dzięki czemu otrzymane odciski molekularne porfiryny łatwiej rozróżniają i separują właściwe cząsteczki. Takie molekularne matryce powstają w wyniku przyłączania się dendronów do porfiryny, zapoczątkowując tworzenie dendrymeru. Szkielet takiego elastycznego dendrymeru jest następnie sieciowany, scalając tym samym grupy końcowe dendronów. Końcowym etapem jest hydroliza, która powoduje usunięcie cząsteczki porfiryny z układu, dzięki czemu powstała pusta przestrzeń zdolna jest do selektywnego i mocnego wiązania swoistych cząsteczek.

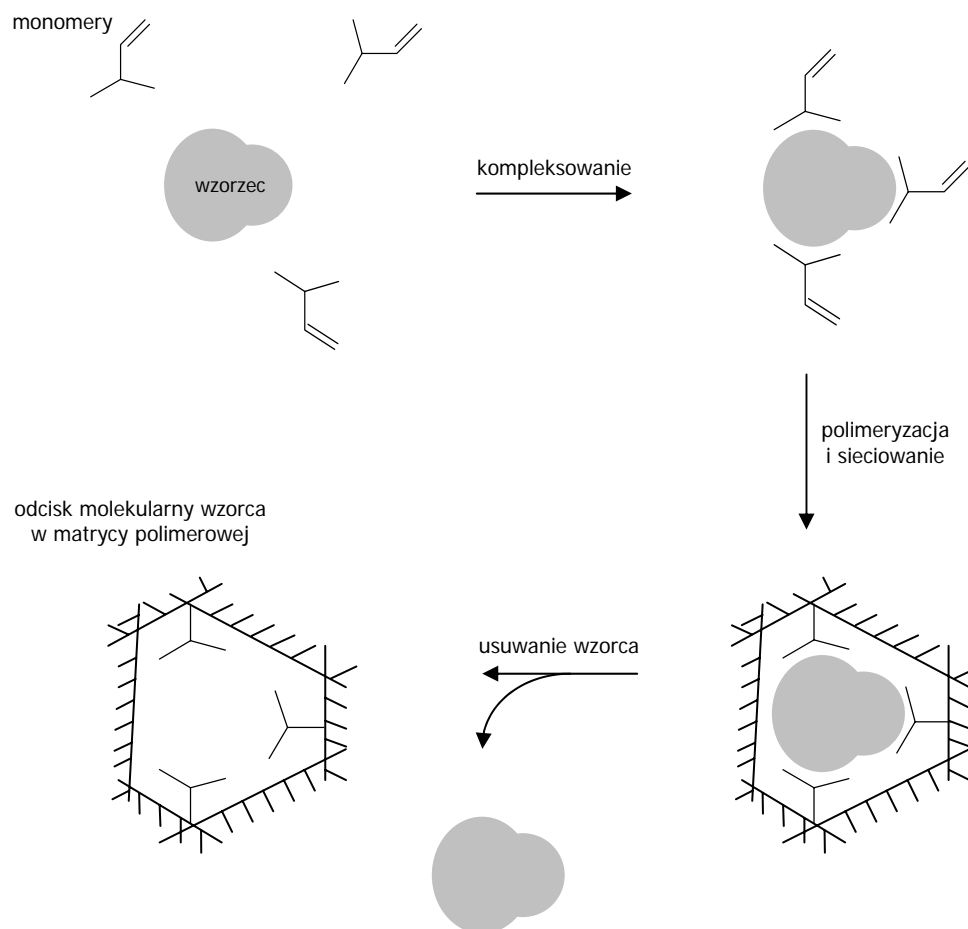
Opisane pokrótce odkrycie amerykańskich uczonych jest jednym z nielicznych przypadków nietypowego i dość zaskakującego podejścia do molekularnego wdrukowania. Zaskakujący jak i zastanawiający jest też rozkład ilościowy prac dotyczących polimerów z odciskami molekularnymi. Jeżeli setki z nich poświęcone są złożom chromatograficznym i sensorom to prac odnoszących się do membran jest wciąż niewiele. Rozpoczynając własne badania, musiano zadowolić się jedynie kilkoma informacjami o konstruowaniu membran z odciskami molekularnymi opartych na strukturze monolitów polimerowych. Było to niezwykle istotne z tego względu, że taką metodą otrzymywany był jeden z dwóch typów membran omawianych w niniejszej pracy.

3.2.2. Technika wdrukowania molekularnego

Wulff, jeden z prekursorów syntezy materiałów typu MIP, przedstawił swoje założenia, które zaowocowały powstaniem polimerów z odciskami molekularnymi [27, 28, 29]. Dla łatwiejszego zrozumienia tematyki badań podjętej w niniejszej pracy, opierającej się na koncepcji Wulffa, wydaje się ona warta przytoczenia. W chromatografii powinowactwa oddziaływania pomiędzy grupami funkcyjnymi ligandu i przeciwligandu odpowiedzialne są za selektywność sorbentu. Aby otrzymać selektywny materiał chromatograficzny wystarczy jedynie rozlokować w odpowiednich miejscach przestrzeni właściwe ugrupowania, ale tak, aby później nie mogły się one przemieszczać. Perspektywicznie jednym ze sposobów realizacji tych założeń było użycie polimerów. Jednak typowe polimery posiadają zwykle jeden typ ugrupowań funkcyjnych wzdłuż łańcucha. Tworzenie polimerów, które posiadały dwie lub więcej grup rozmieszczonych w określony sposób, było niewystarczające do zsyntezowania sorbentu o właściwej lokalizacji grup funkcyjnych. Zważywszy tym bardziej, że konieczne jest odpowiednie rozlokowanie ugrupowań w trójwymiarowej strukturze matrycy polimerowej. Okazało się jednak, że takie uporządkowanie można osiągnąć poprzez najprostsze rozwiązanie, polegające na zabudowaniu polimerem przestrzeni wokół cząsteczek substancji, na którą chce się uwrażliwić materiał.

Łańcuchy obudowują cząsteczki wzorca oddając w ten sposób jej wielkość i kształt. Cząsteczki substancji poddawanej rozdzielaniu mają zwykle wiele grup funkcyjnych. Dotyczy to przede wszystkim związków aktywnych biologicznie. W mieszaninie reagentów, między grupami funkcyjnymi monomerów i cząsteczkami wzorca, dochodzi do specyficznych oddziaływań jonowych, wodorowych czy dyspersyjnych. Wskutek tego monomery zajmują określone miejsca wokół cząsteczki wzorca. Powstają swoiste kompleksy monomery-cząsteczka, które następnie zostają „zamrożone” i unieruchomione w sieci polimerowej. Z chwilą, kiedy z matrycy zostaną usunięte cząsteczki-wzorce, powstałe wolne przestrzenie stają się dostępne dla cząsteczek podobnych lub wręcz identycznych jak te, które zostawiły swój ślad. Grupy funkcyjne odcisków molekularnych stanowią zatem kluczowe elementy ułatwiające rozpoznanie wybranych cząsteczek, nadając materiałowi polimerowemu swoistego powinowactwa do jednego rodzaju struktur. Właśnie ten sposób tworzenia polimerów z odciskami molekularnymi stanowi o uniwersalności omawianej metody. Ogromną zaletą techniki molekularnego wdrukowania jest to, że w zależności od potrzeb w polimerze można utrzymywać odciski molekularne różnych związków chemicznych, co pomaga otrzymać całą

gamę specyficznych polimerów selektywnie je rozróżniających [30]. Schemat powstawania MIP-u został zilustrowany na Rys. 2.



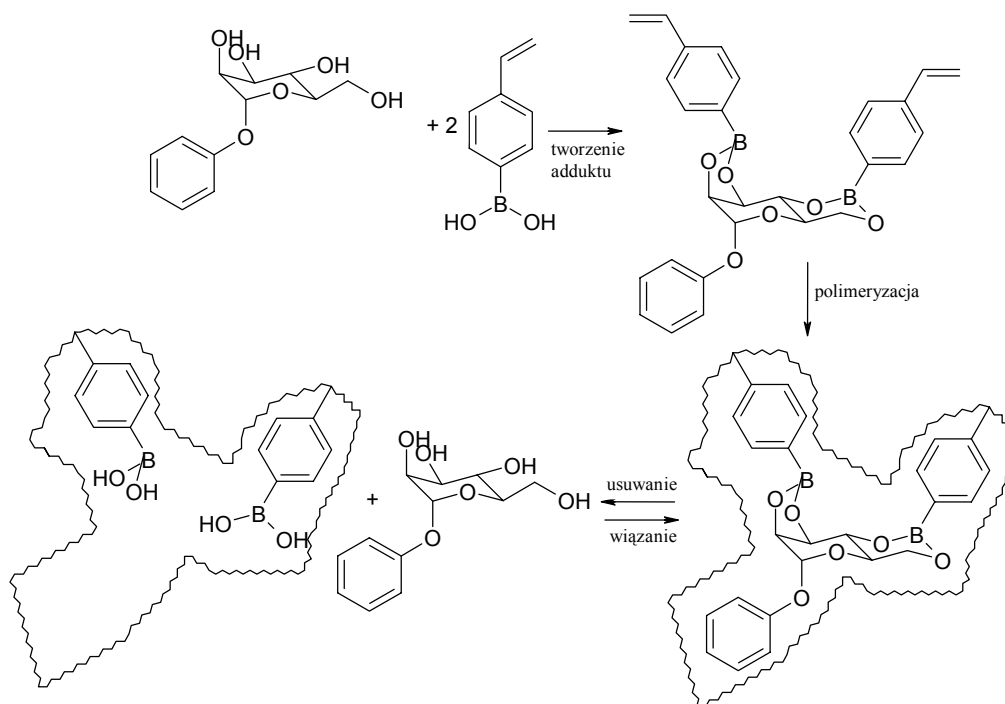
Rys. 2. Schemat powstawania polimerów z odciskami molekularnymi, MIP.

Ta elegancka i w założeniach prosta metoda tworzenia polimerowych „odlewów” określonych związków, wykorzystująca zjawisko specyficzności oddziaływań, realizowana jest na dwa sposoby. Prowadzi się *wdrukowanie kowalencyjne* i *niekowalencyjne*, a sam proces tworzenia struktur polimerowych typu MIP można podzielić na trzy etapy. Tabela 1. stanowi porównanie omawianych metod.

Tabela 1. Porównanie metody kowalencyjnego i niekowalencyjnego wdrukowania

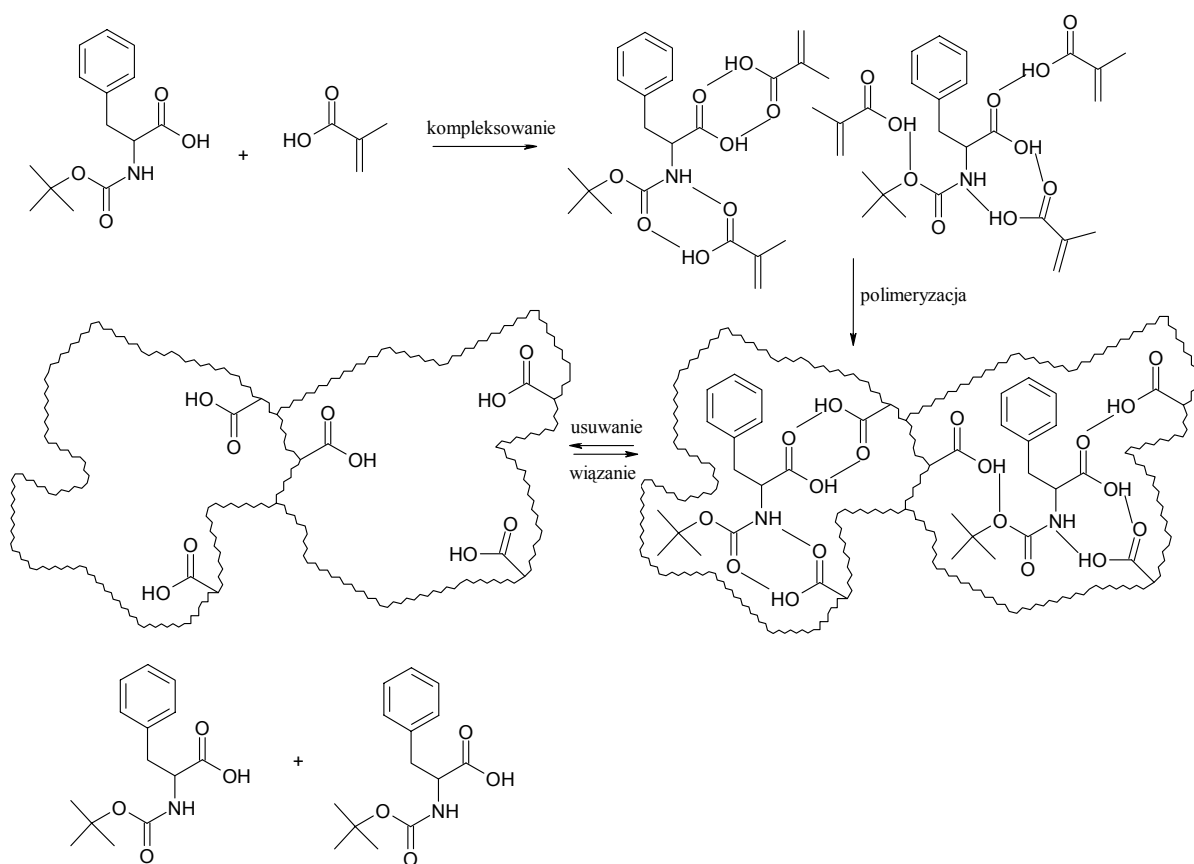
WŁAŚCIWOŚĆ	RODZAJ WDRUKOWANIA	
	KOWALENCYJNE	NIKOWALENCYJNE
Synteza kompleksu monomer-wzorzec	niezbędna	niekonieczna
Warunki polimeryzacji	swobodny dobór	ściśle określone
Wymycie wzorca po polimeryzacji	trudne	łatwe
Wiązanie wzorca przez grupy funkcyjne	wolno	szybko
Struktura grup funkcyjnych w matrycy	przejrzysta, uporządkowana	mniej uporządkowana i przejrzysta

Wulff - zwolennik pierwszej metody - twierdzi, że najdokładniejsze odciski powstają, kiedy cząsteczka wzorca, tworząc trwały kompleks z monomerami, łączy się z nimi słabymi wiązaniami kowalencyjnymi, Rys. 3. Addukt polimeryzuje, a po zakończonej polimeryzacji można go rozłożyć przez rozerwanie tworzących go wiązań. Wdrukowanie prowadzone za pomocą adduktów ma jednak słabe strony, bowiem takie struktury mogą być tworzone z udziałem stosunkowo nielicznej grupy wzorców.



Rys. 3. Schemat wdrukowania kowalencyjnego fenylo- α -D-mannozydu z użyciem kwasu winylofenyloborowego [29].

To ograniczenie przyczyniło się do opracowania metody wdrukowania niekowalencyjnego tj. metody bez konieczności tworzenia przejściowych adduktów, umożliwiając otrzymywanie MIP-ów z większej liczby układów, Rys. 4. [31]. Mosbach, odkrywca tej metody, utrzymuje, że do stabilizacji kompleksu wzorec-monomery wystarczą wiązania jonowe, wodorowe bądź hydrofobowe [32]. Przyjmuje się, że oddziaływania te pomiędzy ugrupowaniami funkcyjnymi monomerów a cząsteczką wzorca są wystarczająco silne, aby gwarantować stabilne rozmieszczenie monomerów w przestrzeni. Dzięki bardziej przewidywalnej kinetyce tworzenia i rozpadu kompleksu przed- i popolimeryzacyjnego metoda ta została lepiej poznana.



Rys. 4. Schemat wdrukowania niekowalencyjnego Boc-feniloalaniny z wykorzystaniem kwasu metakrylowego [29].

Polimeryzacja mieszaniny reakcyjnej składającej się z monomeru funkcyjnego i środka sieciującego prowadzi do obudowania cząsteczek wzorca siecią matrycy polimerowej, która zaciskając się wokół wzorca uniemożliwia przemieszczanie się grup funkcyjnych. Matryca polimerowa nie może być jednak zbyt sztywna. Chodzi o to,

aby cząsteczki wzorca były usuwalne z układu, ale również by mogły później wnikać do powstałych wolnych przestrzeni, będącymi miejscami ich rozpoznawania.

Ostateczną kwestię powstania wolnych przestrzeni zamyka usunięcie z matrycy polimerowej cząsteczek wzorca. W przypadku tworzenia struktur metodą wdrukowania niekowalencyjnego stosuje się zwyczajną ekstrakcję odpowiednio dobranym ekstrahentem. Natomiast kiedy wdrukowanie prowadzi się z wykorzystaniem adduktów, matrycę poddaje się obróbce chemicznej, powodującej fizyczne rozerwanie wiązań.

3.2.3. Czynniki wpływające na właściwości polimerów negatywowych

Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za selektywność polimerów typu MIP są kształt i wielkości powstających odcisków molekularnych [33]. Ta zdolność rozpoznawania właściwych cząsteczek, bazuje przede wszystkim na oddziaływaniach między grupami funkcyjnymi monomerów i wzorca [34], ponieważ priorytetową rolą grup funkcyjnych polimeru jest przestrzenne ustawienie cząsteczki, tak aby mogła wpasować się do odpowiedniej wnęki.

Zdolność separacyjna polimerów z odciskami molekularnymi rządzi się prawami termodynamicznymi. Williams [35] podjął próbę opisu termodynamiki sorpcji i wyznaczył warunek energetyczny tworzenia kompleksów odcisk-cząsteczka, zapisując go w następującej postaci {1}:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{t+r}} + \Delta G_{\text{r}} + \Delta G_{\text{h}} + \Delta G_{\text{vib}} + \Delta G_{\text{p}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{vdW}} \quad \{1\}$$

gdzie ΔG_{bind} to zmiana swobodnej energii Gibbsa na skutek tworzenia kompleksu, $\Delta G_{\text{t+r}}$ - zmiana energii translacyjnej i rotacyjnej na skutek ograniczenia ruchliwości cząsteczki we wnęcie, ΔG_{r} - zmiana energii, wynikająca z ograniczenia ruchliwości cząsteczek po kompleksowaniu, ΔG_{h} - zmiana energii na skutek oddziaływań hydrofobowych, ΔG_{vib} - zmiana energii wibracyjnej cząsteczki, ΔG_{p} - zmiana energii na skutek oddziaływań grup polarnych w kompleksie, ΔG_{conf} - zmiana energii, wynikająca ze zmian konformacji cząsteczki we wnęcie, ΔG_{vdW} - zmiana energii oddziaływań van der Waalsa.

Ustalony stan równowagi tworzenia kompleksów pomiędzy cząsteczkami wzorca a monomerami wpływa bezpośrednio na liczbę powstających miejsc rozpoznawania, jak również na jakość tych miejsc. Skutkuje to tym, że z najbardziej stabilnych kompleksów powstają najlepsze i najdokładniejsze odciski. Warto wyraźnie podkreślić, że stopień optymalnej koordynacji cząsteczki wzorca przez monomery funkcyjne zależy nie tylko od charakteru każdego ze składników obecnych w mieszaninie polimeryzacyjnej, ale i od panujących w układzie warunków fizycznych, takich jak temperatura czy ciśnienie. Oddziaływania każdej z par: monomer-monomer, wzorzec-wzorzec, rozpuszczalnik-monomer, rozpuszczalnik-wzorzec, wpływają na stan równowagi całego układu, a zatem i na trwałość kompleksów monomer-wzorzec, które z kolei rządzą jakością powstających populacji odcisków molekularnych.

Chociaż technika molekularnego wdrukowania w założeniu jest elegancka w swej prostocie to równanie {1}, opisujące mechanizm procesu sorpcji w odciskach molekularnych polimeru, wskazuje na jego skomplikowany charakter. Niemniej jednak brak możliwości szacowania odpowiednich energii nie przeszkodził w ustaleniu pewnych zasad dotyczących tworzenia układów typu MIP. Są one warte komentarza [36, 37].

Stosując niekowalencyjną metodę wdrukowania molekularnego praktycznie każdy typ cząsteczki można użyć jako wzorca. W takim układzie liczba możliwych wiązań ograniczona jest chemiczną strukturą cząsteczki. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najlepszymi cząsteczkami stosowanymi jako wzorce, są te o podwyższonej sztywności i z jak najmniejszą ilością możliwych konformacji przestrzennych (małe ΔG_r) [38, 39, 40]. W ten sposób trwałe kompleksy monomery-wzorzec w mieszaninie prepolimeryzacyjnej prowadzą do powstania monoklonalnej populacji bardzo dokładnych odcisków w matrycy polimerowej (duże ΔG_p), które w istocie decydują o selektywności i specyficzności otrzymanego MIP-u.

Selektywność ta zwiększana jest liczbą i mocą oddziaływań pomiędzy komplementarnymi ugrupowaniami cząsteczek wzorca i monomerów. Zakładając optymalną koordynację kompleksu, położenie monomerów biorących udział w jego tworzeniu jest wówczas korzystniejsze energetycznie (małe ΔG_{t+r}) [41], a obniżanie temperatury mieszaniny reakcyjnej dodatkowo redukuje wpływ drgań cząsteczek w układzie (małe ΔG_{vib}).

Kolejną istotną sprawą jest odpowiednio usieciowany polimer. Jest ważne, aby powstałe wnęki nie zamieniały swojej budowy z upływem czasu. Polimer nie powinien być jednak pozbawiony określonej elastyczności, która zapewniałaby ułatwiony dostęp separowanych cząsteczek do wytworzonych odcisków, a także ich swobodnego wymywania.

Następną regułą odnoszącą się do syntezy MIP-ów jest zastrzeżenie, aby proces polimeryzacji prowadzić w rozpuszczalnikach takich samych, w jakich wykorzystywany będzie produkt finalny (efekt solwatacji odcisku). Niestety, zdarza się czasami, że dla niektórych wzorców takich jak peptydy, białka, oligonukleotydy czy też cukry, środowisko organicznego rozpuszczalnika może działać destrukcyjnie na związek. Wówczas dobrym rozwiązaniem jest użycie wody z uwzględnieniem wywołanego przez nią efektu hydrofobowego dla zrekompensowania słabnących w układzie oddziaływań elektrostatycznych (duże ΔG_h) [42, 43].

Reasumując przedstawione zagadnienia warto nadmienić, że w tak dalece zależnym i skomplikowanym układzie, jakim jest mieszanina polimeryzacyjna, wpływ kompleksu wzorzec-wzorzec na powstający polimer wciąż nie został poznany.

3.2.4. Pole zastosowań MIP

Mimo, że w ukazujących się publikacjach nadal dominują opisy metod otrzymywania różnego typu MIP-ów, to coraz częściej pojawiają się opracowania przeglądowe dotyczące reguł rządzących syntezą takich obiektów. Wśród nich należy wymienić prace Sellergrena [23, 44], Nichollsa i Anderssona [37, 45], Takeuchiego [46, 47], Piletskyego oraz Ulbrichta [36, 48]. W materiałach tych wskazuje się, iż polimery negatywowe mogą być stosowane nie tylko do otrzymywania selektywnych sorbentów chromatograficznych w postaci nieregularnie ukształtowanych ziaren [39, 46, 49-53], jednorodnych mikrosfer [54, 55, 56] czy nawet makroporowatego złoża monolitycznego [57, 58, 59], ale również do konstruowania czujników [60, 61, 62], złożów stosowanych w *solid phase extraction* [40, 63, 64], materiałów używanych do kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych czy nawet syntetycznych katalizatorów, zbliżonych swoją efektywnością do enzymów [28, 65, 66].

3.3. Membrany w separacji związków optycznie czynnych

Rozdział związków optycznie czynnych stanowi następny przykład wykorzystania procesów membranowych. W skali technicznej do rozdzielania enancjomerów wykorzystuje się konwencjonalne metody stereoselektywnej krystalizacji frakcyjnej czy też drogie techniki enzymatyczne [67]. Rozwój metod chromatograficznych z nowymi chiralnymi fazami stacjonarnymi był kolejnym etapem w dziedzinie rozdziału związków optycznie czynnych. Fazy stacjonarne zaproponowane przez Davankova [68] czy Pirkla [69] są obecnie podstawowym typem wypełnień stosowanych w analizach chromatograficznych. Modyfikacja złoża, polegająca na powlekanii go cienką warstwą białka to kolejny wariant rozwiązania tej kwestii [70].

Odmienne problemy stanęły przed inżynierami prowadzącymi badania nad skonstruowaniem membran potrafiących selektywnie przenosić określony związek. Swoistym prototypem takich układów były membrany z wbudowanymi na stałe przenośnikami odpowiednich substancji, gdzie transport odbywał się na zasadzie łańcucha osób gaszących pożar wiadrami wody. Rozdział enancjomerów aminokwasów w zmodyfikowanej membranie białkowej badanej przez Maruyamę niewątpliwie stanowi przykład takich rozwiązań [71]. Separował on enancjomery tyrozyny ze znaczną selektywnością, sięgającą nawet 7 i są to jedne z większych wartości stereoselektywności procesów membranowych opisanych w literaturze. Podobne przykłady można odnaleźć w pracy przeglądowej Ceynowy [72], w której opisana separacja enancjomerów może być również oparta na wykorzystaniu stereospecyficzności enzymów. W tym miejscu należałoby wspomnieć prace Sirkara, które szeroko poruszały atrakcyjny problem separacji związków optycznie czynnych [73, 74]. Były one jednymi z pierwszych opracowań, które dotyczyły membranowego rozdziału mieszaniny racemicznej aminokwasów. Do rozdziału izomerów leucyny wykorzystano kontaktor membranowy z oktanołem jako fazą membranową. Dalsze badania prowadzone były w kierunku poszukiwań nowych nośników chiralnych o selektywnych właściwościach wiążących [75, 76]. Warto też dodać, że największe nadzieje pokładano w tzw. ciekłych membranach unieruchomionych, w których nośniki chiralne stanowiły fazę membranową [77].

Niekiedy do transportowania wykorzystuje się takie membrany, w których nośnik przyłączony jest chemicznie do łańcuchów polimerowych, uniemożliwiając jego wymywanie z fazy membranowej. Przykładem mogą być układy ze zmodyfikowaną β -cyklodekstryną [78] czy też membrany zawierające immobilizowane etery koronowe [79].

Opisując starania znalezienia skutecznych rozwiązań, pozwalających na efektywną separację membranową izomerów optycznych aminokwasów, dochodzi się do jednej z ciekawszych metod otrzymywana stereoselektywnych membran. Jak już wspomniano polegają one na wdrukowaniu w nie określonych cech substancji, na którą chce się uczulić membranę, wywołując tym samym tzw. indukowaną pamięć. Idea tworzenia takich membran wywodzi się z prac Wulffa [22, 27, 28] i Mosbach [32, 49, 80], o których wspomniano w poprzednim rozdziale.

3.4. Membrany typu MIP – otrzymywanie, transport oraz właściwości separacyjne

Pierwsze badania nad *membranami z odciskami molekularnymi* (MIM) zostały przeprowadzone przez Piletskyego w 1990 r. [81]. Piętnaście lat, jakie upłynęły od tamtego wydarzenia, nie przyniosły rezultatów w postaci zwiększonej liczby prac poświęconych tematyce membran z odciskami molekularnymi. Warto jednak podkreślić, że z pozoru łatwa i ekonomiczna metoda otrzymywania polimerów typu MIP, w momencie wykorzystania jej do tworzenia polimerowych membran z odciskami molekularnymi dostarcza wciąż mało spektakularnych wyników, nie wyłączając także problemów związanych z badaniem takich obiektów. Należy mieć jednak nadzieję, że tendencja ta ulegnie wkrótce zmianie.

3.4.1. Membrany tworzone przez polimeryzację *in situ*

Piletsky na podstawie przeprowadzonych badań wykazał, że membrany otrzymane przez polimeryzację *in situ* monomerów akrylowych w obecności wzorca monofosforanu adenozyiny posiadały selektywną przepuszczalność wobec tego związku [81]. Jednak pierwsze próby tworzenia membran typu MIP prowadziły do otrzymania układów o dość słabej wytrzymałości mechanicznej [82]. Znaczącą poprawę właściwości mechanicznych membran przyniosło zastosowanie oligomeru uretanoakrylowego. Pozwoliło to podnieść elastyczność i zwiększyć stabilność formowanych membran [83].

Porównywalne efekty do osiągnięć Piletskyego uzyskano w badaniach transportu różnych nukleozydów i nukleotydów przez membrany z odciskami molekularnymi otrzymywane z mieszaniny kwasu metakrylowego i dimetakrylanu glikolu etylenowego (MAA-EGDMA) [84]. Stwierdzono w nich, że mniejsza zawartość metanolu dawała wyższą selektywność materiału membranowego, sugerując tym samym, że tworzenie stabilniejszych kompleksów odcisk-wzorzec ma miejsce w mniej polarnych mediach.

Bardzo interesującym pomysłem było otrzymanie membrany z akrylanu merocyjaniny, monomeru funkcyjnego, o zdolnościach do zmian konformacyjnych [82]. Tworząc taką membranę równolegle wprowadzono w nią odciski molekularne tryptofanu. Selektywność membrany wobec tego rodzaju aminokwasu mogła być wymazana przez jej naświetlanie. W konsekwencji wywołana tym izomeryzacja grup

funkcyjnych rozlokowanych we wnętrzu odcisku, powodowała kasowanie indukowanej pamięci membrany.

Wspominając już wcześniej o zaawansowanych technologiach separacyjnych takich jak odwrócona osmoza, nanofiltracja, perwaporacja czy absorpcja membranowa należałoby dodać, że prowadzone są one przy udziale membran kompozytowych, będących połączeniem odpowiedniej membrany porowatej (nośnika) z właściwie dostosowaną cienką warstwą polimeru o swoistej selektywności. Zamiarem tworzenia membran kompozytowych typu MIP miała być poprawa jej właściwości rozpoznawczych wobec odpowiednich struktur związków.

W pierwszych próbach mieszanina reagentów MAA-EGDMA, stanowiąca klasyczny układ monomerów do otrzymywania polimerów typu MIP, była poddawana polimeryzacji w porach cienkiego filtra szklanego [85]. Sprawdzano również zachowanie polipropylenowej membrany mikrofiltracyjnej po wprowadzeniu w nią i spolimeryzowaniu mieszaniny MAA-TRIM [86]. W obu przypadkach otrzymano symetryczne membrany, których wszystkie pory wypełnione były mezoporowatą strukturą polimeru typu MIP. Jednak użycie membrany polipropylenowej jako nośnika monolitycznej struktury MIM może powodować naruszenie jednorodności tej struktury i tworzenie się w niej licznych pęknięć. Niestety autorzy nie wspomnieli o takiej możliwości, choć jest ona z góry przewidywalna z uwagi na połączenie hydrofobowego polipropylenu z hydrofilowym kopolimerem. Ponadto propozycja autorów by zastosować bardziej hydrofobowe membrany teflonowe wydaje się nierozważna.

Monolityczne membrany kompozytowe, w których cienki film polimerowy z odciskami wzorca pełni funkcję selektywnej bariery, powinny dawać dość duże wartości strumieni. Przykładem mogą być odciskane teofiliną i kofeiną membrany z MAA-EGDMA oparte na nośniku glinowym [87]. W rezultacie dyfuzja związków przez tak otrzymane membrany miała wyższe osiągi w porównaniu z membranami zbudowanymi wyłącznie z usieciowanego polimeru [84].

3.4.2. Membrany tworzone przez inwersję faz

W literaturze najczęściej doniesień o tworzeniu membran zawierających odciski molekularne wiąże się z metodą inwersji faz zol-żel. W pierwszej pracy z wykorzystaniem tej techniki Yoshikawa użył roztworu żywicy polistyrenowej posiadającej boczne grupy peptydowe [88, 89, 90]. Po wylaniu i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymał on membranę, w której odpowiednio rozmieszczone hydrofobowe grupy peptydowe selektywnie rozpoznawały cząsteczki D-tryptofanu. Jednocześnie membrana ta dawała wyższy strumień tego aminokwasu niż jego formy L. Dzięki zastosowaniu metody suchej inwersji faz, przepuszczalność membrany była o wiele wyższa w porównaniu do membrany kontrolnej czy też takiej, otrzymanej klasyczną już metodą *in situ* [84]. W innym badaniu selektywność transportu skorelowano z właściwościami sorpcyjnymi membrany MIM. Jej enancjoselektywność mogła być zwiększana poprzez optymalizację stosunku ilościowego żywicy i wzorca, dzięki czemu współczynnik separacji formy D i L tryptofanu osiągnął wartość 5.9 [91]. Znane są również doniesienia o stosowaniu niechiralnych polimerów funkcyjnych m.in. karboksylanego polisulfonu, które również skutecznie wykorzystano do tworzenia tego typu membran [92].

Membrany afinitywne w swym działaniu przypominają sorbenty stosowane w chromatografii powinowactwa, dlatego szczególną uwagę należy zwrócić na membrany, które Kobayashi formował metodą mokrej inwersji faz. W tym celu zastosował on roztwory kopolimeru P[AN-co-AA], z których po wylaniu polimerowego filmu i zanurzeniu go w wytrącalniku otrzymywał asymetryczne membrany z porami o średnicy 20-50 nm w warstwie naskórkowej [93, 94]. Podczas filtracji przez tak otrzymaną membranę obserwowano bardzo znaczące różnice w sorpcji pomiędzy teofiliną, którą użyto jako wzorca, a kofeiną ze współczynnikiem selektywności dochodzącym nawet do 52. Stwierdzono również, że obniżanie temperatury wylewanego roztworu jak i łaźni z nierozpuszczalnikiem powodowało wzrost efektywności tworzenia kompleksów odcisk-cząsteczka oraz selektywności otrzymanych membran. Wszystkie te dane potwierdzają fakt, że struktura porowata membrany jak i odciski molekularne teofiliny są wynikiem tworzenia kompleksów pomiędzy wzorcem a grupami karboksylowymi w roztworze kopolimeru, które zostają unieruchomione w matrycy polimerowej w wyniku żelowania.

Podobne rezultaty osiągnął Trotta, który jako cząsteczki wzorce użył naringinu [95] flawonoidu, nadającego gorzki posmak sokom cytrusowym oraz chlorowodoru

tetracykliny [96] antybiotyku, stosowanego w infekcjach bakteryjnych. Membrany afinitywne z kopolimeru P[AN-co-AA], które formował Trotta, skutecznie rozpoznawały i zatrzymywały związki, na które je uwrażliwiono. Przeprowadzone analizy potwierdziły założenia, że molekularnie drukowane membrany za pomocą mokrej inwersji faz mogą być alternatywą w separacji różnego rodzaju substancji.

Obecnie wybór polimerów do wdrukowania molekularnego techniką inwersji faz został poszerzony o powszechnie stosowane materiały membranowe. Należy wymienić tu octan celulozy [97], poliamid i poliakrylonitryl [98] a także polisulfon [92]. Co więcej, dodatek poliglikolu etylenowego wprowadzony do roztworu polimeru, z którego formowano membrany, powodował wzrost jej przepuszczalności [99].

Godnym uwagi jest to, że większość afinitywnych membran typu MIP sprawnie działa w środowisku wodnym. Do utraty indukowanej pamięci membrany dochodzi wówczas, kiedy znajdzie się ona w środowisku organicznym, gdzie pęcznienie i przegrupowanie łańcuchów polimerowych powoduje wymazanie wdrukowanej informacji o kształcie i wielkości wzorca [100]. Jednakże, co warto podkreślić, metoda inwersji faz jest najbardziej odpowiednią do formowania membran o szczególnych właściwościach separacyjno-sorpcyjnych. Niestety, skorelowanie tych właściwości z techniką tworzenia MIM-ów jest skomplikowane. Warunki potrzebne do otrzymania optymalnych w działaniu odcisków molekularnych mogą być niezgodne z możliwością otrzymania właściwej struktury porowatej, która ma decydujący wpływ na zdolność separacyjną.

Problem połączenia ze sobą wysokiej wydajności odcisków molekularnych z porowatością, gwarantującą odpowiednią skuteczność separacji membranowej, wciąż pozostaje nierozwiązany.

3.4.3. Membrany szczepione powierzchniowo

Kompozytowe membrany z odciskami molekularnymi niekiedy otrzymuje się przez szczepienie powierzchniowe do porowatego podłoża. Pierwsza udana próba polegała na naniesieniu cienkiej warstwy typu MIP na membranę wykonaną ze światłoczułego materiału poli(akrylonitryl-dietyloamina-ditiokarbamoil-metylostyren) [101]. W wyniku aktywacji promieniowaniem UV na powierzchni membrany powstawały reaktywne ugrupowania, które po naniesieniu filmu z mieszaniny kwasu akrylowego, N,N'-metyleno-bis-akryloamidu i substancji wzorcowej teofiliny inicjowały szczepienie i polimeryzację reagentów. W ten sposób tworzono membranę, która wykazywała specyficzną wobec teofiliny.

Handlowa membrana polipropylenowa w wyniku modyfikacji powierzchniowej nie zmieniała swojej struktury morfologicznej [102], jak to miało miejsce w przypadku opisanym powyżej. Było to możliwe przez skrócenie aktywacji z 24 godzin do zaledwie kilku minut. Wdrukowanie powierzchniowe terbumetonu po spolimeryzowaniu mieszaniny kwasu akrylowego i dimetakrylanu glikolu etylenowego nadawało specyficzną cienkiej warstwie MIP, a tym samym całej membranę na ten rodzaj herbicydu. Terbumeton podczas filtracji przez membranę polipropylenową już wówczas zatrzymywany jest na niej skutecznie. Naniesienie filmu polimerowego z odciskami molekularnymi tego herbicydu powodowało, że strumienie osiągnęły bardzo duże wartości przy jednocześnie jeszcze wyższej skuteczności zatrzymywania filtrowanego terbumetonu. Autorzy spekulowali, że poprawę selektywności można było uzyskać przez optymalizację grubości nanoszonej warstwy MIP, a także redukcję niespecyficznego oddziaływań pomiędzy odciskiem molekularnym, a cząsteczką wzorca.

Drioli w swojej ostatniej pracy również wykorzystał membrany kompozytowe, tym razem do rozdziału enancjomerów naproksenu [103]. Membrany te oparte były na nośniku polipropylenowym, który po aktywacji zaszczipiano 4-winylopirydyną. Cienką warstwą monomeru, wypełniającą porowatą podporę, poddawano fotopolimeryzacji w obecności S-naproksenu jako odciskanego wzorca. Jak wykazały przeprowadzone badania otrzymana membrana typu MIP zdolna była do selektywnej separacji izomerów. Strumień S-naproksenu był wyższy w stosunku do jego antypody optycznej R-naproksenu, przy otrzymanym współczynniku selektywności 1.6. Selektywność rozdziału można zwiększyć, jak proponuje autor, przez zastosowanie kaskady membran, tworząc tym samym wielostopniową separację membranową.

Opierając się na dotychczasowych wynikach dotyczących analizy powierzchni i porowatości membrany [63, 102], przypuszcza się, że warstwa filmu z odciskami polimerowymi nie powinna przekraczać 10 nm [104]. Miałoby to zapewnić wyższą specyficzność i selektywność takiej warstwy.

3.5. Przyszłość membran MIP

Przedstawione przykłady membran z odciskami molekularnymi dowodzą, że obiekty te są potencjalnym narzędziem w szeroko stosowanych procesach separacyjnych. Pomimo tak interesujących możliwości ich zastosowania w tej chwili trudno przewidywać, jaka przyszłość czeka omawiane membrany. Trudno też jednoznacznie wskazać na ewentualny kierunek rozwoju MIM-ów jako materiałów separacyjno-sorpcyjnych. Nie należy jednak zapominać, że omawiane membrany pozostają nadal czymś nowym. Do tej pory spora część problemów, związanych z procesami separacyjnymi, nie może być rozwiązana z uwzględnieniem wykorzystania dostępnych na rynku membran polimerowych. Wciąż trwają poszukiwania nowych typów membran do rozdziału substancji toksycznych, chiralnych odmian leków czy też innych mieszanin związków aktywnych biologicznie, membran, które charakteryzowałyby się wysokim współczynnikiem selektywności.

Bazując na własnych doświadczeniach Ulbricht stawia jednak na wzrost znaczenia membran typu MIP. Przewidując możliwości aplikacyjne dla tego typu układów przypuszcza, że ich rozwój będzie uwzględniał tworzenie grupowo specyficznych membran poprzez wykazujące wysokie powinowactwo wobec poszczególnych związków, aż po reaktywne membrany obdarzone zdolnością przebudowy związków zaokludowanych wewnątrz odcisku [48]. Przypuszcza się, że właściwości selektywne membran zwiększone zostaną o zdolność do przekształcania się pod wpływem bodźca (promieniowania, pH, temperatury), bądź też przez dostosowanie się do panujących warunków procesowych. Już teraz dąży się, aby membrany oprócz wysokiej selektywności wyróżniały się odpowiednio dużym strumieniem oraz wytrzymałością mechaniczną. Zapewnić ma to bardzo wysoka porowatość z wąskim rozkładem wielkości porów, minimalną ich krętością oraz z uwzględnieniem jak najmniejszej grubości warstwy naskórkowej membrany. Istotnym wydaje się skonstruowanie membran MIP nie ulegających intensywnemu zapychaniu. Ponadto wiedząc, jakie membrany są przydatne w określonym procesie separacyjnym można, mając do dyspozycji jeden rodzaj membrany porowatej tak ją modyfikować, by nadać jej pożądane właściwości. Wspomniane już pomniejszanie wymiaru porów, zmiana charakteru powierzchniowego membran czy też tworzenie membran litych to tylko wybrane możliwości, jakie może dawać fizyczna modyfikacja powierzchni. W założeniu algorytm otrzymywania i stosowania membran litych sprowadza się do projektowania konkretnych procesów. Poszukiwane są materiały wytrzymałe mechanicznie, odporne chemicznie i nie pęczniejące w rozpuszczalnikach organicznych.

Warto nadmienić, że w ostatnim czasie zapanowała moda na nanotechnologie, również w zakresie separacji z użyciem wysoce specyficznych membran polimerowych bazujących na molekularnym rozpoznawaniu. Za przykład niech posłuży rozwijająca się dziedzina nanorurek membranowych z dobrze zdefiniowanymi porami o średnicy kilku nanometrów [105]. Przygotowanie takich membran oparto na kontrolowanym osadzaniu warstw złota na ściankach porów wewnątrz nośnika polimerowego, które dzięki temu w swym działaniu są zdolne do naśladowania biologicznych kanałów jonowych.

Utrzymywanie takich tendencji w rozwoju nowych typów membran, włączając omawiane w niniejszej pracy membrany z odciskami molekularnymi, zastanawiającym pozostaje czy budowanie ciągu selektywnych bramek jest technicznie wykonalne. Praca ta jak i kolejne lata pokażą czy możliwe jest tak organizować strukturę membrany, aby nadać jej pożądanych właściwości bądź też by móc nią swobodnie sterować już w trakcie samego procesu. Pokonanie istotnych barier tj. dokładne określenie procedur przygotowania membran z odciskami molekularnymi oraz poznanie kluczowych elementów, decydujących o ich selektywności, powinno w przyszłości umożliwić tworzenie selektywnych membran. Będą one mogły sprostać niekiedy dość wyrafinowanym potrzebom, przez co poszerzona zostanie oferta związana ze stosowaniem technologii membranowych.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Odczynniki

NAZWA	SKRÓT	PRODUCENT
aceton	-	Fluka
acetonitryl	MeCN	POCH
alkohol etylowy	EtOH	POCH
alkohol benzyłowy	BOH	POCH
akrylonitryl	AN	Fluka
2,2'-azo-bis-izobutyronitryl	AIBN	Fluka
azotan srebra	-	POCH
bibuła filtracyjna Filtrak 3W	-	Aldrich
chloroform	-	POCH
(+)-cynchonina	CIN	Fluka
(-)-cynchonidyna	CID	Fluka
dekstran 1500	T1.5	Polfa Kutno
dekstran 5000	T5	Polfa Kutno
dekstran 10000	T10	Polfa Kutno
dekstran 40000	T40	Pharmacia
dekstran 70000	T70	Pharmacia
dekstran 110000	T110	Pharmacia
dekstran 500000	T500	Pharmacia
dimetakrylan glikolu etylenowego	EGDMA	Aldrich
dimetakrylan glikolu trietylenowego	TEGDMA	Aldrich
dimetylosulfotlenek	DMSO	Fluka
glukoza	G	Polfa Kutno
kwasy akrylowy	AA	Fluka
kwasy azotowy	-	POCH
kwasy metakrylowy	MAA	Serva
kwasy octowy	AcOH	POCH
laurylosiarczan sodu	SLS	Fluka
nadsiarczan potasu	-	Aldrich
nadtlenek benzoilu	BP	POCH
nadtlenek wodoru	-	POCH
naftalen	NAF	POCH
N,N-dimetylo- <i>p</i> -toluidyna	DMPT	Aldrich

NAZWA	SKRÓT	PRODUCENT
poliakrylonitryl	PAN	Anilana Łódź
rodanek amonu	-	POCh
siarczan żelazowo-amonowy	-	-
tiol oktylu	-	Aldrich
toluen	-	POCh

4.2. Aparatura

APARAT	MODEL	PRODUCENT
celka dializacyjna	-	-
celka ultrafiltracyjna	8200	Amicon
lampa UV	Blak-Ray 500W	-
mikroskop skaningowy AFM	Auto Probe LS	Park Scientific Instruments
moduł filtracyjny	XX4304700	Millipore Corp.
pompa perystaltyczna	7016-20	Masterflex
spektrofotometr UV-Vis	V-530	Jasco
spektrofotometr UV-VIS	Lambda 15	Perkin-Elmer
spektrofotometr FT-IR	1710	Perkin-Elmer
wiskozymetr	Ubbelohde'a	-
waga	CP225D	Sartorius
zestaw do destylacji	V-805, R-205, B-490	Büchi

UKŁAD CHROMATOGRAFICZNY:

KOMPONENT	MODEL	PRODUCENT
pompa	LC-6A	Schimadzu
dozownik	7725 z pętlą 20 µl	Rheodyne
integrator	ChromApex 3.0	Data Apex
detektor UV	LCD 2082	Ecom
detektor refraktometryczny	RIDK-102	Laboratorni Pstroje Praha
kolumna szklana	3 x 150 mm	Tessek Ltd. Praha
strzykawka chromatograficzna	GASTIGHT # 1710 100 µl	Hamilton
termostat	LCO 100	Ecom

4.3. Tworzenie kompleksów wzorzec-monomery

Zdolność samotworzenia się kompleksów wzorzec-monomery w mieszaninie prepolimeryzacyjnej do syntezy materiałów z odciskami molekularnymi oceniono dwoma metodami. Były to miareczkowanie roztworu wzorca monomerem funkcyjnym oraz komputerowe modelowanie kompleksów.

Przeprowadzenie tych doświadczeń miało przyczynić się do poznania oddziaływań międzycząsteczkowych w kompleksie odcisk-cząsteczka, zlokalizowanym w matrycy polimerowej sorbentów oraz membran typu MIP, omawianych w dalszej części pracy.

4.3.1. Miareczkowanie

2 ml roztworu CIN w chloroformie o stężeniu 100 μ M miareczkowano kwasem metakrylowym w 20°C. Roztwór był równoważony przez następne 3 minuty po każdym dodaniu porcji kwasu, po czym odczytywano zmianę absorbancji miareczkowanego roztworu. Drugie miareczkowanie przeprowadzono używając dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA, środek sieciujący). Eksperymenty powtórzono trzykrotnie, a uzyskane wartości uśredniono.

W widmach UV-VIS obu alkaloidów jedno z maksimów absorpcji przypada przy $\lambda=314$ nm (Jasco V-530), dlatego też pomiary spektrofotometryczne wykonywano przy tej długości światła.

4.3.2. Modelowanie oddziaływań

Modelowanie oddziaływań w kompleksach wzorzec-monomery wykonano we Wrocławskim Centrum Sercowo-Superkomputerowym w Politechnice Wrocławskiej. Do obliczeń wykorzystano zestaw programów kwantowo-mechanicznych GAUSSIAN 2003, z uwzględnieniem metody funkcjonałów gęstości elektronowej B3LYP (DFT) oraz bazy 3-21G.

4.4. Złoża chromatograficzne zawierające odciski molekularne

4.4.1. Przygotowanie wypełnień chromatograficznych

Badania nad membranami rozpoczęto od otrzymania sorbentów polimerowych z odciskami molekularnymi. W tworzeniu membran monolitycznych wykorzystano bowiem doświadczenia z syntezy i charakterystyki sorbentów monolitycznych.

Syntezę złoża chromatograficznego przeprowadzono według następującej procedury: do mieszaniny reagentów kwasu metakrylowego (MAA) i dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA) dodano odpowiedniego środka porogennego (chloroform), wzorzec cynchoninę (CIN) o stężeniu 0.6, 3.6 i 9.6 %wg względem monomerów oraz inicjator (AIBN, 0.9 %wg). Z mieszaniny usunięto tlen przez przepuszczanie przez nią argonu (5 min), a następnie przeprowadzono polimeryzację w UV (360 nm), w 8°C i w czasie 10.5 godzin. Po polimeryzacji otrzymane monolityczne bloki zostały skruszone w młynku, przesiane przez sito (60 mesh) i zalane porcją etanolu. Złoża kontrolne, bez CIN, przygotowano w identyczny sposób. Składy mieszanin reakcyjnych do syntezy wypełnień chromatograficznych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Składy mieszanin reakcyjnych użytych w syntezie złożów chromatograficznych

POLIMER	ŚRODEK SIECIUJĄCY EGDMA		MONOMER FUNKCYJNY MAA		EGDMA MAA	WZORZEC CIN		POROFOR Chloroform
	ml	mmol	ml	mmol	v/v	mmol	%wg*	ml
E i 1.0	5.0	26.5	-	-	100:0	-	-	5.0
E ii 1.0	5.0	26.5	-	-	100:0	0.11	0.25	5.0
E iii 1.0	5.0	26.5	-	-	100:0	0.64	1.46	5.0
E iv 1.0	5.0	26.5	-	-	100:0	1.70	3.80	5.0
E i 0.9	4.5	23.9	0.5	5.9	90:10	-	-	5.0
E ii 0.9	4.5	23.9	0.5	5.9	90:10	0.11	0.25	5.0
E iii 0.9	4.5	23.9	0.5	5.9	90:10	0.64	1.46	5.0
E iv 0.9	4.5	23.9	0.5	5.9	90:10	1.70	3.80	5.0
E i 0.8	4.0	21.2	1.0	11.8	80:20	-	-	5.0
E ii 0.8	4.0	21.2	1.0	11.8	80:20	0.11	0.25	5.0
E iii 0.8	4.0	21.2	1.0	11.8	80:20	0.64	1.46	5.0
E iv 0.8	4.0	21.2	1.0	11.8	80:20	1.70	3.80	5.0
E i 0.75	3.75	19.9	1.25	14.75	75:25	-	-	5.0
E iii 0.75	3.75	19.9	1.25	14.75	75:25	0.64	1.46	5.0
E i 0.7	3.5	18.6	1.5	17.7	70:30	-	-	5.0
E iii 0.7	3.5	18.6	1.5	17.7	70:30	0.64	1.46	5.0

* stężenie wzorca w układzie

4.4.2. Usuwanie wzorca

W otrzymanych sorbentach interesuje nas efekt odcisku pozostawionego przez cząsteczkę wzorca tzw. indukowana pamięć matrycy polimerowej. W celu usunięcia cząsteczek wzorca z układu, a tym samym zapewnienia skuteczności działania otrzymanych źróz chromatograficznych poddano je kilkudniowej ekstrakcji roztworem etanolu i kwasu octowego EtOH÷AcOH 80÷20 v/v. Porcje ekstrahenta wymieniano do czasu, kiedy stężenie wzorca było niewykrywalne spektrofotometrycznie w 314 nm (Jasco V-530).

4.4.3. Charakterystyka źróz chromatograficznych

4.4.3.1. Oznaczanie zawartości chloru metoda Volharda

Dla sprawdzenia intensywności przenoszenia rosnącego łańcucha w polimeryzacji MAA i EGDMA na chloroform wykonano oznaczenie chloru metodą Volharda [106].

Niewielką ilość materiału (sorbentu polimerowego, 0.02 g) zawijano w bibułę i spalano w atmosferze tlenu nad 15 ml 3 % roztworu H₂O₂. Po pochłonięciu par (30 min.) do kolb zostało wprowadzone 10 ml 0.1 M AgNO₃, 2 ml HNO₃ oraz 2 ml siarczanu żelazowo-amonowego. Roztwór miareczkowano 0.1 M NH₄CNS aż do spodziewanej zamiany barwy na lekko różową. Zawartość chloru obliczono ze wzoru {2}:

$$\%Cl = \frac{35.5 (10 \cdot 0.1 M_{AgNO_3} - x \cdot 0.1 M_{NH_4CNS})}{m} \quad \{2\}$$

gdzie x jest objętością roztworu NH₄CNS zużytego na miareczkowanie, a m – masa sorbentu polimerowego.

4.4.3.2. Sprawność rozdziału - dobór fazy mobilnej

Sprawność rozdziału sorbentów polimerowych została określona w chromatografii cieczowym (p.4.2.). Początkowo zawieszony w etanolu sorbent wprowadzono do szklanej kolumny wmontowanej w termostat. W celu powodzenia separacji przetestowano kilka eluentów, których składy zestawiono w Tabeli 3. Podczas analizy chromatograficznej detektor nastawiony był na detekcję w 314 nm dla CIN i CID lub w 277 nm dla naftalenu (NAF). Eluent przepompowywano ze stałą prędkością 0.2 ml/min.

Tabela 3. Skład jakościowy i ilościowy stosowanych eluentów

ELUENT	SKŁAD JAKOŚCIOWY	SKŁAD ILOŚCIOWY v/v
E-1	acetonitryl	100
E-2	chloroform	100
E-3	chloroform÷ kwas octowy	99:1
E-4	acetonitryl÷ kwas octowy	95:5
E-5	chloroform÷ kwas octowy	93:7
E-6	chloroform÷ kwas octowy	97:3
E-7	chloroform÷ kwas octowy	98:2

4.4.3.3. Wyznaczanie współczynnika selektywności

Po wyborze odpowiedniej fazy mobilnej wykonano serię pomiarów czasu retencji (t_R) alkaloidów (3 mM w eluencie) podawanych na kolumnę. Pomiary zostały przeprowadzone w zakresie temperatur 22-35°C, każdorazowo pamiętając o odmyciu złoża do czasu ustalenia linii bazowej. Odnotowane czasy retencji analizowanych związków posłużyły następnie do wyznaczenia współczynników retencji obu alkaloidów k {3}:

$$k = \frac{t_R - t_O}{t_O} \quad \{3\}$$

gdzie t_R jest czasem retencji alkaloidu w złożu z odciskami molekularnymi cynchoniny, a t_O - czasem retencji alkaloidu w złożu kontrolnym.

Współczynnik selektywności α został zdefiniowany zgodnie ze wzorem {4} jako:

$$\alpha = \frac{k_{CIN}}{k_{CID}} \quad \{4\}$$

gdzie k_{CIN} jest współczynnikiem retencji cynchoniny, natomiast k_{CID} – cynchonidyny.

4.5. Membrany monolityczne z odciskami molekularnymi

4.5.1. Synteza membran

Badania membran monolitycznych, które były jednym z dwóch zasadniczych układów typu MIP omawianych w prezentowanej pracy, prowadzono na otrzymanych próbkach. Przygotowano je według następującej procedury: do mieszaniny reagentów kwasu metakrylowego (MAA) i dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA) lub trietylenowego (TEGDMA) dodano odpowiednich środków porogennych (toluenu i alkoholu benzyłowego), wzorzec cynchoninę lub cynchonidynę (CIN lub CID) o stężeniu 0.6 i 3.6 %wg względem monomerów oraz inicjator (BP, 2 %wg). Skład mieszanin reakcyjnych do syntezy monolitycznych membran zestawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Składy mieszanin reakcyjnych użytych w syntezie MIP

POLIMER	ŚRODEK SIECIUJĄCY				MONOMER FUNKCYJNY		ŚR.SIEC. MAA	WZORZEC		POROFOR	
	EGDMA		TEGDMA		MAA			CIN	CID	Toluen	BOH
	ml	mmol	ml	mmol	ml	mmol	v/v	mmol	mmol	ml	ml
EN0i*	5.0	26.5	-	-	-	-	100:0	-	-	2.5	2.5
EN0ii	5.0	26.5	-	-	-	-	100:0	0.11	-	2.5	2.5
EN0iii	5.0	26.5	-	-	-	-	100:0	0.64	-	2.5	2.5
EN2i*	4.0	21.2	-	-	1.0	11.8	80:20	-	-	2.5	2.5
EN2ii	4.0	21.2	-	-	1.0	11.8	80:20	0.11	-	2.5	2.5
EN2iii	4.0	21.2	-	-	1.0	11.8	80:20	0.64	-	2.5	2.5
ED0ii	5.0	26.5	-	-	-	-	100:0	-	0.11	2.5	2.5
ED0iii	5.0	26.5	-	-	-	-	100:0	-	0.64	2.5	2.5
ED2ii	4.0	21.2	-	-	1.0	11.8	80:20	-	0.11	2.5	2.5
ED2iii	4.0	21.2	-	-	1.0	11.8	80:20	-	0.64	2.5	2.5
TN0i*	-	-	5.0	19.1	-	-	100:0	-	-	2.5	2.5
TN0ii	-	-	5.0	19.1	-	-	100:0	0.11	-	2.5	2.5
TN0iii	-	-	5.0	19.1	-	-	100:0	0.64	-	2.5	2.5
TN2i*	-	-	4.0	15.3	1.0	11.8	80:20	-	-	2.5	2.5
TN2ii	-	-	4.0	15.3	1.0	11.8	80:20	0.11	-	2.5	2.5
TN2iii	-	-	4.0	15.3	1.0	11.8	80:20	0.64	-	2.5	2.5
TD0ii	-	-	5.0	19.1	-	-	100:0	-	0.11	2.5	2.5
TD0iii	-	-	5.0	19.1	-	-	100:0	-	0.64	2.5	2.5
TD2ii	-	-	4.0	15.3	1.0	11.8	80:20	-	0.11	2.5	2.5
TD2iii	-	-	4.0	15.3	1.0	11.8	80:20	-	0.64	2.5	2.5

* EN0i = ED0i; EN2i = ED2i; TN0i = TD0i; TN2i = TD2i

Z mieszaniny usuwano tlen przez przepuszczanie przez nią argonu (10 min). Potem wprowadzono do układu 20 µl aktywatora DMTP, a następnie szybko nasączało nim krążki z bibuły filtracyjnej Filtrak 3W. Kompozyt został umieszczony w pozycji pionowej w pojemniku zawierającym argon. Polimeryzację prowadzono w czasie 10-12 godzin w temperaturze pokojowej. Dla każdej serii pomiarów przygotowano po trzy membrany. Membrany kontrolne, bez wzorca, przygotowano w identyczny sposób.

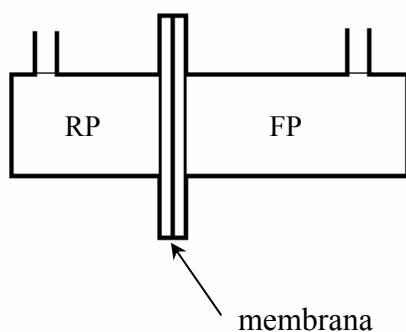
4.5.2. Usuwanie wzorca z membrany

Otrzymane membrany monolityczne z odciskami molekularnymi poddano kilkudniowemu myciu roztworem etanolu i kwasu octowego EtOH÷AcOH 80÷20 v/v, w celu usunięcia cząsteczek wzorca i nadania im swoistej efektywności. Porcje ekstrahenta wymieniano do czasu, kiedy stężenie wzorca było niewykrywalne spektrofotometrycznie w 314 nm (Jasco V-530).

4.5.3. Charakterystyka membran

4.5.3.1. Zdolność separacyjna

Zdolność separacyjna membran permselektywnych została określona w aparacie dializującym, schemat którego przedstawiono na Rys. 5. Membrana o powierzchni czynnej 4.9 cm² rozdzielała dwie komory aparatu o objętościach: 25 i 65 ml. Do większej (FP) wprowadzano etanolowy roztwór cynchoniny lub cynchonidyny o stężeniu 4.2 mM alkaloidu, do drugiej (RP) – etanol. Pomiar stężenia penetrantu wykonano metodą spektrofotometryczną (314 nm). Dla każdej z przygotowanych membran powtórzono pomiary, a uzyskane rezultaty uśredniono.



FP – komora fazy podającej o objętości 65 ml
RP – komora fazy odbierającej o objętości 25 ml

Rys. 5. Schemat szklanej celki dializacyjnej do badania zdolności separacyjnej membran litych.

4.5.3.2. Wyznaczanie współczynnika selektywności

Przyjęto, że w początkowym okresie procesu dyfuzji przyrost stężenia w czasie jest funkcją liniową. Zatem nachylenie zależności $A=f(t)$ jest miarą strumienia alkaloidu, którego wartość obliczono z równania {5}:

$$J = \frac{\Delta c V}{P \Delta t} \quad \{5\}$$

gdzie Δc to stężenie penetrantu, Δt - przyrost czasu, V - objętość fazy odbierającej, a P - powierzchnia czynna membrany.

Współczynnik stereoselektywności transportu membrany α został zdefiniowany jako {6}:

$$\alpha = \frac{J_A}{J_B} \quad \{6\}$$

gdzie J_A i J_B są wartościami strumieni alkaloidów.

4.6. Membrany afinitywne z odciskami molekularnymi

Drugim typem omawianych obiektów typu MIP były membrany afinitywne. Do ich formowania użyto kopolimerów akrylonitrylu i kwasu akrylowego, P[AN-co-AA], otrzymanych metodą polimeryzacji emulsyjnej [107, 108] oraz polimeryzacji w roztworze [93, 109]. Kopolimery syntezowano w laboratorium Wydziału Chemii Nieorganicznej, Fizycznej i Materiałowej Uniwersytetu w Turynie (Włochy).

4.6.1. Synteza kopolimeru poli(akrylonitryl-co-kwas akrylowy)

4.6.1.1. Kopolimeryzacja emulsyjna

Kopolimeryzację emulsyjną prowadzono w reaktorze szklanym o pojemności 500 cm³, zaopatrzonym w chłodnicę zwrotną, mieszadło i termometr. W 107 cm³ wody destylowanej rozpuszczono 0.56 g laurylosiarczanu sodu (SLS, stabilizator emulsji, 2 %wg). Z oczyszczonych substratów osobno została przygotowana mieszanina polimeryzacyjna składająca się z 23.0 g akrylonitrylu (AN) i 5.25 g kwasu akrylowego (AA). Następnie przelano ją do fazy wodnej, a pH roztworu wyrównano do 7 za pomocą wodorowęglanu sodu. Do mieszaniny dodano 0.14 g nadsiarczanu potasu (inicjator, 0.5 %wg) i usunięto tlen przez przepuszczanie przez mieszaninę argonu (10 min). Szybkość mieszadła została ustawiona na 100 obr/min. Temperaturę polimeryzacji zwiększono do 80°C i utrzymywano ją przez 6 godzin. Po zakończonej polimeryzacji emulsję soli sodowej kopolimeru P[AN-co-AA] pozostawiono do ostygnięcia, a następnie przelano do 0.1 M roztworu kwasu solnego. Wytrącony kopolimer został zebrany na sączku, przemyty dużą ilością wody, acetonu, toluenu oraz octanu etylu, po czym pozostawiono go do wysuszenia.

4.6.1.2. Kopolimeryzacja w roztworze

Kopolimeryzację w roztworze prowadzono w reaktorze szklanym jak w p.4.6.1.1. Z oczyszczonych substratów przygotowano osobno mieszaninę polimeryzacyjną składającą się z 24.6 g akrylonitrylu (AN), 5.6 g kwasu akrylowego (AA) oraz 0.15 g AIBN (inicjator, 0.5 %wg), a następnie przelano do 100 cm³ DMSO. Z mieszaniny usunięto tlen przez przepuszczenie przez nią azotu (5 min). Szybkość mieszadła została ustawiona na 120 obr/min. Polimeryzację prowadzono w temperaturze 80°C i utrzymywano ją przez 5 godzin. Schłodzoną mieszaninę poreakcyjną powoli wlewo do wody. Wytrącony kopolimer został przemyty w dużej ilości metanolu i pozostawiony do wysuszenia.

Polimeryzacja innych kopolimerów w obecności oktylmerkaptanu została przeprowadzona w analogiczny sposób, zgodnie z danymi w Tabeli 5.

Tabela 5. Zawartość oktylmerkaptanu w mieszaninie reakcyjnej

POLIMER	OKTYLOMERKAPTAN (μ l)
PAAN t	0
PAAN r2	50
PAAN r3	100
PAAN r4	200

4.6.1.3. Wiskozymetria

Pomiar lepkości roztworów kopolimeru P[AN-co-AA] wykonano w wiskozymetrze Ubbelohde'a w 30°C. Wartość granicznej liczby lepkościowej $[\eta]$, wyznaczona z zależności $\eta_{wt.}/C=f(C)$, gdzie C jest stężeniem polimeru (0.5 g/dl) w DMSO, pozwoliła na obliczenie ciężaru cząsteczkowego polimeru z równania Kuhna-Marka-Houwinka-Sakurady {7} [110]:

$$[\eta] = 2.865 \times 10^{-2} M_v^{0.768} \quad \{7\}$$

gdzie $[\eta]$ jest liczbą lepkościową, a M_v średnim lepkościowym ciężarem cząsteczkowym.

4.6.2. Formowanie membran

Wszystkie membrany formowano metodą mokrej inwersji faz [111, 112]. Roztwór kopolimeru (8-15 %wg) i wzorca (0.05-4 %wg) został przygotowany przez rozpuszczenie ich w DMSO (temp. pokojowa, 24 godziny), Tabela 6. Otrzymany roztwór wylewano na szklaną płytkę, a następnie formowano membranę za pomocą specjalnego noża o grubości szczeliny 0.5 mm. Płytkę zanurzano w wodnej łaźni koagulacyjnej w 20°C i pozostawiono w niej na 24 godziny. Membrany kontrolne, bez wzorca, przygotowano w ten sam sposób.

Tabela 6. Skład roztworów polimerowych użytych do formowania membran

NAZWA POLIMERU	RODZAJ POLIMERYZACJI	POLIMER %WG	WZORZEC CID %WG	MEMBRANA
PAN	-	15	-	homogeniczna, stabilna mechanicznie
PAN	-	15	0.4 ^a	- "-
PAAN r1	emulsyjna	8	-	homogeniczna, stabilna mechanicznie
PAAN r1	emulsyjna	8	0.05 ^a	- "-
PAAN r1	emulsyjna	8	0.4 ^a	- "-
PAAN r1	emulsyjna	8	2	- "-
PAAN r1	emulsyjna	8	4	- "-
PAAN t	w roztworze	8	-	homogeniczna, stabilna mechanicznie
PAAN t	w roztworze	8	2	- "-
PAAN t	w roztworze	8	4	- "-
PAAN r3	w roztworze	8	-	homogeniczna, stabilna mechanicznie
PAAN r3	w roztworze	8	0.5	- "-
PAAN r3	w roztworze	8	1	heterogeniczna; wrażliwa na rozdarcie
PAAN r3	w roztworze	8	2	heterogeniczna; wrażliwa na rozdarcie
PAAN r4	w roztworze	8	-	homogeniczna, stabilna mechanicznie
PAAN r4	w roztworze	8	0.5	homogeniczna, wrażliwa na rozdarcie
PAAN r4	w roztworze	8	2	heterogeniczna, wrażliwa na rozdarcie
PAAN r4	w roztworze	11	-	homogeniczna, stabilna mechanicznie
PAAN r4	w roztworze	11	2	- "-
PAAN r4	w roztworze	11	4	- "-

PAN: poliakrylonitryl handlowy

PAAN: poli[akrylonitryl-co-kwas akrylowy]

PAAN t: polimer dzięki uprzejmości prof. F.Trotta

^a wzorcem CIN; grubość membrany 0.15 mm

4.6.3. Charakterystyka membran

4.6.3.1. Wyznaczanie średnich wielkości porów

W celu określenia porowatości membranę o powierzchni 28.7 cm² umieszczono w celce ultrafiltracyjnej (Amicon) i pod ciśnieniem 0.05 MPa przepuszczano przez nią serię roztworów dekstranów (2.5 mg/cm³) o ciężarach cząsteczkowych od 1.5 x 10³ do 5 x 10⁵, [113]. Współczynnik zatrzymania dekstranu (SR_r) na membranie zdefiniowano dalej jako {8}:

$$SR_r = [(C_o - C_p)/C_o] \quad \{8\}$$

gdzie stężenie dekstranu w retentacie (C_o) i permeacie (C_p) analizowano chromatograficznie (bezpośrednie połączenie dozownika z detektorem refraktometrycznym, p.4.2.) przy przepływnie wody 0.2 ml/min. Stężenie każdej próbki sprawdzono czterokrotnie.

Do wyznaczenia rozkładu średnich wielkości porów (PDD) posłużono się następnie zależnością {9}:

$$PDD(R) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(\ln R - \mu)^2}{2\sigma^2}\right] \quad \{9\}$$

gdzie R jest średnicą poru, natomiast μ i σ to odpowiednio średnia wielkość porów i wariancja (szerokość) rozkładu.

4.6.3.2. Mikroskopia AFM

Do obserwacji struktury morfologicznej membrany posłużono się mikroskopią AFM (Park Scientific Instrument Auto Probe LS).

4.6.3.3. Identyfikacja metodą spektroskopii IR

W celu identyfikacji zsyntezowanego kopolimeru P[AN-co-AA] oraz dla potwierdzenia obecności wzorca w matrycy polimerowej membrany po jej uformowaniu, a także faktu tworzenia się niekwalencyjnych oddziaływań pomiędzy odciskiem a wzorcem, wykonano serię widm IR cienkich membran polimerowych. Film polimerowy o grubości 0.015 mm wylewano z roztworu kopolimeru PAAN r1 (8 %wg) i wzorca CID (2 %wg) w DMSO. Płytkę szklaną z uformowaną cienką membraną wstawiono na 7 godzin do suszarki (70°C). Membranę kontrolną (bez wzorca) przygotowano w analogiczny sposób. Widma IR membran przed i po myciu roztworem ekstrahenta (EtOH÷AcOH 90÷10 v/v) wykonano w laboratorium Wydziału Chemii Nieorganicznej, Fizycznej i Materiałowej Uniwersytetu w Turynie za pomocą spektrofotometru IR Perkin-Elmer 1710 i z zastosowaniem programu Spectrum.

4.6.3.4. Usuwanie wzorca z membrany

W celu usunięcia cząsteczek wzorca membranę ultrafiltracyjną (p.4.6.2.) o powierzchni czynnej 13.85 cm² wstawiono w moduł filtracyjny (Millipore). Przemycanie odpowiednim roztworem (1 % kwas octowym w etanolu) czyniło membranę bardziej efektywną. Mycie prowadzono do momentu, kiedy stężenie wzorca w permeacie było niewykrywalne spektrofotometrycznie (314 nm, Perkin-Elmer Lambda 15).

4.6.3.5. Równoważenie membran

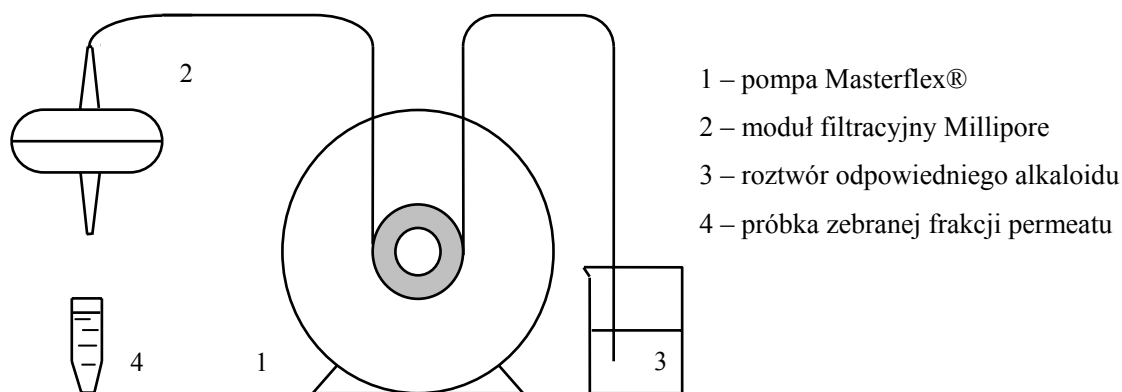
Szczególne właściwości sorpcyjno-separacyjne membran miały wykazać przeprowadzone pomiary. Pierwszy z nich polegał na równoważeniu membrany ultrafiltracyjnej w 15 cm³ wodnego roztworu CIN lub CID (14.5 μM) w 30°C. Zmianę stężenia alkaloidu mierzono spektrofotometrycznie (314 nm), korzystając z krzywej kalibracyjnej $A=f(C)$. Ilość alkaloidu związaną z membraną (μmol/g suchej membrany) obliczano według równania {10}:

$$[S] = \Sigma (C_0 - C_t)V/W \quad \{10\}$$

gdzie C_0 i C_t są stężeniami (μM) alkaloidu: początkowym i po czasie t , V jest objętością roztworu, a W masą suchej membrany. Pomiary powtórzono, a uzyskane rezultaty uśredniono.

4.6.3.6. Filtracja przez membrany

Drugie badanie polegało na przepuszczaniu przez membranę, umieszczoną w module filtracyjnym (Millipore), wodnego roztworu CID lub CIN (11.0 μM) z szybkością 0.5 ml/min, Rys. 6.



Rys. 6. Schemat aparatury do ultrafiltracji membranowej.

Zmianę stężenia alkaloidu w kolejno zbieranych frakcjach permeatu (1.5 ml) mierzono spektrofotometrycznie (314 nm), korzystając z krzywej kalibracyjnej $A=f(C)$. Ilość alkaloidu zatrzymanego w membranie ponownie obliczano z równania {10}. Każdy pomiar powtórzono, a rezultaty uśredniono. Badania przeprowadzono w laboratorium Wydziału Chemii Nieorganicznej, Fizycznej i Materiałowej Uniwersytetu w Turynie.

4.6.3.7. Wyznaczanie współczynników selektywności i wdrukowania

Ilości alkaloidów, przy całkowitym wysyceniu miejsc wiążących, posłużyły do wyznaczenia współczynników selektywności membran afinitywnych α zgodnie ze wzorem {11}:

$$\alpha = \frac{[S]_w}{[S]} \quad \{11\}$$

gdzie $[S]_w$ jest wartością sorpcji alkaloidu-wzorca zatrzymanego na membranie z jego odciskami, natomiast $[S]$ – wartością sorpcji antypody na tej samej membranie.

Wyraźne różnice pomiędzy membraną z odciskami i bez odcisków wyrażały współczynniki wdrukowania k_{if} (imprint factor) cząsteczki wzorca CIN (lub CID) wyznaczone według równania {12}:

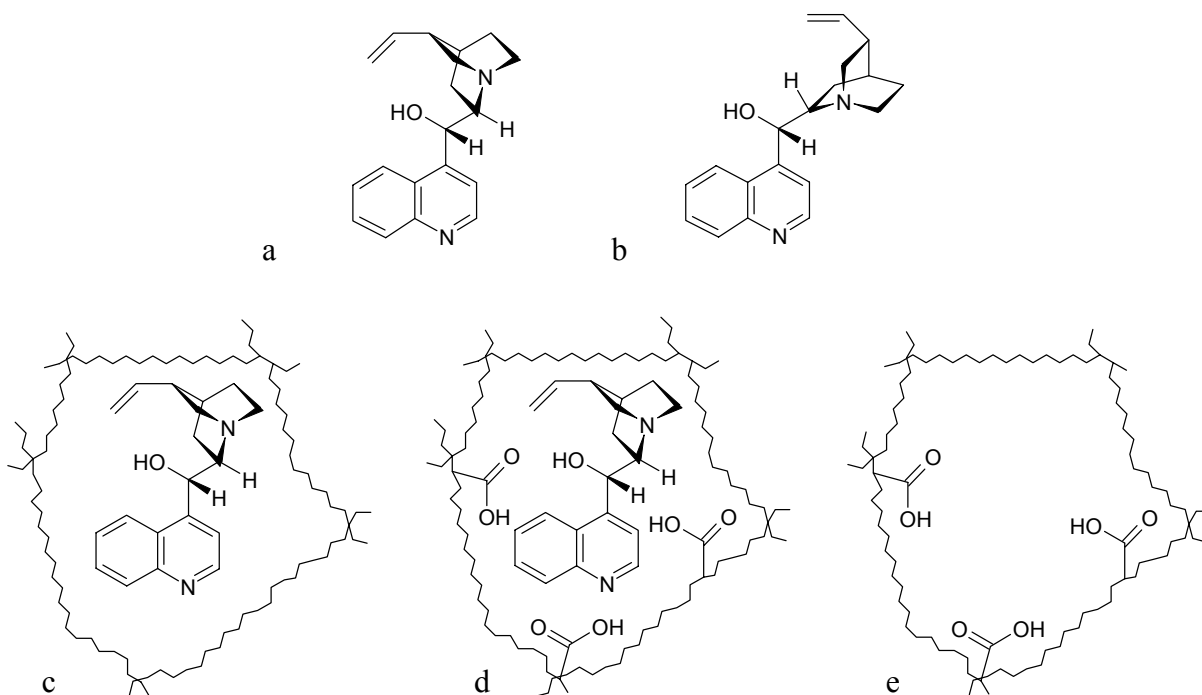
$$k_{if} = \frac{[S]_{z\ odciskami}}{[S]_{bez\ odcisków}} \quad \{12\}$$

gdzie $[S]_{z\ odciskami}$ i $[S]_{bez\ odcisków}$ są wartościami sorpcji alkaloidu odpowiednio na membranach z odciskami molekularnymi oraz bez odcisków podczas filtracji roztworu CIN (lub CID).

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

5.1. Skład kompleksu wzorzec-monomery i jego zdolność do samoorganizacji

Do kilku zasadniczych czynników, wymaganych przy tworzeniu MIP-ów należy wybór odpowiedniego wzorca, którego kształt odciskany jest w matrycy polimerowej. W niniejszej pracy do badań wykorzystano cynchoninę (CIN) i jej antypodę optyczną cynchonidynę (CID) [114, 115], Rys. 7. Należą one do alkaloidów z rodziny Cinchona i podobnie jak inni jej przedstawiciele są dobrze znane ze względu na ich szerokie spektrum właściwości biologicznych i leczniczych. Pozyskiwane z kory drzew chinowca czerwonosoczystego stosowane są głównie jako leki antymalaryczne. [116, 117]. Mają też znaczenie jako środki przeciwarytmiczne oraz blokery kanałów sodowych [118, 119]. W ostatnich latach stwierdzono, że stosowanie alkaloidów z rodziny Cinchona z lekami przeciwnowotworowymi zwiększa skuteczność działania tych drugich [120, 121].

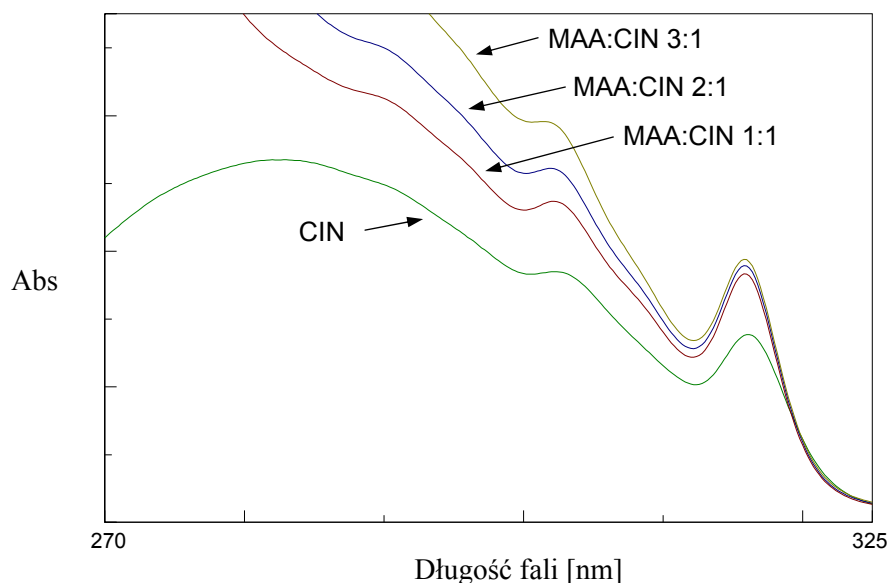


Rys. 7. Struktury (a) (+)-cynchoniny, (b) (-)-cynchonidyny, (c) schemat lokalizacji cząsteczki cynchoniny wewnątrz odcisku utworzonego ze środka sieciującego oraz (d) monomeru funkcyjnego i środka sieciującego, (e) pusty odcisk.

Ze względu na potencjalnie szeroki zakres aktywności biologicznej alkaloidów z rodzaju Cinchona [122], technika molekularnego wdrukowania cynchoniny czy też cynchonidyny może przyczynić się do zrozumienia licznych bioprocessów. Ich względnie sztywne struktury, wysoki stopień asymetrii i obecność grup funkcyjnych zdolnych do wzajemnego oddziaływania z grupami funkcyjnymi monomerów to zalety, dla których omawiane alkaloidy z powodzeniem wykorzystano do tworzenia odcisków molekularnych w matrycy polimerowej [123].

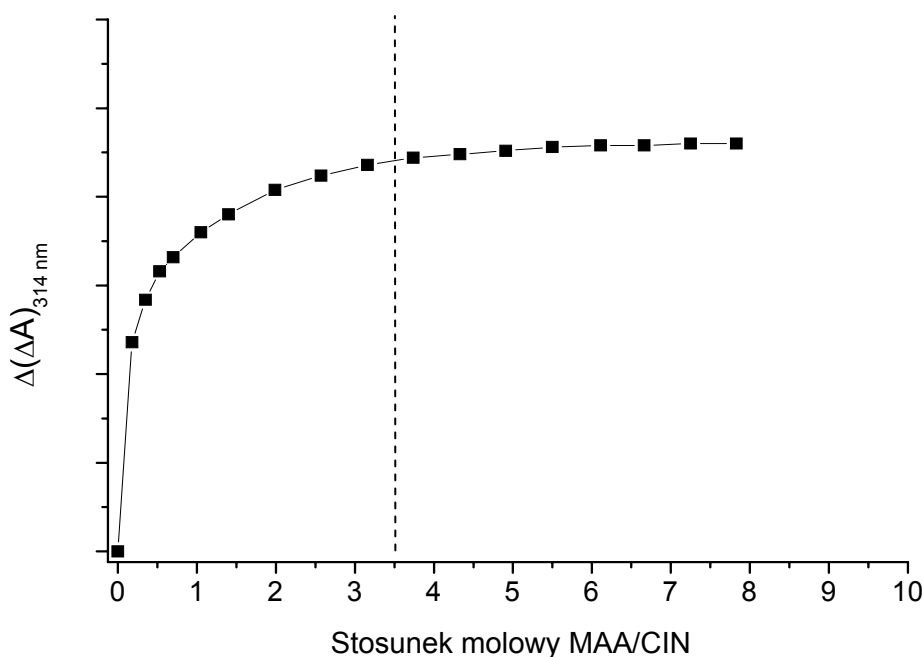
Na efektywność polimeru otrzymanego techniką molekularnego wdrukowania wpływa stechiometria wzorca i monomerów w mieszaninie reakcyjnej [38, 123]. To ona rządzi ilością i jakością odcisków w powstającym z tej mieszaniny polimerze. Ocena stereoselektywności MIP-ów wskazuje, że zbyt wysoki stosunek monomeru względem wzorca przyczynia się do powstania polimeru o niepożądanych właściwościach niespecyficznego wiązania. Spowodowane jest to nadmierną ilością grup polarnych przypadkowo rozmieszczonych w matrycy polimerowej. Zbyt niski stosunek daje polimery o niewystarczającej zdolności wyłapywania wzorca tj. polimery z małą liczbą odcisków oraz słabą selektywnością. Optymalny stosunek powinien dawać polimery, które cechują się odpowiednią selektywnością wiązania oraz stosunkowo wysoką specyficznością.

Podążając tym tropem postanowiono oszacować skład kompleksu MAA-CIN, który w wyniku polimeryzacji wbudowany zostaje w matrycę polimerową, skutkując tym samym utworzeniem kompleksu odcisk-wzorzec. Miareczkowanie kwasem metakrylowym roztworu CIN prowadziło do samotworzenia się kompleksów, a proces ich organizacji obserwowano spektrofotometrycznie, Rys. 8.



Rys. 8. Widma cynchoniny (CIN) wysycanej kwasem metakrylowym (MAA).

Naturalnie, im więcej cząsteczek MAA otaczało CIN tym więcej tworzyło się wiązań wodorowych, czego następstwem były zmiany w obserwowanych widmach. Zmiany te osiągały po pewnym czasie maksimum odpowiadające całkowitemu wysyceniu cynchoniny kwasem, inaczej mówiąc odpowiadały one powstaniu wszystkich możliwych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczką alkaloidu a cząsteczkami monomeru funkcyjnego. Jednak przeprowadzone pomiary nie wykazały jednoznacznie czy na obsadzenie jednej cząsteczki CIN potrzebne są trzy czy też cztery cząsteczki kwasu metakrylowego. Wynika to z Rys. 9., ilustrującego izotermę wysycenia alkaloidu kwasem. Począwszy od punktu, w którym stosunek molowy MAA-CIN wynosi 3.5:1 krzywa wypłaszcza się, a dalsze miareczkowanie kwasem nie wykazywało zmian w widmie absorpcyjnym ($\Delta(\Delta A) = \text{const}$ przy $\text{MAA/CIN} \rightarrow \infty$). Przeprowadzenie komputerowego modelowania kompleksu MAA-CIN miało potwierdzić wnioski otrzymane z izotermi wysycenia, a przede wszystkim sprecyzować dokładną liczbę cząsteczek kwasu metakrylowego, tworzącego kompleks z cynchoniną.



Rys. 9. Izoterma wysycenia CIN miareczkowanej MAA.

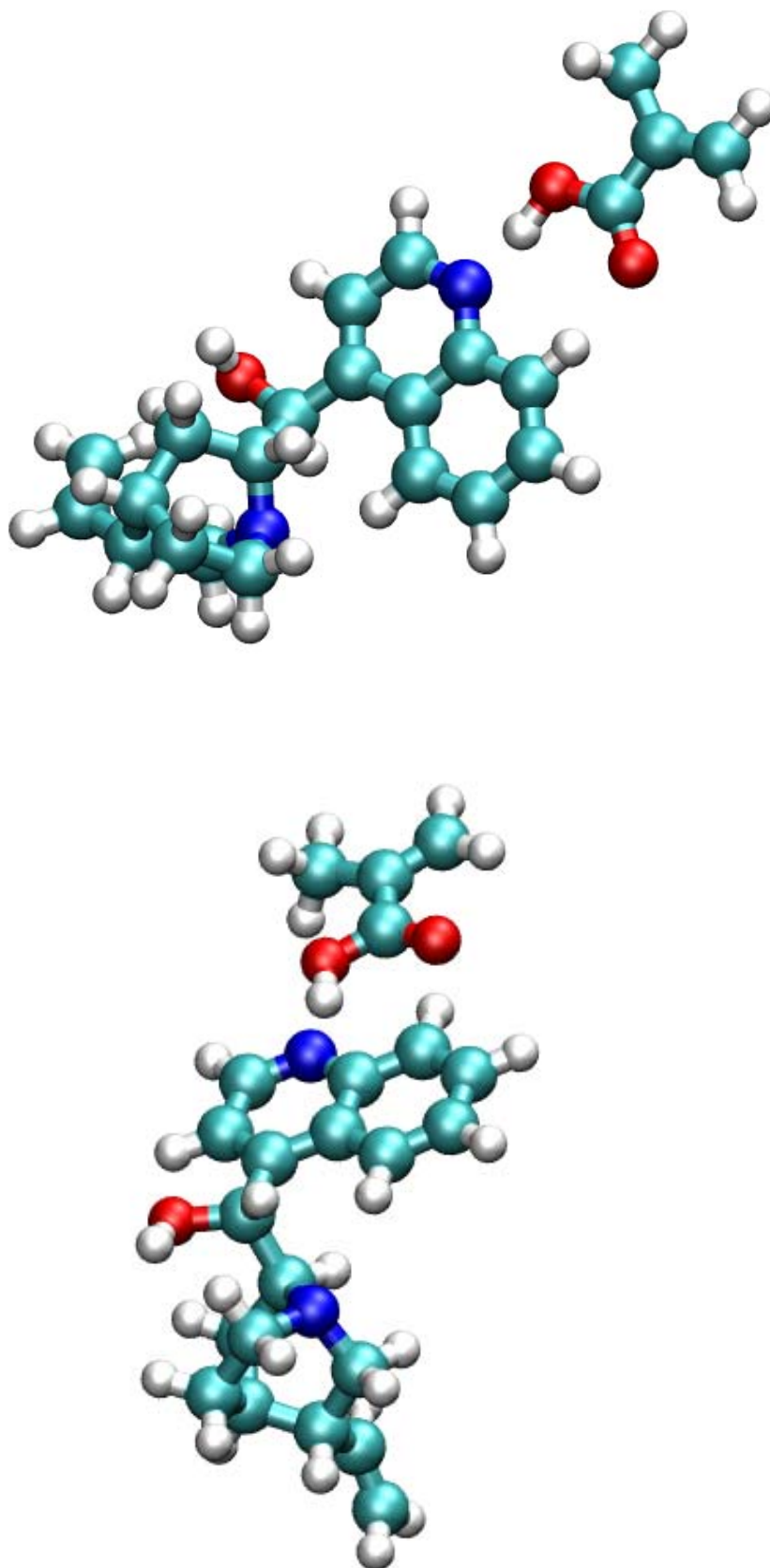
Ważnych informacji dostarczyło przeprowadzenie miareczkowania dimetakrylanem glikolu etylenowego roztworu CIN. Sprawdzone bowiem czy jego obecność w mieszaninie prepolimeryzacyjnej mogła zakłócać proces tworzenia kompleksów MAA-CIN, zważywszy również na możliwość istnienia wolnych cząsteczek kwasu, bądź też czy nie dochodziło

do tworzenia kompleksów EGDMA-CIN. Wykonane miareczkowanie nie ujawniło jednak zmian w widmie absorpcyjnym. Stąd oddziaływanie środka sieciującego z cząsteczką wzorca jest nieistotne i nie może wpływać na specyficzność powstałych w polimerze odcisków molekularnych.

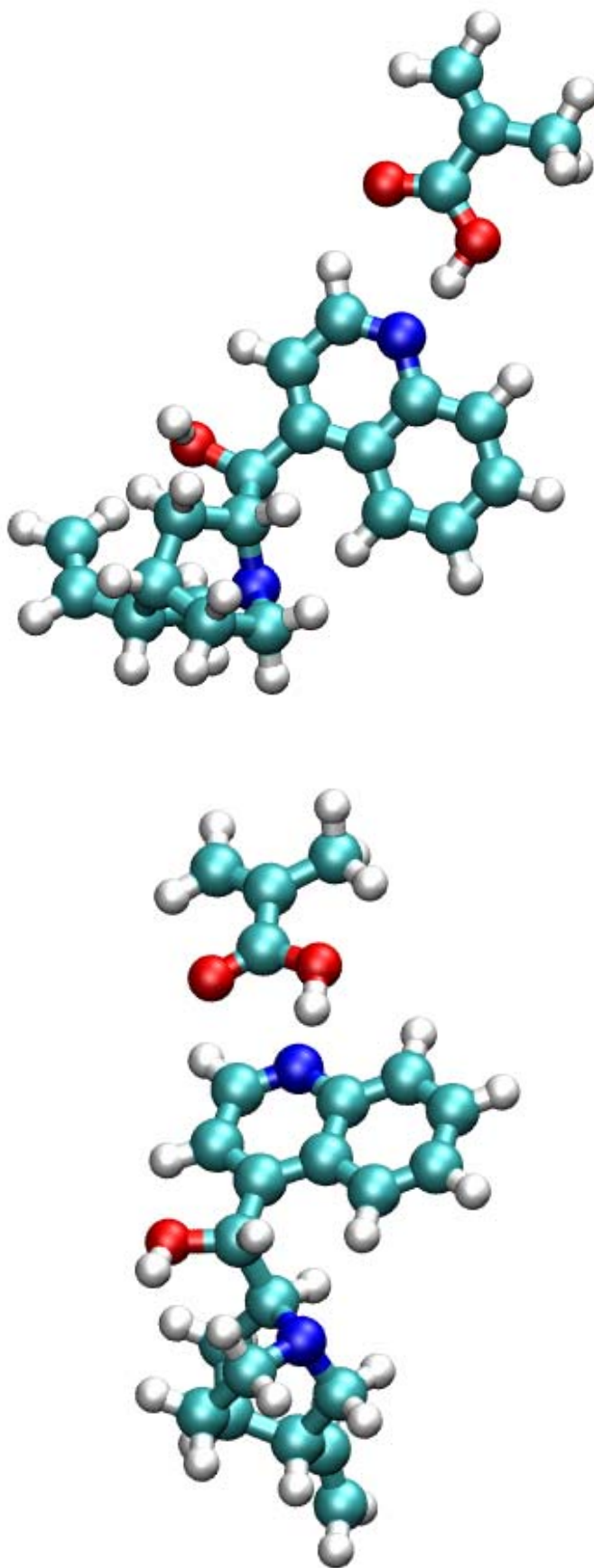
Do syntezy złożów chromatograficznych i membran monolitycznych, omawianych w niniejszej pracy, użyto mieszanin reakcyjnych, w których kwas metakrylowy został wzięty w nadmiarze w stosunku do ilości cynchoniny. Oba układy spełniały zatem warunek, by w obsadzeniu jednej cząsteczki cynchoniny brały udział co najmniej trzy cząsteczki kwasu metakrylowego, co wcześniej wykazano podczas miareczkowania. Właściwie dobrany stosunek molowy MAA i CIN potwierdziły obliczenia wykonane we WCSS, w których zastosowano kwantowo-mechaniczne modelowanie struktur metodą funkcjonałów gęstości elektronowej. Stwierdzono, że w samotworzającym się kompleksie wzorzec-monomery, kwas wnosi swój udział w ilości trzech cząsteczek na jedną cząsteczkę alkaloidu (MAA:CIN 3:1). Jednocześnie na podstawie przeprowadzonego modelowania (w warunkach próżni) dowiedziono, że istnieje siedem miejsc w cynchoninie oraz pięć w cynchonidynie, przy których dochodziło do oddziaływań wodorowych z kwasem metakrylowym, Rys. 10-15. Dalsze obliczenia umożliwiły wyznaczenie sumarycznych wartości energii wiązań wodorowych kompleksów MAA-CIN oraz MAA-CID. Dla przejrzystości prezentacji modele oddziaływań przedstawione są w niniejszej pracy w układach jeden na jeden: jedna cząsteczka alkaloidu na jedną cząsteczkę MAA. Oczywiście oddziaływania te współistnieją ze sobą a ich energie sumują się. Modele oszacowanych pod względem składu kompleksów MAA-CIN pozwalają poznać jak przestrzennie zlokalizowane są grupy funkcyjne monomeru, kiedy wzorzec związany wiązaniami wodorowymi z tymi grupami zostawia swój odcisk w matrycy polimerowej. W pokazanym na Rys. 16. przykładowym modelu kompleksu trzy cząsteczki kwasu otaczają CIN w miejscach najkorzystniejszych energetycznie oddziaływań wodorowych. Całkowita energia układu wynosi -63 kcal/mol. Należy jednak pamiętać, że liczba wszystkich możliwych kompleksów jest bardzo duża, a ich energia wiązań wodorowych może być wyższa bądź niższa od tej w zaprezentowanym przykładzie. Liczba potencjalnych kompleksów jest jednak ograniczana możliwościami sterycznego rozlokowania cząsteczek kwasu metakrylowego względem siebie i cząsteczką wzorca.

Jak dowodził Andersson większe stabilności kompleksów obserwowano w przypadkach kiedy w strukturze cząsteczki wzorca obecna była np. amina trzeciorzędowa [124]. Poddawana wdrukowaniu molekularnemu cynchonina zawiera w sobie taki układ. Im większa stabilność kompleksu wzorzec-monomery, wynikająca

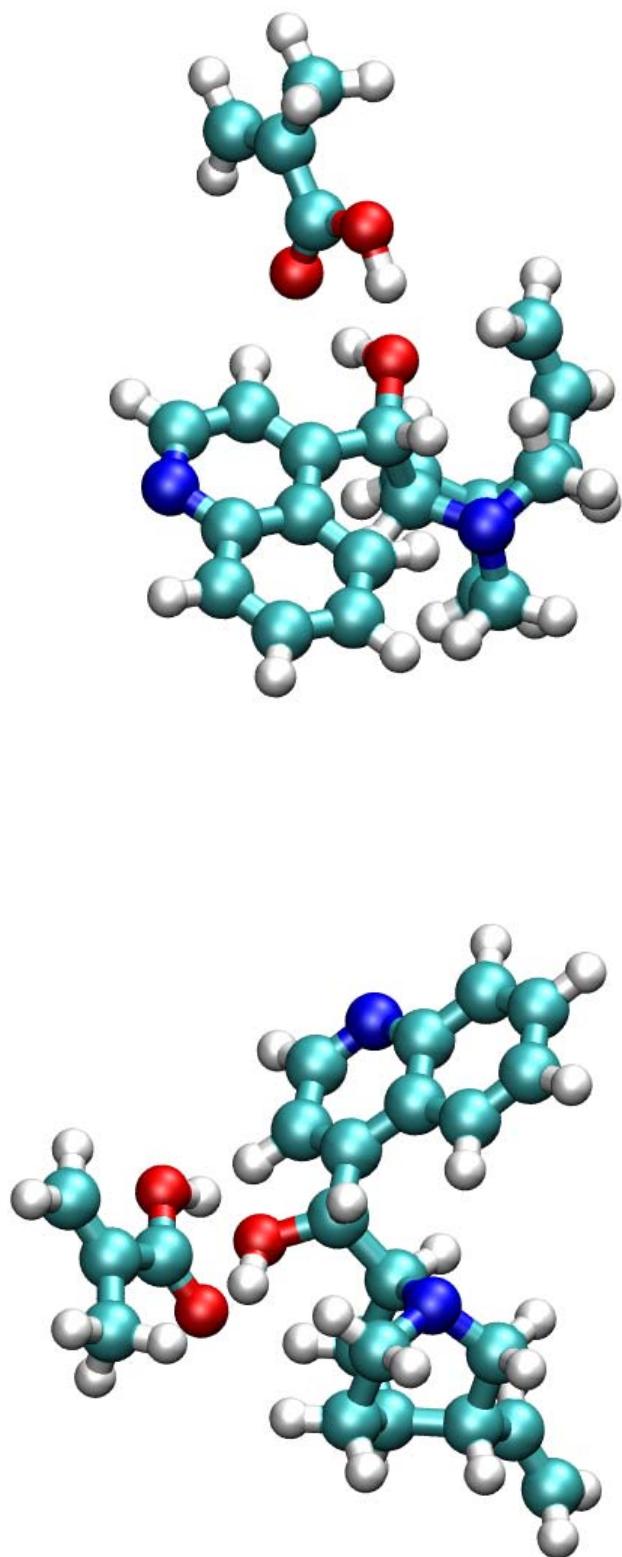
z oddziaływań wodorowych tym większa populacja dokładnych odcisków. Trwałość takiego kompleksu sprzyja zatem tworzeniu polimerów z większą selektywnością i wydajnością z uwagi na jakość i ilość odcisków molekularnych.



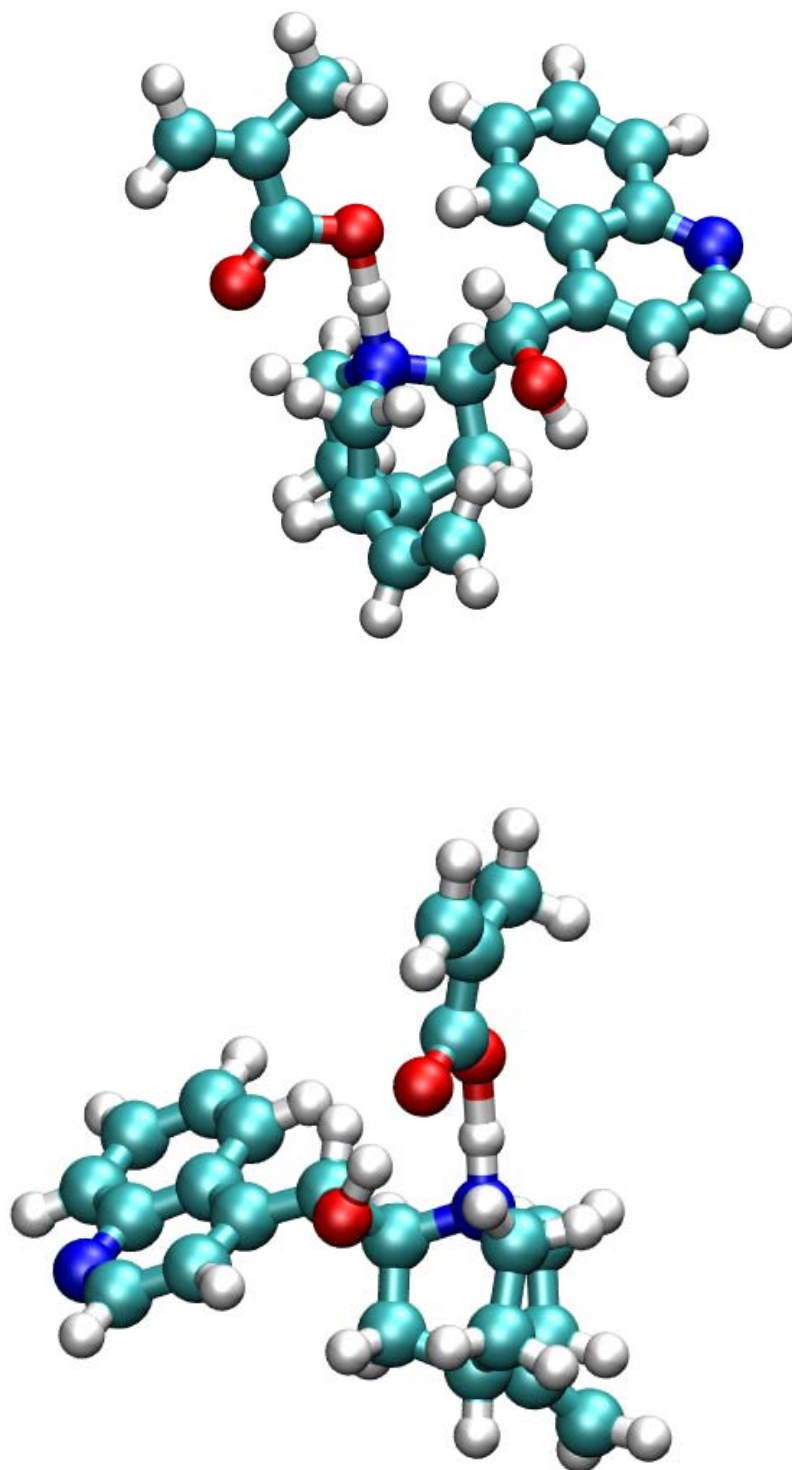
Rys. 10. Sumaryczne wartości energii oddziaływań wodorowych w kompleksach: MAA:CIN -18.54 kcal/mol (góra) oraz MAA:CID -19.04 kcal/mol (dół).



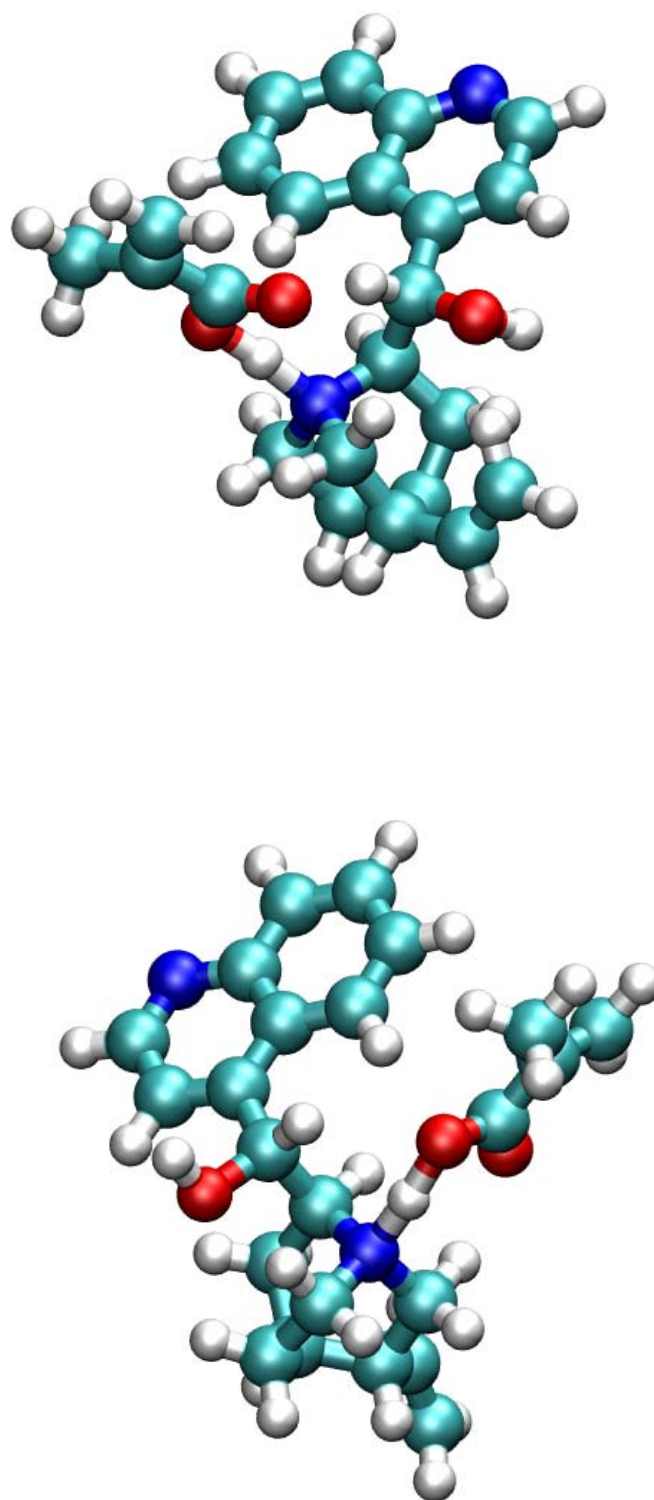
Rys. 11. Sumaryczne wartości energii oddziaływań wodorowych w kompleksach: MAA:CIN -19.29 kcal/mol (góra) oraz MAA:CID -19.85 kcal/mol (dół).



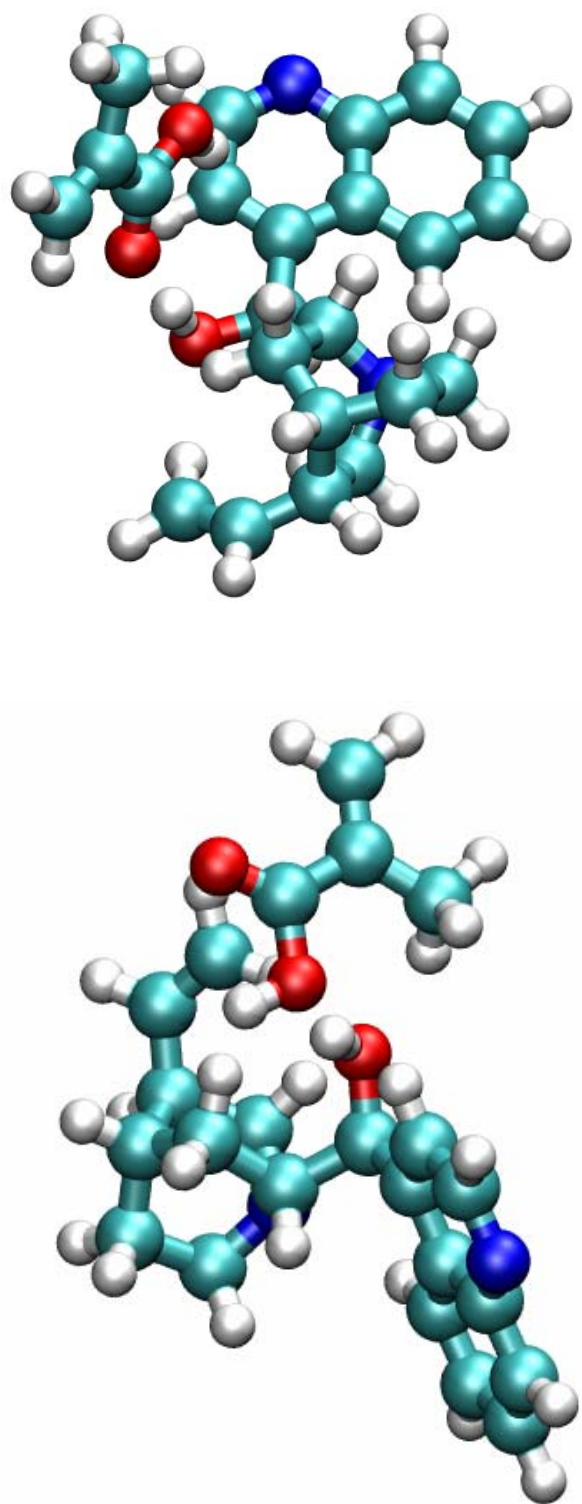
Rys. 12. Sumaryczne wartości energii oddziaływań wodorowych w kompleksach: MAA:CIN -12.63 kcal/mol (górze) oraz MAA:CID -16.09 kcal/mol (dół).



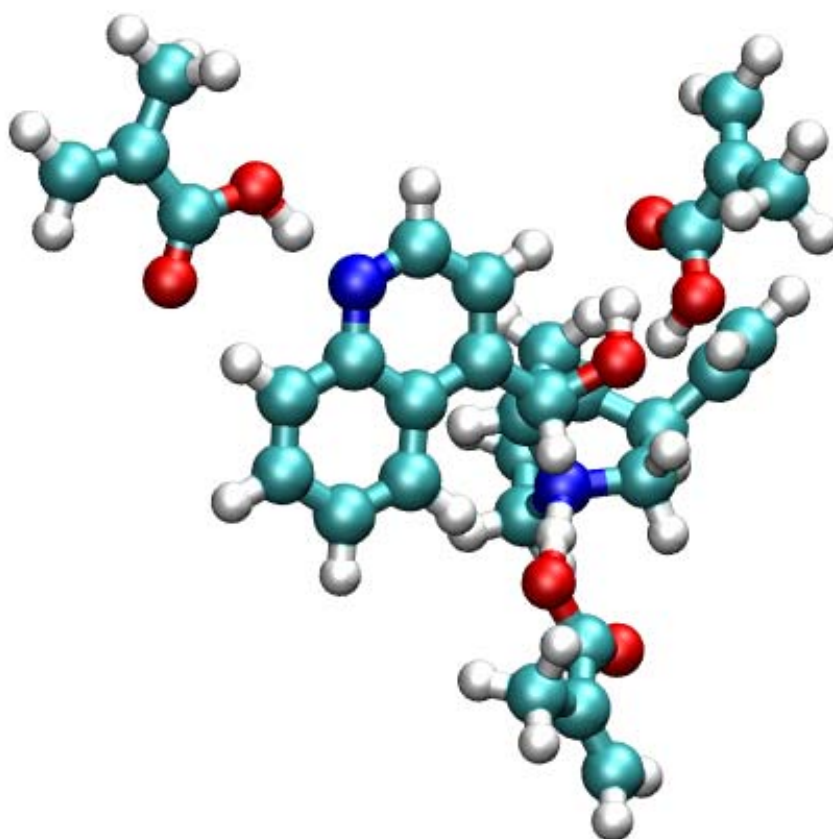
Rys. 13. Sumaryczne wartości energii oddziaływań wodorowych w kompleksach: MAA:CIN -31.75 kcal/mol (góra) oraz MAA:CID -69.44 kcal/mol (dół).



Rys. 14. Sumaryczne wartości energii oddziaływań wodorowych w kompleksach: MAA:CIN -24.01 kcal/mol (góra) oraz MAA:CID -34.02 kcal/mol (dół).



Rys. 15. Sumaryczne wartości energii oddziaływań wodorowych dla pozostałych kompleksów MAA:CIN: -7.81 kcal/mol (górze) oraz -4.06 kcal/mol (dół).

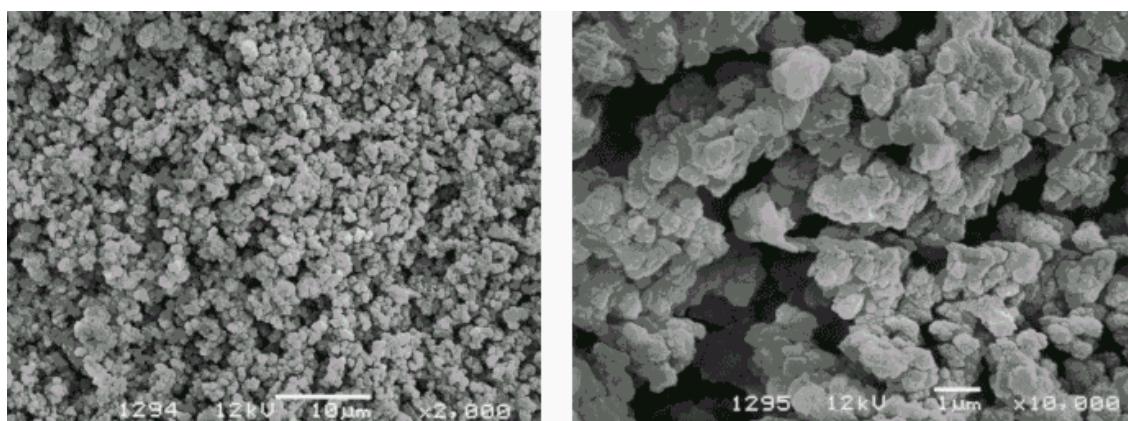


Rys. 16. Przykładowy model kompleksu MAA:CIN 3:1. Sumaryczna wartość energii oddziaływań wodorowych wynosi -63 kcal/mol.

5.2. Złoża chromatograficzne zawierające odciski molekularne

Metoda wdrukowania molekularnego znana jest od przeszło, a może zaledwie dwudziestu lat. Stosowane procesy separacyjne w większości opierają się na efekcie „przesiewania” molekularnego, gdzie o skuteczności zjawiska decyduje zarówno kształt i wielkość cząsteczek, jak i ich oddziaływania z układem separującym. Nowa technika MI przyczyniła się do stworzenia takich obiektów polimerowych, w których czynnikiem odpowiedzialnym za rozdział związków jest powinowactwo substancji do jej odcisku „zamrożonego” w polimerze. Zaskakujący jest jednak rozkład ilościowy prac poświęconych polimerom z odciskami molekularnymi. Setki z nich dotyczą wypełnień chromatograficznych i czujników, natomiast membranom poświęcone są nieliczne. W 2001 roku, podejmując się wstępnych badań, znaleziono zaledwie kilka informacji o konstruowaniu membran z odciskami molekularnymi na bazie monolitów polimerowych. Właśnie taką metodą otrzymywany był jeden z dwóch typów membran omawianych w niniejszej pracy.

Badania nad membranami rozpoczęto jednak od otrzymania sorbentów polimerowych typu MIP. To z kolei umożliwiło przeniesienie pewnych pomysłów i doświadczeń, obejmujących otrzymywanie sorbentów, do syntezy membran monolitycznych z odciskami molekularnymi. Charakteryzowanie MIP-ów jako materiałów chromatograficznych, jak już wspomniano, jest obszernie dokumentowane w literaturze [39, 46, 49-59]. Wzmózione zainteresowanie nowym typem faz stacjonarnych, a mianowicie sorbentami monolitycznymi, ma swoje uzasadnienie w łatwości ich przygotowania, wyjątkowych właściwościach i wysokiej wydajności, w porównaniu np. z sorbentami do rozdziału biopolimerów [59]. Monolity to układy tworzące ciągłą porowatą fazę otrzymaną w jednym fragmencie. Zbudowane są z mikrostruktur typu aglomeratów lub włókien utworzonych z połączenia cząstek [58], Rys. 17.



Rys. 17. Struktura monolitu [125].

Przestrzenie między aglomeratami tworzą system makroporów, a puste przestrzenie wewnątrz aglomeratu - układ mezoporów. Wszystkie pory są wzajemnie połączone.

Z wielu układów polimerowych do otrzymywania MIP-ów, najczęściej stosowany jest kopolimer kwasu metakrylowego sieciowany dimetakrylanem glikolu etylenowego. Wybór MAA wynika z jego zdolności tworzenia wiązań wodorowych i oddziaływań jonowych z grupami funkcyjnymi wzorca. Jednocześnie wcześniejsze badania wykazały, że kopolimer zbudowany właśnie z monomerów MAA i EGDMA spełnia wymogi stawiane układom, w które efektywnie wprowadzać można odciski molekularne [126, 127], Rys. 7. Z tego powodu układ ten zastosowano w niniejszej pracy. Cynchoninę natomiast użyto jako wzorca. Skład analizowanych źródeł chromatograficznych typu MIP podano w Tabeli 7.

Tabela 7. Składy badanych źródeł chromatograficznych

SORBENT	WZORZEC CIN	STOSUNEK MONOMERÓW EGDMA÷MAA
	%wg*	v/v
E i 1.0	0	100:0
E ii 1.0	0.6	100:0
E iii 1.0	3.6	100:0
E iv 1.0	9.6	100:0
E i 0.9	0	90:10
E ii 0.9	0.6	90:10
E iii 0.9	3.6	90:10
E iv 0.9	9.6	90:10
E i 0.8	0	80:20
E ii 0.8	0.6	80:20
E iii 0.8	3.6	80:20
E iv 0.8	9.6	80:20
E i 0.75	0	75:25
E iii 0.75	3.6	75:25
E i 0.7	0	70:30
E iii 0.7	3.6	70:30

*stężenie wzorca względem monomerów

Przy zastosowaniu sorbentów polimerowych typu MIP do separacji izomerów optycznych, specjalną uwagę należy zwrócić na właściwy dobór warunków chromatografii. Skład eluentu wpływa na zdolność rozdziału np. na czas retencji składnika, przesuującego się w złożu chromatograficznym. Wynika to z faktu „manipulacji” energią oddziaływań między grupami funkcyjnymi sorbentu i sorbatu pod wpływem zmiany składu fazy mobilnej. Dotyczy to również miejsc biorących udział w separacji – odcisków molekularnych. Uzyskane wyniki badań separacji optycznie czynnych alkaloidów, cynchoniny i cynchonidyny, potwierdzają, że odpowiednio dobrane warunki procesu na równi z właściwościami samego sorbentu zapewniają wystąpienie efektu rozdziału. W Tabeli 8 przedstawiono skuteczność separacji w zależności od zastosowanego eluentu.

Tabela 8. Efekt rozdziału chromatograficznego w zależności od składu fazy mobilnej

ELUENT	SKŁAD JAKOŚCIOWY	SKŁAD ILOŚCIOWY v/v	EFEKT ROZDZIAŁU
E-1	acetonitryl	100	brak
E-2	chloroform	100	brak
E-3	chloroform÷kwas octowy	99:1	brak
E-4	acetonitryl÷kwas octowy	95:5	słaby
E-5	chloroform÷kwas octowy	93:7	słaby
E-6	chloroform÷kwas octowy	97:3	zadowalający
E-7	chloroform÷kwas octowy	98:2	zadowalający

We wstępnie przeprowadzonych badaniach z użyciem złoża E iii 0.8 oraz fazy mobilnej E-1, E-2 i E-3, na chromatogramie nie zarejestrowano sygnału wprowadzonej na kolumnę cynchoniny. Powodem takiego stanu może być złamanie jednej z reguł syntezy MIP-ów, gdy sorbent jest używany w innym środowisku (E-1) niż był otrzymany. Inna przyczyna może tkwić w nieobecności bądź zbyt małej ilości AcOH w fazie mobilnej E-2 i E-3. Słaby efekt rozdziału pojawił się przy zastosowaniu eluentów E-4 i E-5. W przypadku E-5 czasy retencji na złożu E iii 0.8 wynosiły 5.0 oraz 4.4 min odpowiednio dla CIN i CID (dane nie prezentowane w tabelach), podczas gdy przy stosowaniu tego samego złoża lecz z użyciem fazy mobilnej E-7 czasy retencji obu alkaloidów osiągnęły wartości 9.8 oraz 5.4 min. Dla eluentu E-5 różnica pomiędzy t_{CIN} i t_{CID} wynosi zatem 1.4 min, natomiast dla E-7 różnica ta osiągnęła wartość 4.4 min. Widoczna jest zatem poprawa sprawności separacji CIN – w pierwszym przypadku współczynnik

retencji k_{CIN} wyniósł 0.16, podczas gdy przy zastosowaniu fazy mobilnej E-7 już 1.28. Nie mniej jednak koniecznym wydaje się, by w przyszłości skład fazy mobilnej optymalizowany był dla każdego sorbentu z osobna.

Początkowo analizę chromatograficzną postanowiono prowadzić wspólnie dla obu enancjomerów CIN i CID, wprowadzając na kolumnę roztwór ich mieszaniny racemicznej. Powinno to powodować pojawienie się na chromatogramie dwóch pików, pierwszego (ostrego), pochodzącego od CID i drugiego (bardziej rozmytego) – od CIN, którą zastosowano jako wzorzec [39, 46]. Przeprowadzone pomiary wykazały, że w każdym przypadku otrzymano chromatogram z pojedynczym pikiem. Było to spowodowane nie tylko niezadawalającymi właściwościami sorpcyjno-separacyjnymi otrzymanych sorbentów monolitycznych czy nieodpowiednio napełnionymi kolumnami, ale również wysokim prawdopodobieństwem tworzenia się kompleksów CIN-CID, przez co polimer tracił zdolność rozpoznawania jednego izomeru optycznego. Analizę chromatograficzną przeprowadzono ponownie, lecz w nieco zmienionej formie. Na kolumny podawano osobno prawo- i lewoskrętny izomer. Uzyskane na chromatogramach pojedyncze piki CIN i CID różniły się czasem ich retencji. Potwierdziło to skuteczność rozdziału badanych sorbentów.

Problemów nie dostarczała również konieczność regeneracji wypełnień chromatograficznych. Po zakończonej analizie kolumnę każdorazowo regenerowano roztworem chloroform-kwas octowy 98:2 v/v do czasu ustalenia się linii bazowej, przywracając w ten sposób jej właściwości sorpcyjno-separacyjne.

Do standaryzowania przygotowanych kolumn, wypełnionych sorbentami, posłużono się naftalenem. Czas jego retencji zamykał się w przedziale 3.9-4.1 min. dla wszystkich kolumn. Przyjęto zatem, że badane kolumny są podobnie upakowane, a porowatość materiału nie zmienia się w nich zasadniczo. Jednocześnie zakładając, że oba alkaloidy posiadają dokładnie te same wymiary, oraz że interesuje nas efekt pozostawionego w matrycy prawidłowego odcisku, współczynnik retencji k zdefiniowano jako stosunek czasów retencji alkaloidu w złożu, posiadającym odciski CIN i w złożu kontrolnym, a całość pomniejszając o jeden. W literaturze stwierdza się, że jedynie niewielka frakcja odcisków jest wystarczająco selektywna [27]. Większość charakteryzuje się stosunkowo małym powinowactwem do rozdzielanych związków. Uważa się, że nie więcej niż 25 % grup funkcyjnych zostaje właściwie rozmieszczonych w odcisku i bierze udział w separacji. Reszta zostaje wbudowana w obszary niewiążące sorbentu lub też, znajdując się nawet na powierzchni wnęki, jest ustawiona w niewłaściwym kierunku. Dlatego w układzie MIP-sorbowana cząsteczka obserwuje się całe spektrum stałych wiązania K_w . Istnieją odciski doskonałe, mające K_w duże, odciski ze średnią wartością K_w oraz tło z małymi wartościami K_w .

Badania chromatograficzne wypełnień, prowadzone w dalszej części z zastosowaniem fazy mobilnej E-7, wykazały, że oba alkaloidy oddziałują z sorbentami w różny sposób. Zgodnie z założeniami, i co również potwierdziły badania z doбором eluentu, wymywanie CIN było opóźnione w porównaniu do jej antypody optycznej, CID. Jak ważną rolę odgrywa obecność grup funkcyjnych w układzie świadczyć może analiza sorbentów otrzymanych bez MAA. Żadne ze złóż E 1.0 w sposób selektywny nie zatrzymywało CIN. Tego faktu nie zmieniał brak jak i obecność cynchoniny podczas formowania omawianych złóż. To z kolei dowodzi, że odciski CIN w MIP-ie, rzeczywiście powstają, kiedy w procesie wdrukowania molekularnego biorą udział grupy karboksylowe MAA, współobecnego obok EGDMA w mieszaninie reakcyjnej. Obserwowano to dla sorbentów E 0.9 i E 0.8. Pozytywnym efektem zwiększania zawartości MAA w kopolimerze i stężenia odcisków w matrycy jest pojawianie się coraz większej liczby miejsc prawidłowo rozpoznających CIN, czego odzwierciedleniem są wyższe wartości współczynnika retencji, Tabela 9.

Tabela 9. Współczynniki retencji i enancjoselektywności w temperaturze 22°C

SORBENT		k_{CIN}	k_{CID}	α
E 1.0 EGDMA:MAA 100:0 V/V	ii (0.25%CIN)	0.03	0.03	1.0
	iii (1.46%CIN)	0.06	0.06	1.0
	iv (3.80%CIN)	0.08	0.06	1.2
E 0.9 EGDMA:MAA 90:10 V/V	ii (0.25%CIN)	0.06	0.01	6.0
	iii (1.46%CIN)	0.81	0.11	7.4
	iv (3.80%CIN)	0.0 ^a 0.23 ^{a, b}	0.0 ^a 0.11 ^{a, b}	- 2.1
E 0.8 EGDMA:MAA 80:20 V/V	ii (0.25%CIN)	0.79	0.19	4.2
	iii (1.46%CIN)	1.28	0.25	5.1
	iv (3.80%CIN)	0.07 ^a	0.07 ^a	1.0
E 0.75 EGDMA:MAA 75:25 V/V	iii (1.46%CIN)	-	-	-
E 0.7 EGDMA:MAA 70:30 V/V	iii (1.46%CIN)	-	-	-

^a faza mobilna CHCl₃:AcOH 99:1 (v/v)

^b roztwór 3mM w CHCl₃:AcOH 97:3 (v/v)

Ujawnia się jeszcze jedna szczególna cecha sorbentów otrzymanych z układów zawierających MAA – następuje bowiem wyraźny wzrost ich selektywności α , jednocześnie jego wartości są najwyższe dla sorbentów E 0.9. Przypadek E iii 0.9 sugerować może, że skład mieszaniny reakcyjnej jest optymalny do otrzymania sorbentu o najlepszych właściwościach separacyjnych.

Chloroform użyty w syntezie materiału chromatograficznego spełnia wymaganie narzucone w wyborze środka porogennego. Jego niepolarność pozwala na niwelowanie „zakłóceń” podczas tworzenia kompleksów MAA-CIN w mieszaninie prepolimeryzacyjnej, a jednocześnie przyczynia się do powstania odpowiedniej struktury porowatej polimeru. Analiza sorbentów E iii 0.9, E i 0.8, E ii 0.8, E iii 0.8 oraz E iv 0.8 na zawartość chloru wykazała znikomą obecność tego pierwiastka, poniżej 0.7 %wg. Chloroform charakteryzuje się zatem nikłą aktywnością w reakcjach przenoszenia łańcucha na rozpuszczalnik podczas polimeryzacji MAA i EGDMA. Jeśli nawet zawartość chloru w polimerze byłaby znacząca, nie odgrywałby większej roli w tworzeniu oddziaływań z alkaloidem we wnętrzu odcisku molekularnego. Nie pozwoliłyby na to korzystniejsze energetycznie wiązania wodorowe wzorca z grupami karboksylowymi merów MAA. Obliczenia przeprowadzone podczas modelowania kompleksów wykazały jednoznacznie, że wartość energii wiązania chlor-alkaloid nie przekracza -3 kcal/mol.

Na uwagę zasługuje fakt blokowania się kolumn podczas analiz chromatograficznych, kiedy wypełnieniem były sorbenty E iv 0.9 i E iv 0.8. Podczas ich polimeryzacji, przy wysokiej zawartości CIN, mogło dochodzić do przerywania rosnących łańcuchów kopolimeru przez cząsteczki alkaloidu, z uwagi na występujące w jego strukturze podwójne wiązanie. Powstała w ten sposób matryca polimerowa o zaburzonej strukturze sieci polimerowej nie poddawała się analizie. Blokowanie kolumn podczas przepływu eluentu może mieć również swą przyczynę w powstawaniu silnych oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi kwasu octowego fazy mobilnej a grupami sorbentów E iv 0.9 i E iv 0.8 wypełniających kolumny. Zmiana eluentu oraz roztworu podawanego na kolumnę nie wpłynęła jednak na efekt separacji i zniesienie zjawiska blokowania kolumn. Zwiększanie zawartości MAA powyżej 20 %v powodowało, że złożo stawało się mniej usieciowane. Kolumny wypełnione sorbentem E iii 0.75 i E iii 0.7 ulegały szybkiemu blokowaniu w trakcie prowadzonych analiz chromatograficznych. Jednocześnie zbyt duży stosunek ilości MAA do CIN w mieszaninie reakcyjnej powodować mógł dominację wolnych grup karboksylowych nad tymi, pozostającymi w odciskach molekularnych, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia niekorzystnej sorpcji niespecyficzej

cząsteczek cynchoniny. Dowodami potwierdzającymi słuszność powyższych przypuszczeń są przeprowadzone miareczkowanie i symulacje modeli kompleksów w układzie MAA-CIN. Wynika z nich, że istnieje optymalny stosunek MAA i CIN, przy którym powstający polimer będzie charakteryzował się selektywnością miejsc wiążących oraz odpowiednią specyficznością. Zbyt wysoki udział kwasu metakrylowego względem cynchoniny, z dużym prawdopodobieństwem, prowadzi do powstania niespecyficznego sorbentu.

Zdolność separacyjna MIP-ów rządzi się prawami termodynamicznymi, które usystematyzował Williams, podając je w postaci równania {1} (p.3.2.3.). Wynika z niego, że istnieje wiele czynników, które decydują o rozpoznawaniu przez MIP-y odpowiednich cząsteczek. Przede wszystkim jest to geometria odcisków [33] oraz właściwe rozmieszczenie grup funkcyjnych wewnątrz odcisku molekularnego [34]. Postać tego równania wskazuje na bardzo skomplikowany mechanizm procesu selektywnej sorpcji we wnękach molekularnych. Z przeprowadzonych w pracy badań wynika jasno, że sorbenty selektywnie zatrzymywały CIN. Z tego powodu dla sorbentów E iii 0.9 i E iii 0.8 postanowiono określić energię oddziaływań, prowadząc proces chromatograficzny w różnych temperaturach. Wcześniej o wpływie temperatury na separację związków w chiralnych fazach stacjonarnych próbował przekonać się Sellergren [128]. Stwierdził on, że wraz ze wzrostem temperatury retencja składnika malała. Tłumaczył to endotermicznym procesem osłabiania wiązań wodorowych, a wzmocnieniem znaczenia oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy odciskiem a zatrzymywaną w nim cząsteczką związku. W omawianej pracy rozpoznawanie CIN, przesuwej się w złożu, jest wywołane istnieniem oddziaływań wodorowych pomiędzy grupą karboksylową MAA, a ugrupowaniem hydroksylowym czy też atomami azotu w cząsteczce CIN. Przeprowadzenie testów, w trakcie których zwiększano temperaturę, przyniosło zaskakujące rezultaty. Okazało się, że zamiast oczekiwanego spadku retencji alkaloidu następował jej wzrost, co powodowało zwiększenie wartości współczynnika retencji k , Tabela 10. Selektywność sorbentów w 22°C wynosiła 7.4 i 5.1 odpowiednio dla E iii 0.9 oraz E iii 0.8. Wzrost temperatury o 4 stopnie przyczynił się do spadku współczynnika selektywności α do poziomu 3.4-3.5. W przypadku sorbentu E iii 0.9 dalszy wzrost temperatury powodował obniżenie się współczynnika do wartości 2.8, natomiast dla E iii 0.8 ustabilizował się na poziomie 3.6.

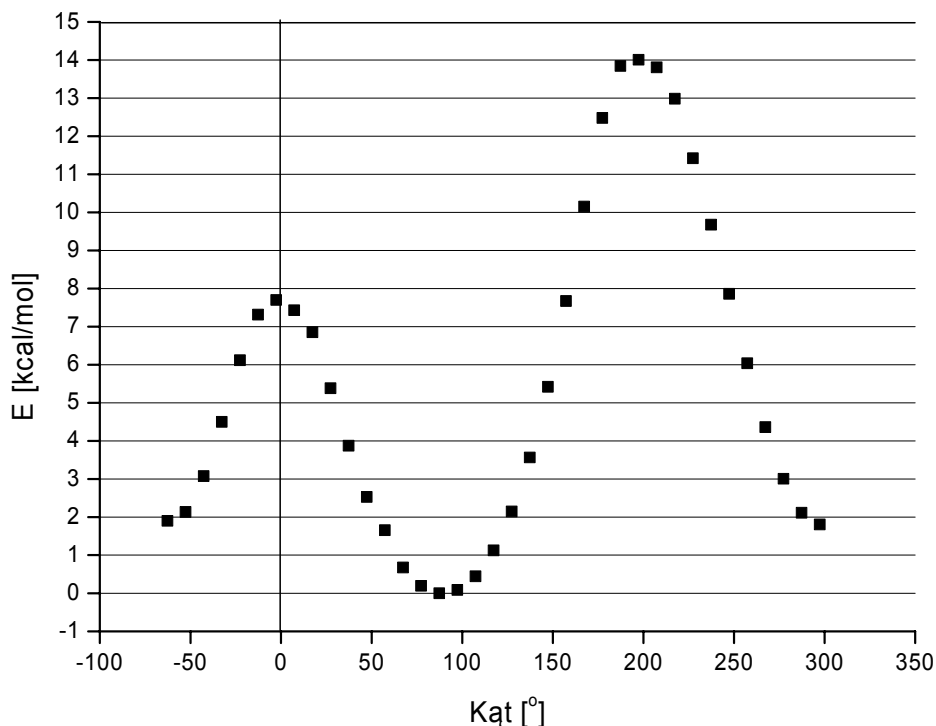
Tabela 10. Współczynniki retencji i enancjoselektywności w zakresie 22-35°C

SORBENT TEMP. °C	E iii 0.9			E iii 0.8		
	k _{CIN}	k _{CID}	α	k _{CIN}	k _{CID}	α
22	0.81	0.11	7.4	1.28	0.25	5.1
26	1.19	0.35	3.4	2.17	0.62	3.5
30	1.97	0.68	2.9	2.83	0.79	3.6
35	3.19	1.16	2.8	3.65	1.02	3.6

Wynik taki trudno jednoznacznie wyjaśnić, nie mniej jednak wydaje się, że do głosu dochodzą oddziaływania dyspersyjne. To pozwala zrozumieć, dlaczego pomimo wzrostu temperatury CIN zatrzymywana była w złożu dłużej. Oddziaływania dyspersyjne są główną częścią sił van der Waalsa. Źródłem pochodzenia sił dyspersyjnych jest wzajemna korelacja elektronów w oddziałujących cząsteczkach. Ciągła zmiana rozkładu (fluktuacja) ładunku powoduje powstawanie chwilowych momentów dipolowych, które mogą polaryzować sąsiadujące cząsteczki, co prowadzi do przyciągania innych cząsteczek. Warto odnotować, że oddziaływania dyspersyjne odgrywają dużą rolę w enzymach, które zawierają niepolarne, ale polaryzowalne grupy w tzw. kieszeniach. One to stanowią pułapkę dla niepolarnych lecz polaryzowalnych grup, jak fragmenty łańcuchów węglowodorowych, ale nie przyciągają cząsteczek polarnych jak woda. Posuwając się o daleko idące analogie, MIP-y w istocie rzeczy swoją budową i właściwościami przypominają enzymy, w których centrami katalitycznymi są odciski molekularne. Siły van der Waalsa nabierają znaczenia przy wiązaniu tylko wtedy, gdy wiele atomów substratu może równocześnie zbliżyć się do równie wielu atomów enzymu. Dlatego też w kompleksie odcisk-cząsteczka ich kształty muszą być komplementarne tak jak w przypadku enzym-substrat.

Drugą przyczyną, tłumaczącą dłuższe zatrzymywanie CIN na złożu, jest możliwość powstawania dodatkowych oddziaływań wodorowych. Na Rys. 14., przedstawiającym model kompleksu MAA-CIN, sumaryczna wartość energii wiązań N-H (silniejsze) oraz O-H, obliczona metodą funkcjonalów gęstości elektronowej, wynosi -24 kcal/mol. Przeprowadzona została symulacja, która dowiodła, że pod wpływem wzrostu temperatury

cząsteczka CIN może nieco zmienić swą konformację. Nie ma większych przeszkód sferycznych by grupa hydroksylowa, pochodząca od CIN, odwróciła się atomem wodoru w kierunku tlenu grupy karboksylowej MAA. Bariera energetyczna preferencyjnej lewostronnej rotacji grupy hydroksylowej to -5.8 kcal/mol (Rys. 18.), a sumaryczna energia utworzonych w ten sposób nowych silnych oddziaływań wodorowych osiąga wartość -70 kcal/mol.



Rys. 18. Wartości barier energetycznych rotacji grupy hydroksylowej CIN w kompleksie z MAA (Rys.14) w lewą stronę (korzystniejsza): -5.8 kcal/mol, oraz w prawą stronę: -14 kcal/mol.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdziły możliwość otrzymania sorbentów typu MIP, mogących skutecznie rozpoznawać właściwy enancjomer, którym odciskano matrycę polimerową. Odpowiednią skuteczność tego typu faz stacjonarnych osiągnąć można poprzez wybór stosownego poroforu, a także przez właściwy dobór składu ilościowego monomerów oraz optymalizację warunków procesu polimeryzacji. Nieobojętne na separację pozostają również skład fazy mobilnej oraz temperatura w trakcie prowadzonych analiz chromatograficznych.

5.3. Membrany monolityczne z odciskami molekularnymi

Spostrzeżenia i wnioski przedstawione w poprzednim rozdziale, obejmujące otrzymywanie i charakterystykę sorbentów polimerowych, pozwoliły podjąć pracę nad syntezą membran monolitycznych, do otrzymywania których wykorzystano niektóre z wcześniej omówionych układów.

Obecnie membrany z odciskami molekularnymi (MIM) tworzone są najczęściej metodami mokrej inwersji faz w obecności cząsteczek wzorca bądź też wdrukowania powierzchniowego tychże cząsteczek. Pomimo takiej tendencji oraz szcątkowych doniesień literaturowych omawiających membrany monolityczne przygotowano takie membrany i oceniono je pod względem selektywnego transportu izomerów z rodzaju Cinchona [129]. Pozornie prosta i tania metoda tworzenia takich membran dostarczyć może jednak pewnych problemów podczas ich badania. Stąd może wynikać fakt nikłego zainteresowania otrzymywaniem membran monolitycznych z odciskami molekularnymi.

W przenoszeniu substancji przez membrany monolityczne, jak podaje Sellergren, rządzą dwa mechanizmy selektywnego transportu [130]. Pierwszym jest transport wspomagany poprzez preferencyjną sorpcję i szybką dyfuzję cząsteczek wzorca. Drugim z kolei mechanizmem jest opóźniona permeacja wywołana powinowactwem odcisku do dyfundującej cząsteczki. Pierwszy przypadek został przebadany przez Dzgoeva i Haupta, którzy w porach membrany mikrofiltracyjnej polimeryzowali kopolimer MAA-TRIM w obecności L-tyrozyny jako wzorca [86]. Po odmyciu aminokwasu badali zjawisko transportu L- i D-tyrozyny. Zauważyli wyraźnie, że L-tyrozyna przemieszczała się szybciej przez tak fromowaną membranę niż jej antypoda optyczna.

Otrzymane w niniejszej pracy monolityczne membrany kompozytowe, które będą zdolne do rozdzielania mieszaniny izomerów optycznych cynchoniny CIN oraz cynchonidyny CID gwarantować miały wystarczająco duży strumień alkaloidu. Należy jednak pamiętać, że strumień transmembranowy zależy od wielkości dyfundującej cząsteczki oraz jej stężenia w fazie podającej, wpływając tym samym na selektywność membrany (wyższy współczynnik selektywności przy niższym stężeniu permeatu) [87, 131]. Hydrofilowy charakter bibuły filtracyjnej zapewniać miał ponadto dobrą adhezję materiału monolitycznego do jej powierzchni.

W ocenie enancjoselektywności cienkich kompozytowych membran monolitycznych typu MIP dwoma zasadniczymi pytaniami, na które poszukiwano odpowiedzi, były: jak obecność monomeru funkcyjnego MAA wpływa na strumień alkaloidu oraz czy stereoselektywność membrany może być kontrolowana przez izomer, którego użyto

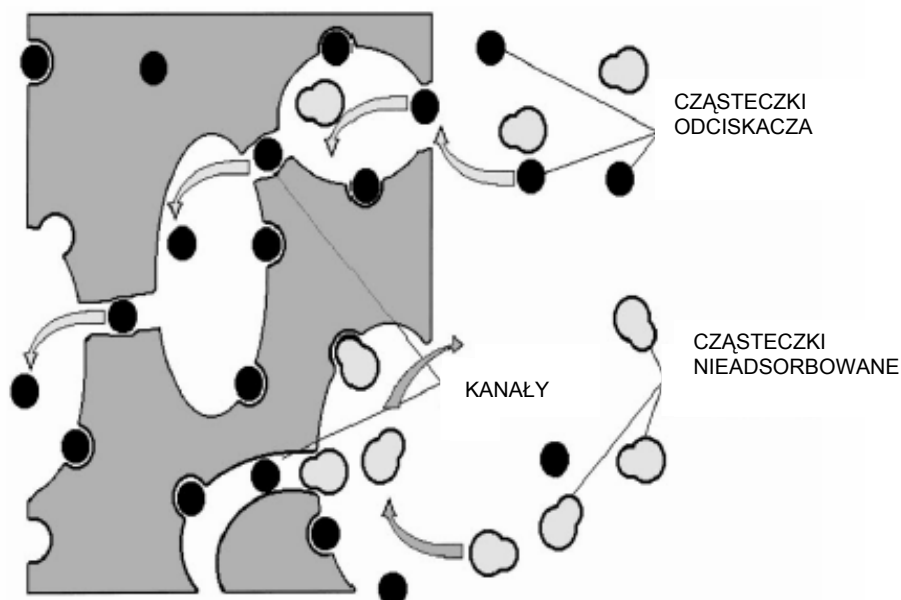
jako wzorca. Uzyskane podczas badań wyniki pozwoliły odpowiedzieć na stawiane pytania, a tym samym podjąć próbę oceny właściwości selektywnego transportu związków przez membrany monolityczne.

Charakteryzowane membrany z odciskami molekularnymi przygotowano dwustopniowo. W pierwszym etapie sporządzono mieszaninę kwasu metakrylowego i dimetakrylanu glikolu etylenowego bądź trietylenowego, w obecności CIN lub CID oraz odpowiednich poroforów i aktywatora. Drugim etapem była polimeryzacja *in situ*, mająca miejsce w porach celulozowej bibuły filtracyjnej, którą wcześniej starannie nasączono przygotowaną mieszaniną reakcyjną. Biorąc pod uwagę omówione w poprzednim rozdziale wyniki analiz chromatograficznych sorbentów polimerowych oraz przyjmując stosunek monomerów do poroforów (1:1 v:v) za optymalny do testowania wybrano następujące układy: EGDMA 100 %v, TEGDMA 100 %v, EGDMA÷MAA 80:20 %v oraz TEGDMA÷MAA 80:20 %v, Tabela 4. Z mieszanin tych przygotowano membrany. Jednocześnie każdy z wymienionych układów zsyntezowano w obecności wzorca o stężeniu 0.6 i 3.6 %wg względem monomerów. Pominięto natomiast przygotowanie membran zawierających 9.6 %wg alkaloidu z uwagi na trudności, jakie pojawiały się podczas analiz z wykorzystaniem sorbentów o tak dużym stężeniu wzorca.

Podobnie jak w przypadku sorbentów polimerowych tak i w przypadku membran monolitycznych w zależności od składu mieszaniny polimeryzacyjnej otrzymano różne typy odcisków molekularnych, Rys. 7. Pierwszy z nich, Rys. 7C, jest tworzony wówczas, kiedy matryca polimerowa powstaje wyłącznie w wyniku polimeryzacji środka sieciującego. Drugi typ odcisku, Rys. 7D, jest wynikiem zastosowania mieszaniny MAA z EGDMA lub TEGDMA. W tym przypadku obecność grup karboksylowych zlokalizowanych na powierzchni odcisku, w miejscach tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczką alkaloidu, może znacznie ograniczyć ruchliwość dyfundującej cząsteczki. W konsekwencji spowodować to może zmniejszenie strumienia permeatu. Im rozmieszczenie grup karboksylowych jest bardziej komplementarne w stosunku do cząsteczek alkaloidu tym wolniej będzie transportowany związek. Stąd szybkości transportu obu alkaloidów przez membranę monolityczną mogą służyć za dogodny wskaźnik oddziaływań pomiędzy odciskami molekularnymi a cząsteczkami dyfundującego związku. Istotną sprawą jest wymagana regeneracja membran. Ponowny proces płukania roztworem EtOH-AcOH 80:20 v/v zapewniał przywrócenie membran właściwości enancjoselektywnych, a tym samym umożliwiał jej wykorzystanie w kolejnych etapach badań.

Porównanie danych, dotyczących membran z odciskami molekularnymi CIN, (Rys. 20.), prowadzi do następujących wniosków: CIN transportowana jest zawsze

szybciej niż jej antypoda optyczna CID. Ponadto strumienie obu alkaloidów przez membrany z EGDMA (Rys. 20A.) są większe od strumieni otrzymanych przez membrany, w skład których wchodził MAA (Rys. 20B.). Najwyraźniej, w przypadku kopolimeru EGDMA:MAA cząsteczki CIN są efektywniej wyłapywane przez odciski zawierające odpowiednio ułożone w przestrzeni grupy karboksylowe. Skok dyfuzyjny cząsteczki CIN zachodzi między sąsiednimi odciskami, stąd szybkość poruszania się jest znacznie spowolniona w porównaniu z szybkością dyfuzji przez membranę otrzymaną z samego EGDMA (mniejszy strumień alkaloidu). W dyskutowanym przypadku może sprawdzać się koncepcja Piletskyego, który twierdzi, że kanały powstałe na skutek obecności w układzie związków tworzących negatywy, łączą makropory matrycy polimerowej, Rys. 19., [36].



Rys. 19. Schemat monolitu MIP z porami połączonymi kanałami, przez które przeciskać się mogą jedynie substancje określonego kształtu [36].

Powstają swoiste bramki, umożliwiające transport jedynie cząsteczek substancji określonego kształtu - cząsteczek substancji uczestniczącej w ich wytworzeniu, bądź też do nich podobnych pod względem kształtu i wielkości. Jak wcześniej założono CIN i CID posiadają takie same wymiary, co sprawia, że czynnikiem determinującym selektywność separacji membranowej w omawianym przypadku pozostaje jedynie geometria cząsteczki enancjomeru. Stereoselektywność transportu, którą zdefiniowano jako stosunek wartości strumieni CIN do CID, w omawianych membranach osiągnęła poziom 1.1-1.25. Zauważyć

można ponadto, że we wszystkich przypadkach strumienie obu alkaloidów osiągają wyższe wartości, kiedy zwiększano stężenie CIN, będącej odciskany w membranach wzorcem. Takie zachowanie wskazuje na jednoznaczny udział odcisków CIN w transporcie alkaloidów. Podobne rezultaty osiągnęli Mathew-Krotz i Shea, opisując działanie membran odciskanych pochodną adeniny w układzie EGDMA:MAA [84], gdzie adenozyzna transportowana była efektywniej niż guanozyna, osiągając przy tym współczynnik selektywności membrany równy 1.5. Ten sam efekt uzyskali wspomniani już Dzgoev i Haupt, oceniając enancjoselektywność membran z odciskami L-tyrozyny na 3.4.

Opisując membranę EN2iii z odciskami cynchoniny (CIN dyfunduje szybciej) należy zwrócić uwagę na jej przeciwne zachowanie w porównaniu z użytym w analizie chromatograficznej sorbentem E iii 0.8, zawierającym odciski tego samego wzorca (CIN wymywa się dłużej). Zachowanie to może być tłumaczone różnymi mechanizmami rozdziału w obu mediach. W HPLC separacja jest wynikiem wielokrotnych procesów sorpcji i desorpcji cząsteczek związku przesuwanego się w kolumnie. Cząsteczka CIN ma większe powinowactwo do sorbentu, ze względu na obecność jej odcisków w materiale chromatograficznym, a tworząc kompleks cząsteczka-odcisk będzie wymywana dłużej niż cząsteczka CID o mniejszym powinowactwie do odcisku. Z kolei w procesie separacji membranowej, zgodnie z mechanizmem sorpcyjno-dyfuzyjnym, cząsteczka permeatu musi zostać zasorbowana na powierzchni membrany a później przez nią dyfunduje. Obserwowane powinowactwo CIN do miejsc wiążących membrany EN2iii jest większe niż powinowactwo CID do tych miejsc. Zatem pojawia się większy gradient CIN niż CID, co w konsekwencji daje większy strumień cynchoniny niż cynchonidyny.

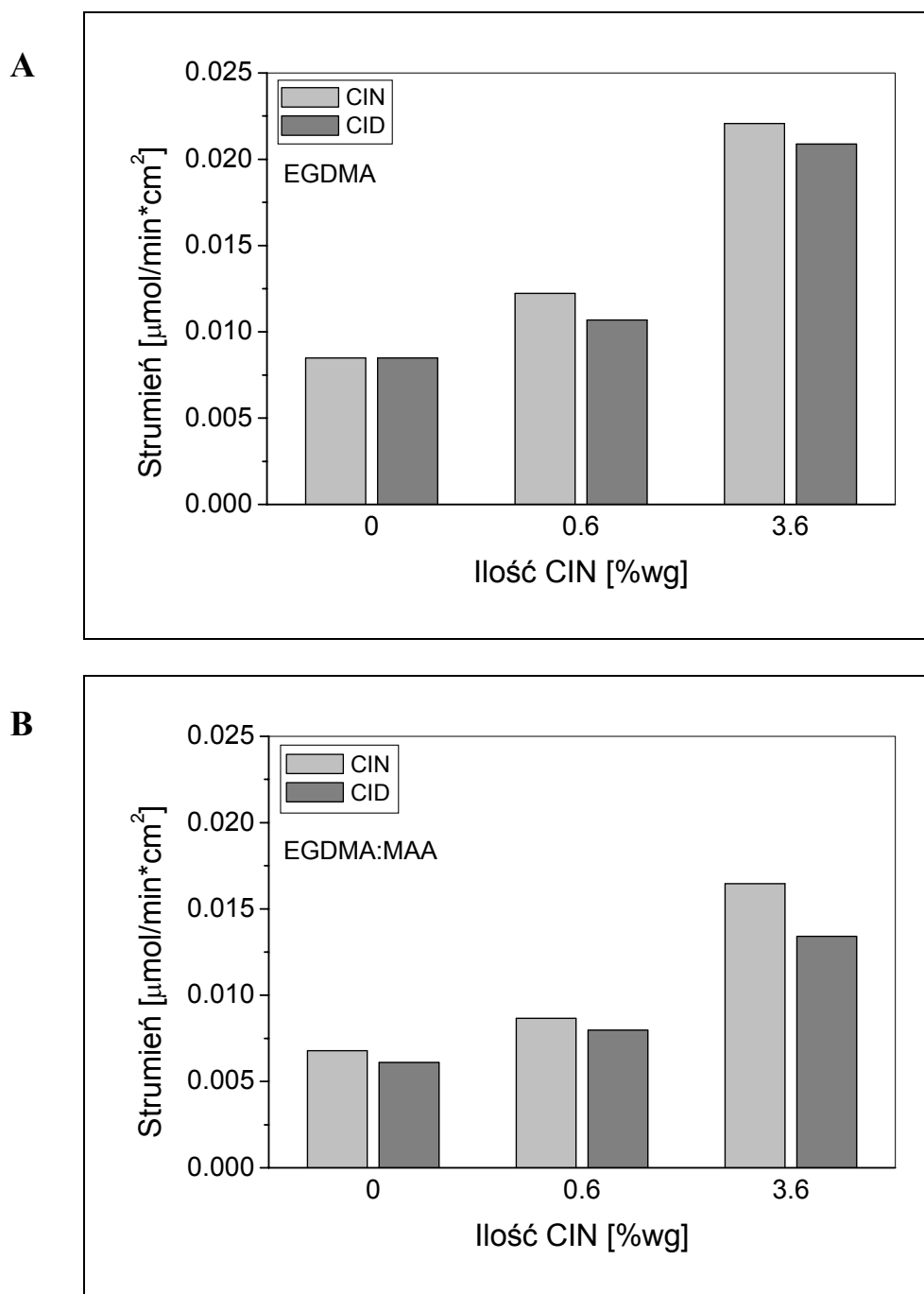
O wiele ciekawsze rezultaty obserwowano, kiedy membrany z układów EGDMA oraz EGDMA:MAA posiadały odciski CID, Rys. 21. Tak jak się spodziewano, cząsteczki tego alkaloidu transportowane były nieco szybciej niż cząsteczki CIN. W tym przypadku, stereoselektywność membrany, zdefiniowana tutaj jako stosunek wartości strumieni CID do CIN, osiągnęła wielkość 1.1-3.0. Jednakże badane membrany były mniej przepuszczalne dla alkaloidów, kiedy poddawano je syntezie z coraz większą zawartością CID. Przy stężeniu wzorca 3.6 %wg strumienie transmembranowe obu alkaloidów były od 7 do 40 razy mniejsze od strumieni przez membrany kontrolne. Sytuacja ta jest całkowicie odwrotna do tej, którą obserwowano w membranach odciskanych CIN i pojawiają się trudności z interpretacją otrzymanych wyników. Różne zachowania membran z odciskami molekularnymi CIN (Rys. 20.) oraz CID (Rys. 21.) wynikają zapewne z faktu, że oba związki stanowią parę enancjomerów. Przeprowadzając komputerowe modelowanie

kompleksów monomer-wzorzec już wówczas obserwowano różnice w wartościach energii oddziaływań wodorowych pomiędzy układami MAA-CIN i MAA-CID. Te różnice wynikały właśnie z różnych konfiguracji obu alkaloidów, co widoczne jest również w ich rozpuszczalności. Osobliwe zachowania membran mogą wynikać także z ich odmiennych struktur. Porównywane membrany polimerowe otrzymano z mieszanin różniących się rodzajem i ilością dodanego wzorca. Być może w warunkach polimeryzacji dochodzi do różnic w separacji faz obu materiałów i do powstania różnych struktur polimerowych: układu porowatego bądź żelowego [132]. To z kolei wpływa na przepuszczalność membran, a także na ich enancjoselektywność. Analogią łączącą membrany EGDMA:MAA odciskane CID i CIN jest wpływ obecności grup karboksylowych w miejscach wiążących na spadek szybkości transportu alkaloidów w porównaniu z dyfuzją przez membrany otrzymane wyłącznie z EGDMA. Membrany z odciskami molekularnymi CID stały się mniej przepuszczalne dla obu alkaloidów albo z powodu dużego powinowactwa miejsc wiążących albo tworzenia nioselektywnych porów, zdolnych także do zatrzymywania odpowiednich cząsteczek. Hong i współpracownicy również obserwowali obniżenie przepuszczalności na skutek silnego oddziaływania teofiliny z membraną odciskaną cząsteczkami tego związku [87]. Redukcja strumienia wynikała zatem z wysokiej sorpcji permeanta.

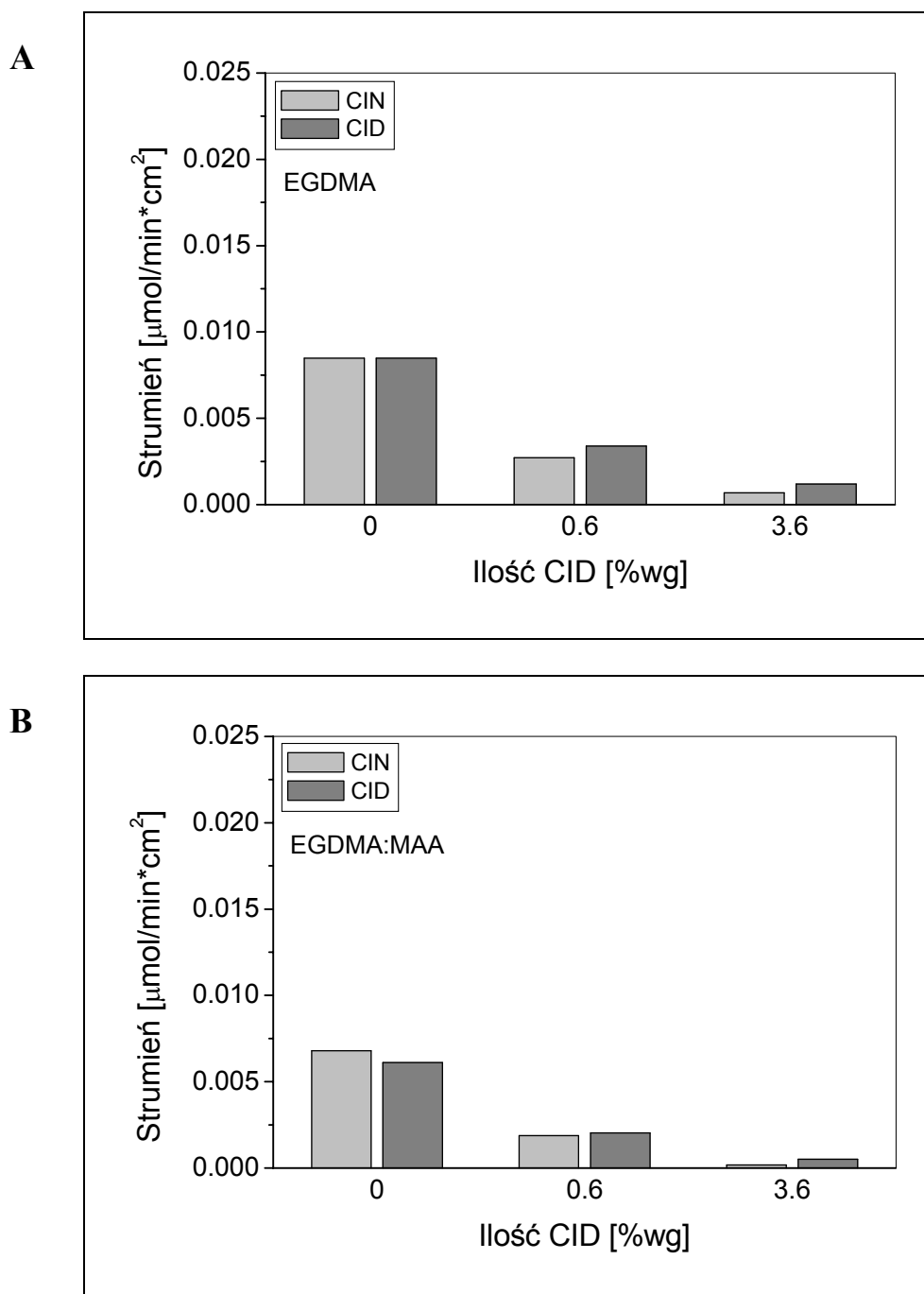
W technice wdrukowania molekularnego EGDMA jest najczęściej stosowanym środkiem sieciującym. Postanowiono również sprawdzić jak na zdolność separacyjną membran wpływa zmiana środka sieciującego. Do tego celu wybrano TEGDMA, związek o większej cząsteczce niż EGDMA, ale o podobnej reaktywności. Pomiar strumieni, Rys. 22. i Rys. 23., wykazały dość skomplikowaną zależność między właściwościami transportowymi a parametrami syntez poszczególnych membran. Obecność CIN lub CID w mieszaninie polimeryzacyjnej prowadziła do niewielkiego wzrostu strumieni obu alkaloidów. Najwyższą wartość transportu CID osiągnięto dla membrany otrzymanej z kopolimeru TEGDMA:MAA w obecności 0.6 %wg CID (Rys. 23B.). W tym przypadku enancjoselektywność wyniosła 1.43. Również godną uwagi jest nieoczekiwanie wysoka selektywność membrany monolitycznej odciskanej CIN (3.6 %wg), która sięgała 3.7 (Rys. 22A.). Obecnie trudno jest takie zachowanie w prosty sposób wyjaśnić, podobnie jak fakt zazwyczaj większego transportu CID niż CIN. Takiej niespecyficzności membranowej nie można wytłumaczyć wyłącznie przez różnicę w powinowactwie kompleksu cząsteczka-odcisk. Mechanizm wspomaganego transportu faktycznie przyczynia się do preferencyjnego przepuszczania cząsteczek wzorca w porównaniu do innych związków. Podobne zjawisko zachowania membran opisano także w innych pracach [88, 133].

Podsumowując charakter omawianych monolitycznych membran typu MIP wydaje się, że kiedy otrzymywano je z EGDMA i EGDMA:MAA zachowywały się w dość przewidywalny sposób np. preferencyjnie transportowały CIN przez membranę z odciskami tego alkaloidu, podczas gdy membrany z TEGDMA i TEGDMA:MAA cechowały się bardziej efektywnym przenoszeniem CID. Pomimo, że charakteryzowane membrany różniły się przepuszczalnością i właściwościami selektywnego transportu wobec stosowanych enancjomerów wydaje się możliwe preparowanie membran z odciskami molekularnymi, membran, które będą zdolne do rozdzielenia jednego z najtrudniejszych do separacji układów - mieszanin izomerów optycznych. Otrzymanie membran monolitycznych o współczynniku enancjoselektywności już powyżej 1.5 przy jednocześnie większych wartościach strumieni alkaloidów, w porównaniu z uzyskanymi wynikami, można by uznać za powodzenie separacji. Problemem pozostaje nadal znalezienie prostej zależności pomiędzy strumieniami alkaloidów a stężeniem wzorca w mieszaninie polimeryzacyjnej. Optymalizacja membrany typu MIP pod względem liczby miejsc wiążących i jej enancjoselektywności wobec wzorca powinna być zatem połączona z optymalizacją porowatości oraz oddziaływać w kompleksie wzorzec-odcisk. Tworząc takie obiekty należy pamiętać, iż proste przenoszenie pewnych obserwacji z syntez sorbentów nie zawsze prowadzi do otrzymania membran o optymalnych właściwościach separacyjnych. Dokładnego poznania wymaga mechanizm, powodujący rozdział substancji, a następnie jego powiązanie ze strukturą membran.

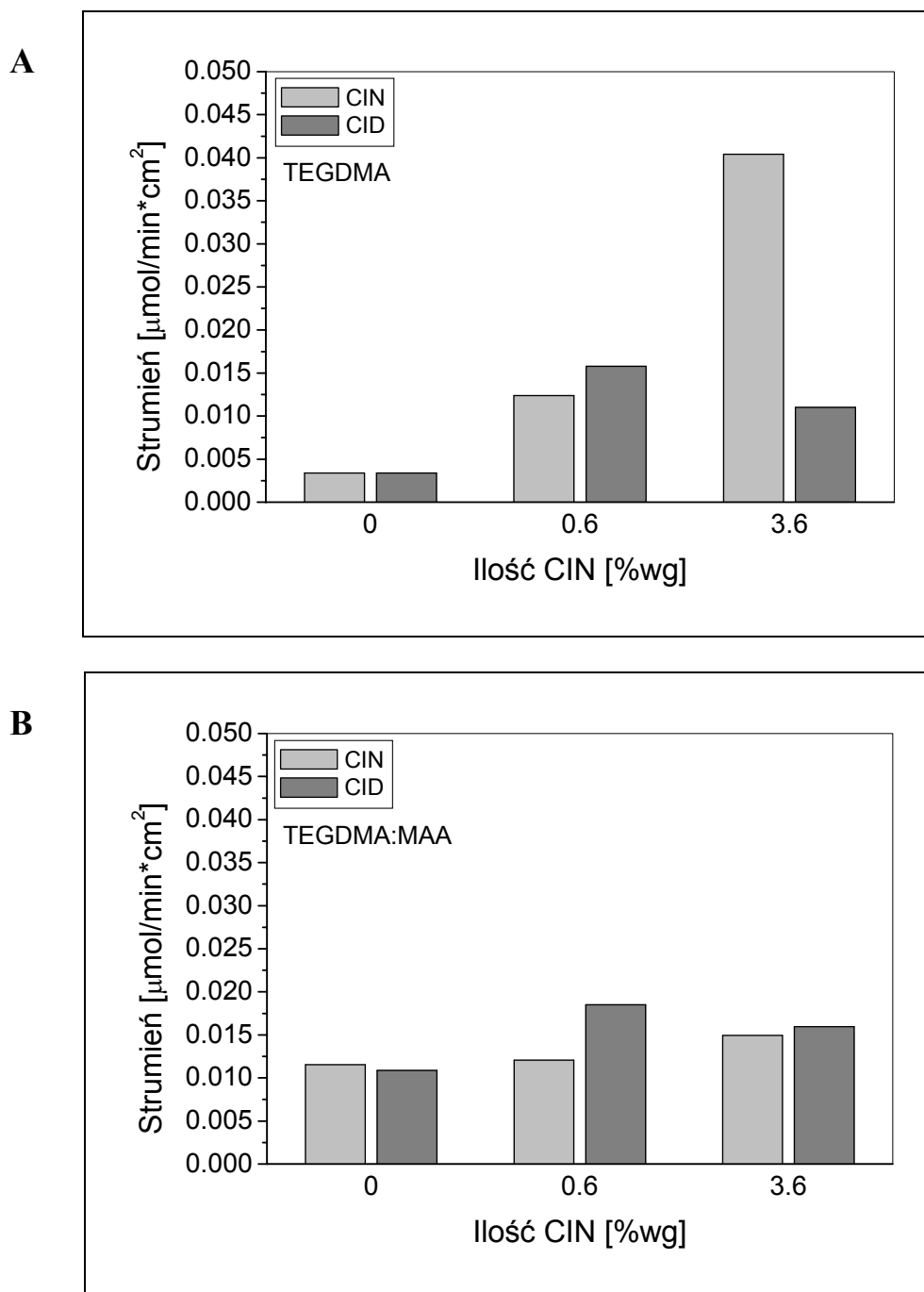
Membrany monolityczne, mimo że stosunkowo proste w syntezie, nie zdobywają większej popularności. Ich główną wadą jest względnie mała wielkość strumienia. Z tego względu większość obecnie prowadzonych prac koncentruje się wokół membran afinitywnych. Zagadnienie to zostało omówione w następnym rozdziale.



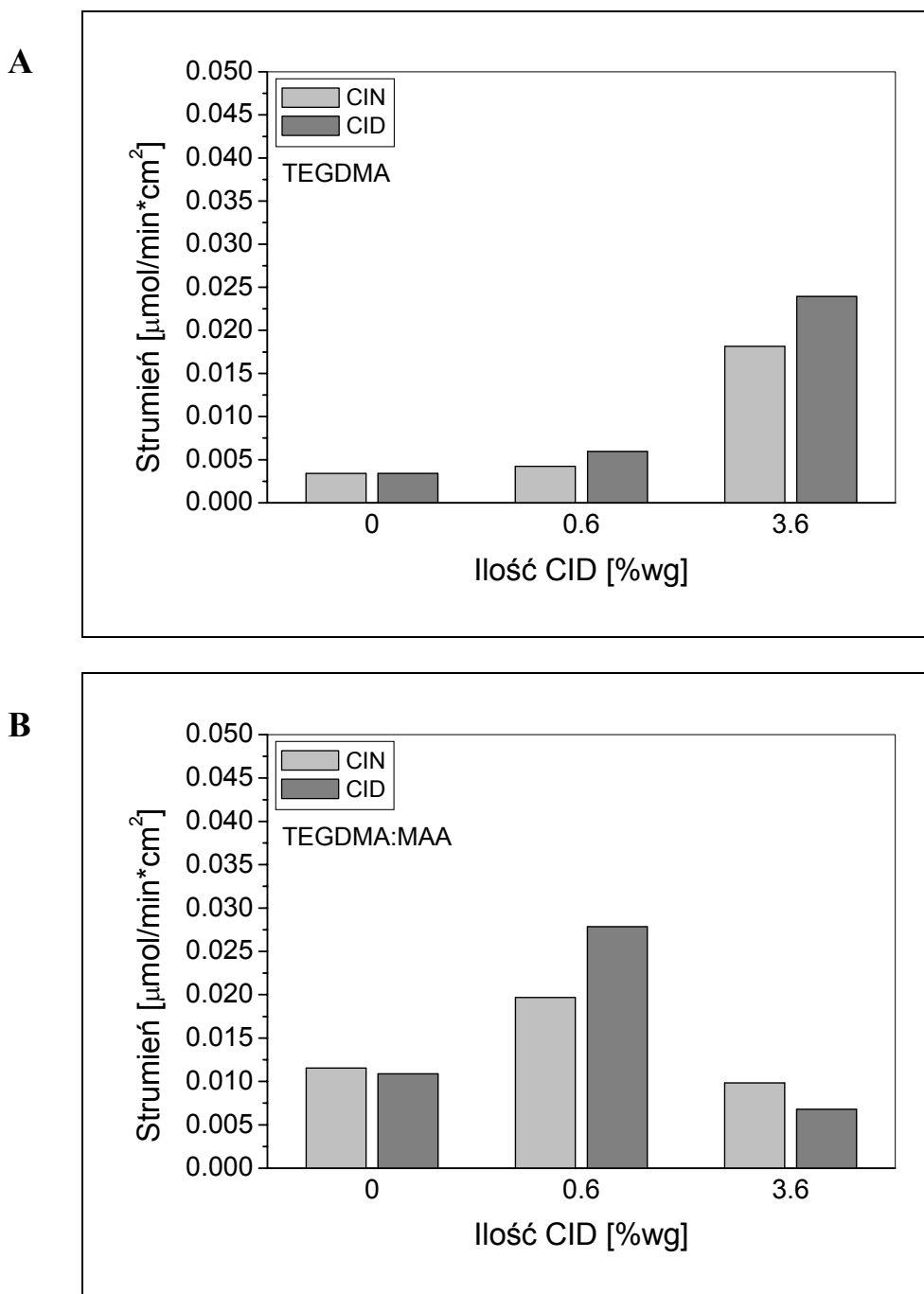
Rys. 20. Strumień CIN i CID przez membrany: (A) EGDMA i (B) EGDMA:MAA otrzymane w obecności CIN.



Rys. 21. Strumienie CIN i CID przez membrany: (A) EGDMA i (B) EGDMA:MAA otrzymane w obecności CID.



Rys. 22. Strumienie CIN i CID przez membrany: (A) TEGDMA i (B) TEGDMA:MAA otrzymane w obecności CIN.



Rys. 23. Strumienie CIN i CID przez membrany: (A) TEGDMA i (B) TEGDMA:MAA otrzymane w obecności CID.

5.4. Membrany afinitywne z odciskami molekularnymi

Wydawać się by mogło, że trudy związane z otrzymaniem i oceną membran monolitycznych z odciskami molekularnymi zniechęca naukowców do poszukiwań takich rozwiązań, które dawałyby poprawę zdolności separacyjnej membran. Zespół prof. Kobayashi wybrał inną drogę i do formowania membran zastosował jedną z prostszych metod tzw. mokrą inwersję faz [93, 94]. Zasadnicza różnica tkwiła w tym, że w otrzymanych membranach afinitywnych odciski molekularne zlokalizowane były na powierzchni porów a nie w objętości, jak to miało miejsce w membranach monolitycznych. W omówionych do tej pory sorbentach i membranach litych typu MIP tak i w membranach opisanych w tym rozdziale istotną rolę odgrywają obecne w polimerze ugrupowania polarne. Powodują one odpowiednie ustawienie się transportowanych cząsteczek związku w odciskach molekularnych, przez co układ polimerowy posiada powinowactwo do określonego typu związku.

Porowate membrany z odciskami molekularnymi zdolne do selektywnej sorpcji substancji, jak wspomniano we wstępie do tego rozdziału, formowano metodą inwersji faz. W przedstawionej pracy wykorzystano najczęściej używane do tego celu kopolimery statystyczne akrylonitrylu i kwasu akrylowego [93, 134]. Składy roztworów z CID (lub CIN) podano w Tabeli 6 (p.4.6.2.). Jednak w ostatnim czasie pojawiło się coraz więcej doniesień o możliwości wykorzystania innych polimerów m.in. polichlorku winylu, polistyrenu, polisulfonu, nylonu czy też poliakrylonitrylu z kwasem metakrylowym lub maleinowym [98, 135, 136].

Badania własne rozpoczęto od syntezy P[AN-co-AA]. W zależności od metody i warunków polimeryzacji uzyskano kopolimery, różniące się ciężarem cząsteczkowym, pomimo, że stosunek molowy akrylonitryl-kwas akrylowy w mieszaninach reakcyjnych był taki sam. W Tabeli 11 zestawiono wartości granicznych liczb lepkościowych oraz średnich mas cząsteczkowych otrzymanych kopolimerów. W dalszych badaniach do formowania membran wykorzystano materiały polimerowe jedynie z trzech przeprowadzonych reakcji kopolimeryzacji [137]. Były to: PAAN r1, PAAN t oraz PAAN r4, a wybrano je ze względu na różnice pomiędzy ich ciężarami cząsteczkowymi. Zakładając, że łańcuchy otrzymanych materiałów polimerowych posiadały budowę statystyczną z otrzymanych polimerów formowano membrany i testowano ich właściwości sorpcyjne. Tym samym weryfikowano tezę o możliwości tworzenia membran z dobrym powinowactwem do cząsteczki zostawiającej swój odcisk molekularny. W zależności od użytego polimeru istnieje jeszcze jedna właściwość membrany, którą można połączyć

z ciężarem cząsteczkowym polimeru. Literatura donosi, że struktura porowata membrany ultrafiltracyjnej może zależeć od długości łańcuchów polimerowych [138].

Tabela 11. Właściwości kopolimerów P[AN-co-AA]

KOPOLIMER	$[\eta]$ (dL/g)	$M_v \times 10^{-4}$ (g/mol)
PAAN r1	3.98	24.80
PAAN t	1.74	8.44
PAAN r2	1.46	6.72
PAAN r3	1.17	5.03
PAAN r4	0.76	2.87

Tę zależność starano się zweryfikować szacując rozkład wielkości porów w badanych membranach. Przeprowadzone testy dały możliwość poznania i oceny ich porowatości. Jeżeli w badanych membranach nie obserwuje się zmian budowy w warstwie naskórkowej to nie ma podstaw by przypuszczać, iż powstałe materiały porowate miały różną budowę w całej swej objętości, a membrany otrzymane z kopolimerów o różnych ciężarach cząsteczkowych będą posiadały podobną budowę. Obliczone współczynniki zatrzymania dekstranu (SR_r) zostały skorelowane ze znormalizowanym parametrem U odczytanym z tablic matematycznych. Metodą regresji liniowej U vs. $\ln R$ z wyrażenia $U = (\ln R - \mu) / \sigma$ obliczono następnie parametry μ i σ funkcji rozkładu średnich wielkości porów (PDD). Wyniki tych wyliczeń zostały zebrane w Tabeli 12. Na ich podstawie stwierdzono, że wszystkie przebadane membrany, otrzymane metodą inwersji faz, charakteryzowały się podobnymi parametrami - średnią wielkością porów μ i szerokością rozkładu σ .

Tabela 12. Parametry funkcji rozkładu średnich wielkości porów membran z P[AN-co-AA]

KOPOLIMER	PARAMETRY	
	μ	σ
PAAN r1	2.4314	2.3929
PAAN t	2.4482	1.7844
PAAN r4	2.4932	2.5113

Hipotezę, iż obliczone parametry funkcji rozkładów nie różnią się istotnie, z dobrym powodzeniem można zweryfikować testami statystycznymi. W tym celu należałoby wykazać, iż obliczone parametry rozkładu nie różnią się ze statystycznego punktu widzenia. Przyjmując za prawdziwą *hipotezę równości wariancji* zmienna losowa

$$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad \sigma_1 > \sigma_2$$

ma rozkład F Snedecora z n_1-1 i n_2-1 stopniami swobody, przy czym n_1 i n_2 to liczebności prób, na których szacowano wariancje σ_1 i σ_2 . Dla wybranego poziomu istotności, α , określono z tablic rozkładu F Snedecora wartość krytyczną. Jeżeli obliczona wartość jest mniejsza od wartości krytycznej to przyjęcie hipotezy o równości wariancji będzie obarczone błędem równym co najwyżej wartości α .

W badanym przykładzie obliczono wartości F , porównując kolejno wariancje dla membrany PAAN r1 z PAAN t, PAAN r4 z PAAN r1 oraz PAAN r4 z PAAN t. Dane zestawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Obliczone wartości funkcji F dla wariancji w badanych rozkładach wielkości porów

PORÓWNYWANE ROZKŁADY	OBLICZONA WARTOŚĆ FUNKCJI F
PAAN r1 i PAAN r4	1.1014
PAAN r1 i PAAN t	1.7983
PAAN r4 i PAAN t	1.9807

$F_{0.05; 8; 8}=3.44$

Dla $n_1=n_2=8$ oraz $\alpha=0.05$ wartość krytyczna rozkładu wynosi $F_{KR}=3.44$. Można więc powiedzieć, iż hipoteza równości wariancji jest prawdziwa dla wszystkich badanych rozkładów. Co więcej, przyjęcie tej tezy obarczone jest błędem statystycznym nie większym niż 5%.

Jeżeli w dwóch różnych próbach (w teście F Snedecora) wariancje są takie same to można testować hipotezę o równości średnich wartości. W takim przypadku tworzy się zmienną

$$t = \frac{|\bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2|}{\sqrt{\bar{\sigma}^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

gdzie

$$\bar{\sigma}^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

która ma rozkład Studenta o $n_1 + n_2 - 2$ stopniach swobody. W sytuacji gdy $n_1 = n_2 = n$ powyższa zależność upraszcza się do

$$t = \frac{|\bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2|}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} \sqrt{n}$$

Hipotezę o równości średnich odrzucamy, jeżeli obliczona wartość charakterystyki t będzie większa od wartości krytycznej t_{KR} . W Tabeli 14 zebrano wartości obliczone dla porównywalnych rozkładów.

Tabela 14. Obliczone wartości funkcji t dla porównywalnych rozkładów

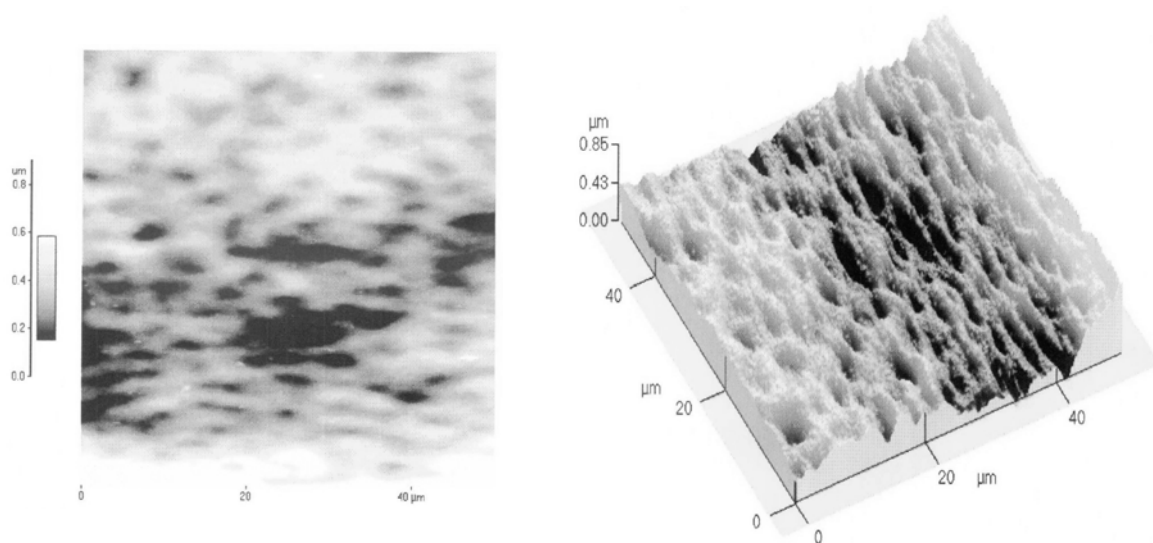
PORÓWNYWANE ROZKŁADY	OBLICZONA WARTOŚĆ CHARAKTERYSTYKI t
PAAN r1 i PAAN r4	0.0667
PAAN r1 i PAAN t	0.0211
PAAN r4 i PAAN t	0.0547

$t_{0,05; 14} = 2.145$

Skoro wartość krytyczna $t_{KR} = 2.145$ jest większa od obliczonych wartości charakterystyk, to z co najwyżej 5% możliwością popełnienia błędu, nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy równości średnich dla badanych rozkładów.

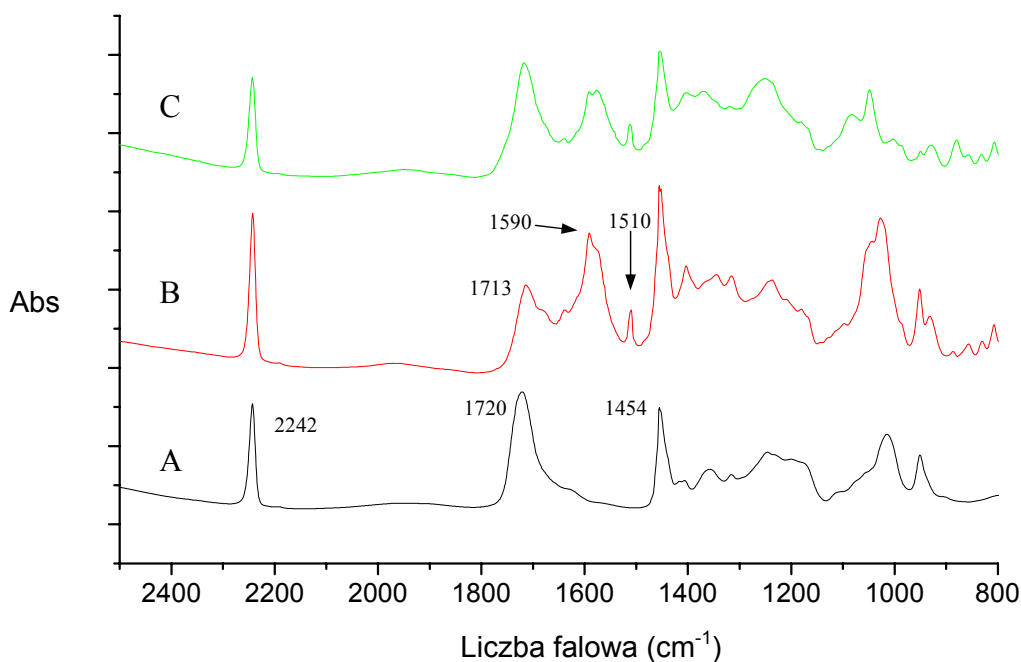
Nie mogąc odrzucić hipotez o równości obu parametrów testowanych rozkładów, z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że rozkłady wielkości porów w membranach otrzymanych z trzech testowanych kopolimerów są takie same. Oznacza to, że struktura otrzymanych membran nie jest powiązana z ciężarem cząsteczkowym kopolimeru P[AN-co-AA], oczywiście w warunkach otrzymywania omówionych w niniejszej pracy. Wydaje się prawdopodobnym, że również dodatek do roztworu polimeru związku będącego odciskaczem nie wpływa istotnie na porowatość membrany. Do podobnych wniosków doszli pionierzy badań membran typu MIP formowanych inwersją faz [94]. Wykazali, że porowatość membrany z P[AN-co-AA], otrzymanej w obecności 4.7 %wg teofiliny, była taka sama jak dla membran przygotowanych bez wzorca.

Dalszych dowodów, potwierdzających podobieństwo membran, przygotowanych bez oraz w obecności wzorca, miały dostarczyć zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopii AFM. Analiza otrzymanych zdjęć wskazała na porowaty charakter obu typów membran, jednakże bez zasadniczych różnic pomiędzy nimi. Zatem morfologicznie struktury powierzchni membran nie zmieniały się istotnie w przypadku membrany formowanej w obecności wzorca jak i bez niego. Dla przykładu na Rys. 24. zaprezentowano membranę zawierającą CID, gdzie wyraźnie obserwowana jest ziarnistość powierzchni. Ta cecha jak i miejsca zagłębienia, które swym wyglądem przypominają dołki, widoczne w trójwymiarowej prezentacji, świadczą o porowatym charakterze membrany. Wang i Kobayashi również nie obserwowali indywidualnych cech strukturalnych membrany z P[AN-co-AA] odciskanej uracylem w porównaniu z membraną formowaną bez wzorca [139].



Rys. 24. Zdjęcia mikroskopowe (AFM) powierzchni i przekroju ($50 \times 50 \mu\text{m}$) membrany P[AN-co-AA] zawierającej wzorec CID.

Widmo IR otrzymanego kopolimeru PAAN r1, Rys. 25A, jak i pozostałych zsyntezowanych kopolimerów (widma nie prezentowane) potwierdziły w pełni podobieństwo do materiałów publikowanych we wcześniejszych pracach [94, 140]. W analizie widma odnaleziono charakterystyczne piki drgań grup $C\equiv N$ (σ) przy 2242 cm^{-1} oraz CH_2 (δ) 1454 cm^{-1} pochodzących od ugrupowań akrylonitrylowych [141]. Drgania grupy $C=O$ (σ) przy 1720 cm^{-1} były z kolei swoiste dla merów AA. Konsekwencją obecności CID w matrycy polimerowej P[AN-co-AA] było pojawienie się charakterystycznych cech w widmie IR, Rys. 25B. Ujawniło się nowe pasmo absorpcji w zakresie 1590 cm^{-1} - 1510 cm^{-1} . Stwierdzono, że nowe piki są odzwierciedleniem drgań grupy CH w pierścieniu chinolinowym cząsteczki cynchonidyny [142, 143]. Obserwowano równolegle, że intensywność drgań grupy karbonylowej kwasu akrylowego przy 1720 cm^{-1} wyraźnie zmniejszyła się ze względu na zawartość CID w układzie polimerowym. Nastąpiło także przesunięcie tego pikę do 1713 cm^{-1} .



Rys. 25. Widma IR membran: (A) PAAN r1 bez odcisków CID, (B) PAAN r1 przygotowanej w obecności 2 %wg CID oraz (C) membrany mytej ekstraktem.

W kopolimerze poli[akrylonitryl-co-kwas akrylowy] jak wiadomo jednostki AA tworzą dimery, które na widmach IR „widoczne” są w szerokim obszarze absorpcji $2500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ [144]. Ich dimeryzacja powoduje zablokowanie grup $COOH$

w wyniku powstania pomiędzy nimi wiązań wodorowych. Nie mogą one oddziaływać już z cząsteczkami CID. Inne pojawiające się przy 3520 cm^{-1} pasmo absorpcji charakterystyczne jest dla wolnych grup karboksylowych merów kwasu akrylowego. To one odpowiedzialne są za tworzenie oddziaływań z cząsteczkami wzorca, a tym samym za późniejsze powstawanie odcisków w matrycy polimerowej.

Kluczową sprawą stosowania membran z odciskami molekularnymi w procesach separacyjnych jest usunięcie wszystkich cząsteczek wzorca zamkniętych wewnątrz materiału polimerowego. Rzeczywiście dalsze badania w podczerwieni wykazały raz jeszcze, że płukanie membran powodowało ekstrakcję wzorca z układu. Na Rys. 25C. prezentującym widmo IR membrany z kopolimeru PAAN r1 zauważono zmiany intensywności pasm przy 1590 cm^{-1} (zmniejszenie) oraz 1720 cm^{-1} (wzrost). Zmiany te wynikały z coraz mniejszej ilości CID oddziaływującej w miejscach wiążących w membranie polimerowej. Szybkość i efektywność procesu usuwania wzorca zależna jest od materiału polimerowego i jego struktury. W omawianym przypadku, wyłącznie dla potrzeb przeprowadzenia badań w podczerwieni, przygotowany cienki film polimerowy miał charakter membrany żelowej. Taka postać membrany przyczyniała się do zdecydowanie dłuższego zatrzymywania wzorca, czego skutkiem była powolna dyfuzja cząsteczek CID z układu podczas procesu mycia.

Dwaj przedstawiciele alkaloidów z rodzaju Cinchona CID jak i CIN posiadają niską rozpuszczalność w wodzie. Z tego powodu natychmiastowa koagulacja roztworu P[AN-co-AA]-DMSO w wodzie przyczyniała się do związania cząsteczek wzorca w matrycy polimerowej. Właściwe i długotrwałe przemywanie uformowanej membrany porowatej pozwalało uczynić ją bardziej efektywną, Tabela 15.

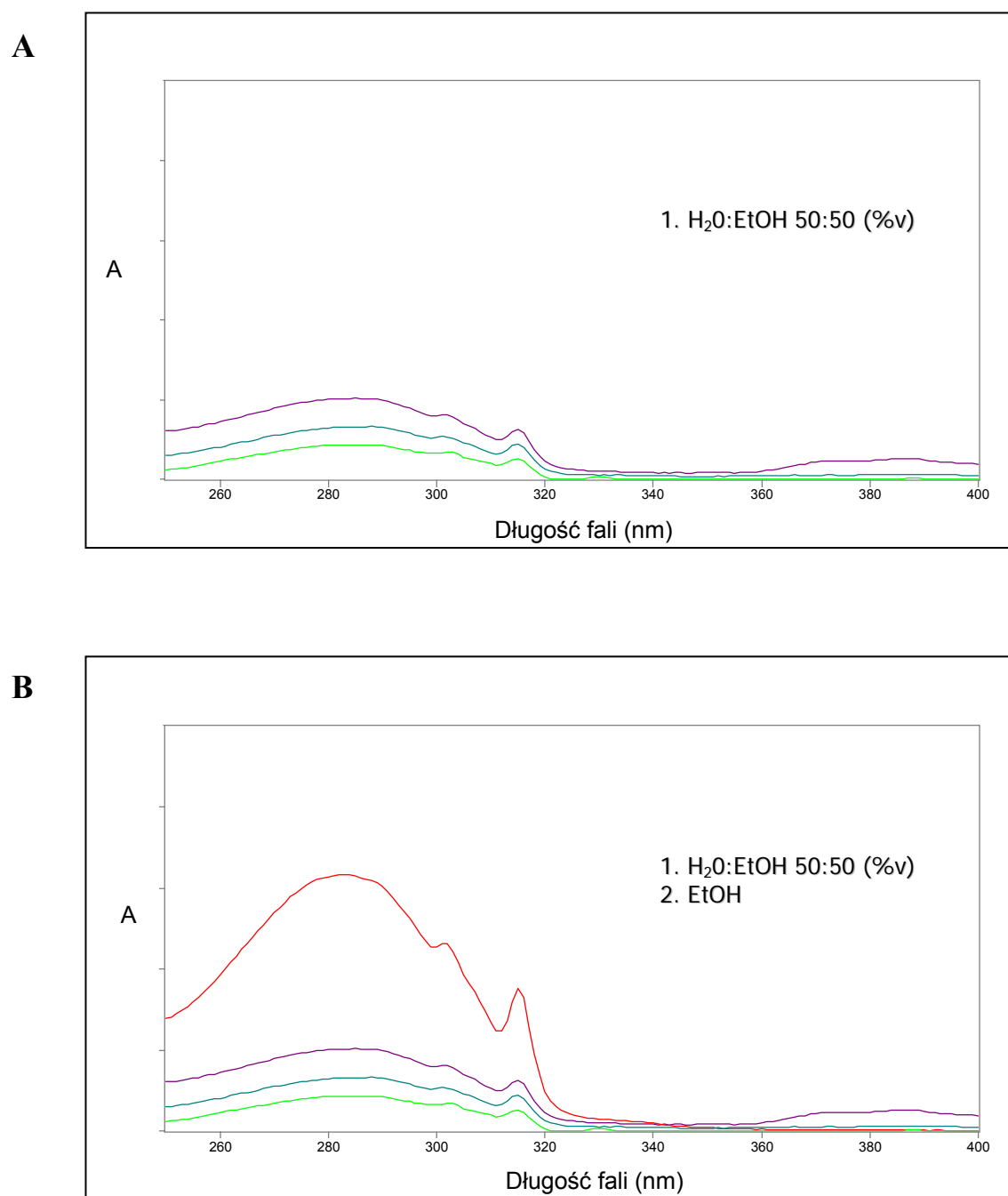
Tabela 15. Wpływ ekstrahenta na wymywanie wzorca (CID) z matrycy polimerowej.

EKSTRAHENT	ZMIANA ABSORBANCJI (A_{314}) W CZASIE (DZIEŃ)
etanol:woda 50:50 (v/v)	1 → 0.060; 2 → 0.042; 3 → 0.024
etanol	4 → 0.160; 5 → 0.060
0.5% kwas octowy w etanolu	6 → 0.213; 7 → 0.019
1.0% kwas octowy w etanolu	8 → 0.021; 9 → 0.000

Obserwowano, że po trzydniowym przemywaniu wodą i etanolem w permeacie wciąż obecna była CID, Rys. 26A. Użycie wyłącznie etanolu przyczyniło się do lepszego wymywania wzorca z układu, Rys. 26B. Ilość usuwanej CID zwiększyła się jeszcze bardziej, kiedy do przemywania membrany zastosowano roztwór kwasu octowego w etanolu, Rys. 26C. Po kolejnym dniu ekstrakcji nastąpił spadek ilości usuwanej CID do poziomu, jaki obserwowano po przemywaniu membrany wodą i etanolem. Zwiększenie stężenia kwasu octowego do 1% pozwoliło na całkowite usunięcie CID z membrany, Rys. 26D.

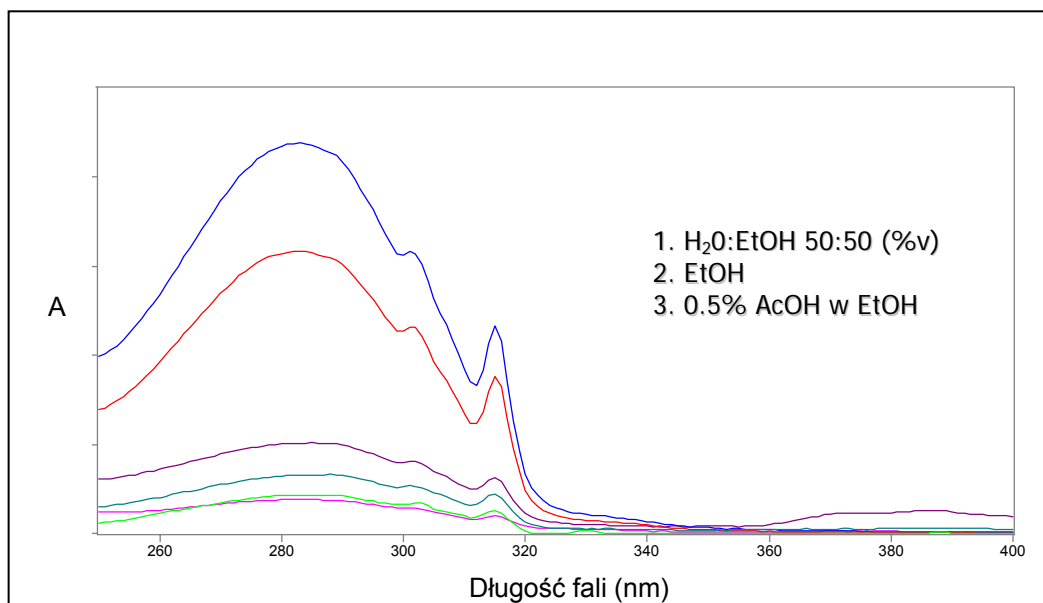
Mycie membrany przeprowadzono etapami starając się w ten sposób wyłonić najlepszy ekstrahent, który jednocześnie nie będzie powodował uszkodzeń membrany. Dla przykładu przemywanie porowatej membrany PAAN r4 etanolem z roztworem kwasu octowego o stężeniu powyżej 3% powodowało jej kurczenie nawet o 17%. Bezpiecznym, a zarazem skutecznym, w przemywaniu membran było zastosowanie roztworu 1% kwasu octowego w etanolu. W przypadku wcześniej syntezowanych sorbentów jak i membran monolitycznych kilkudniowa ekstrakcja roztworem EtOH-AcOH 80:20 v/v zapewniała bezpieczne i efektywne usunięcie cząsteczek wzorca z układów.

Jedną z ważniejszych obserwacji była ta, że przyłączanie cząsteczek alkaloidu do odcisków molekularnych CID membrany ultrafiltracyjnej z P[AN-co-AA] było odwracalne, a jej właściwości sorpcyjne przywracano poprzez ponowne płukanie membrany. Jest to istotna cecha gwarantująca membranom długotrwałe funkcjonowanie [95, 134].

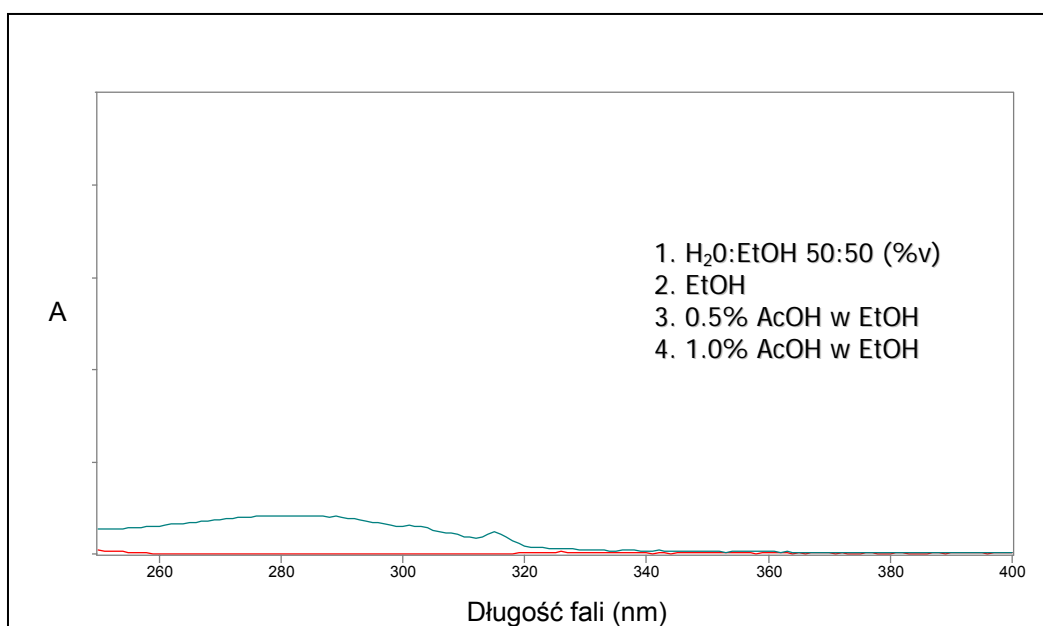


Rys. 26. Wymywanie CID z membrany różnymi roztworami: (A) etanol:woda 50:50 (v/v) oraz (B) etanol.

C



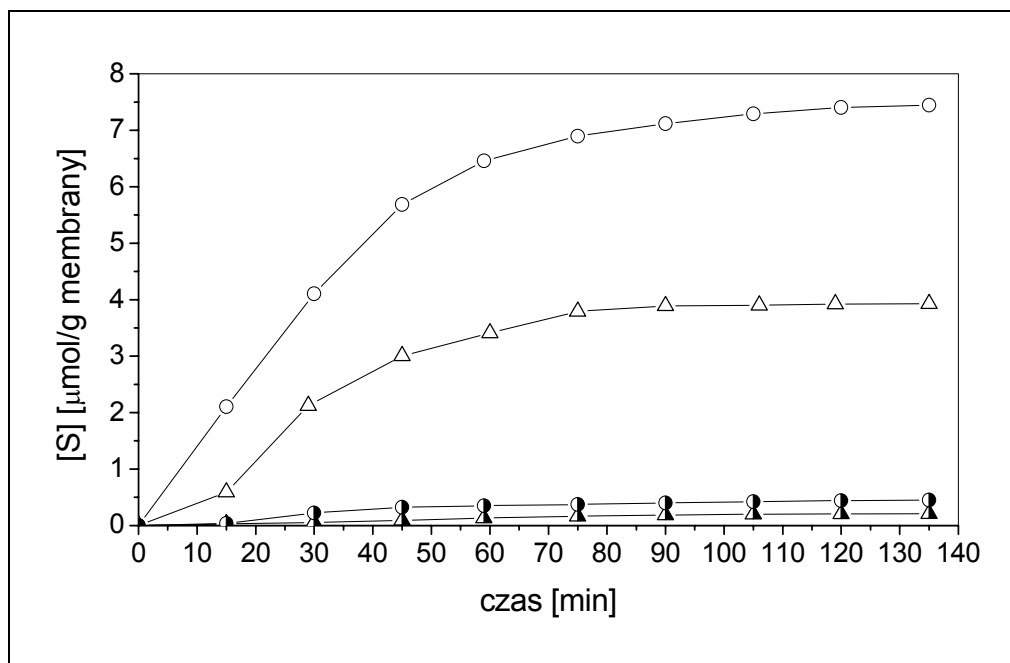
D



Rys. 26. cd. Wymywanie CID z membrany różnymi roztworami: (C) 0.5% kwas octowy w etanolu oraz (D) 1.0% kwas octowy w etanolu.

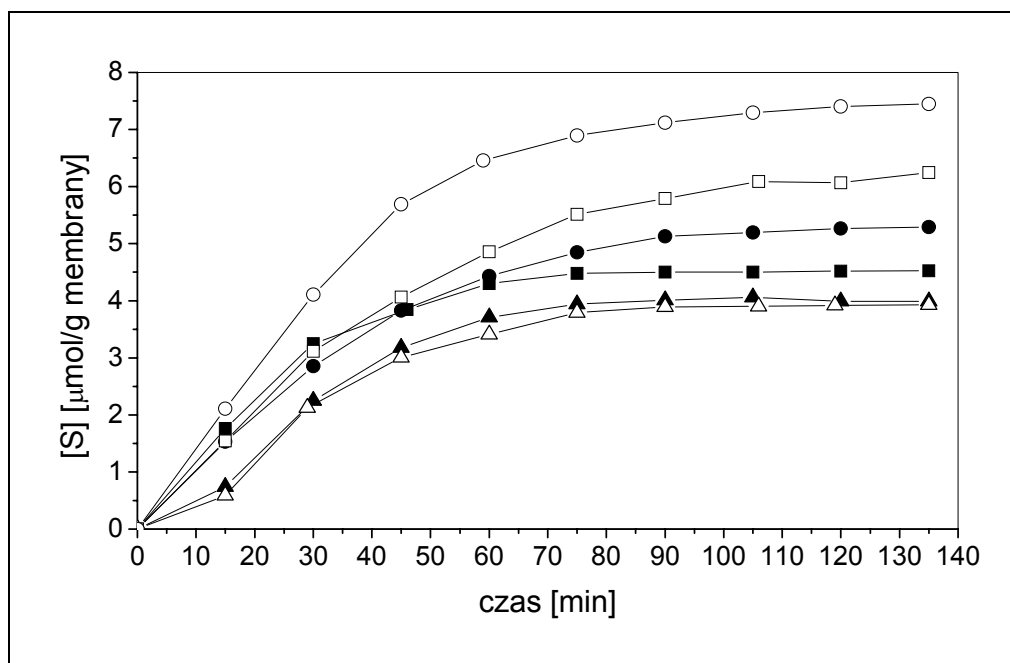
Pierwszy właściwy etap badań obejmował równoważenie membran w roztworach CIN i CID. Z kolei etap drugi polegał na filtracji roztworów tychże alkaloidów przez membrany.

Znaczące rozbieżności pomiędzy sorpcją CIN na membranach z poliakrylonitrylu (PAN) oraz poli[akrylonitrylu-co-kwas akrylowy] (PAAN r1) zostały przedstawione na Rys. 27. Membrana z polimeru bez grup funkcyjnych COOH wykazała bardzo słabe zdolności wiązania alkaloidu, niezależnie od tego czy w matrycy polimerowej odciskano CIN (0.4 %wg) czy też nie (kontrola). Korzystając z równania kinetyki pierwszego rzędu [145, 146], obliczono wielkość sorpcji równowagowej. Wynosiła ona odpowiednio 0.45 i 0.28 $\mu\text{mol/g}$ suchej masy membrany. Wprowadzenie do układu polimerowego grup karboksylowych (PAAN r1) znacznie podniosło zdolności sorpcyjne uformowanych z tego materiału membran. Ilość sorbowanej CIN wzrosła do 4.13 $\mu\text{mol/g}$, a dodatkowa obecność odcisków tego alkaloidu w membranie, wywołana przez użycie 0.4 %wg wzorca podczas formowania, powodowała dalszy wzrost sorpcji do poziomu 7.72 $\mu\text{mol/g}$. To wysycenie obserwowane jest po 90. minucie, co może oznaczać, że wszystkie miejsca wiążące CIN zostały wtedy obsadzone.



Rys. 27. Sorpcja CIN w membranach PAN: kontrola (▲) i 0.4 %wg CIN (●) oraz PAAN r1: kontrola (△) i 0.4 %wg CIN (○).

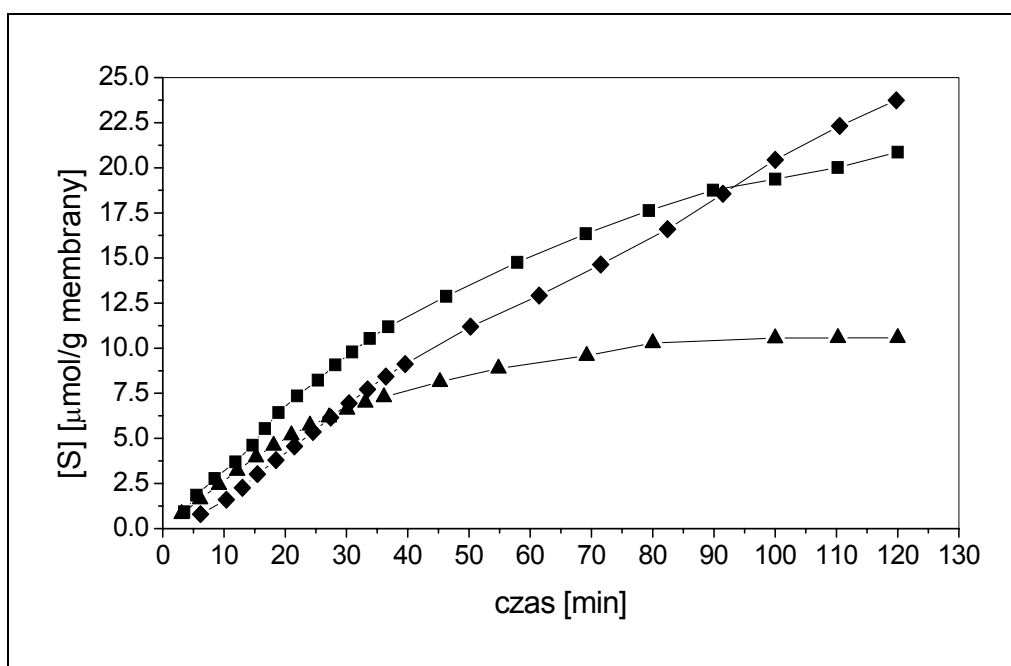
Wyraźne różnice pomiędzy sorpcją CIN i CID wykazały dalsze badania, Rys. 28. Membrany o różnej zawartości odcisków CIN wykonane z PAAN r1 równoważono kolejno roztworami CIN, a następnie CID. Aby ocenić wybiórczość wiązania alkaloidów do każdej z membran, obliczono współczynnik selektywności $\alpha_{\text{CIN/CID}}$. Okazało się, że CIN, która pozostawiła swoje odciski w strukturze polimerowej membrany, sorbowana była w większych ilościach, niż jej antypoda optyczna CID. Sorpcja CIN wynosiła 7.72, 6.62, 4.13 $\mu\text{mol/g}$ odpowiednio dla membran zawierających 0.4, 0.05 oraz 0 %wg wzorca. Pomimo, że membrana wiąże cząsteczki CIN, zdolna jest również do wiązania CID. Sorpcja CID osiągnęła poziom 5.52, 4.57 i 4.11 $\mu\text{mol/g}$ dla tych samych membran, jak w przypadku sorpcji CIN. Obliczony współczynnik selektywności dla obu membran przy niskim stężeniu odcisków molekularnych CIN (0.4 %wg i 0.05 %wg) to 1.40-1.45, zaś dla membrany kontrolnej wyniósł 1. Współczynniki wdrukowania cynchoniny $k_{\text{if CIN}}$ (imprint factor, PAAN r1_{0.4 %wg CIN} / PAAN r1_{bez CIN}) osiągnęły wartości 1.9 oraz 1.3 odpowiednio podczas filtracji roztworu CIN i CID, wskazując tym samym na wyraźne różnice pomiędzy membraną zawierającą odciski a membraną bez nich.



Rys. 28. Sorpcja alkaloidów w membranach PAAN r1 bez odcisków (CIN \triangle , CID \blacktriangle) i z odciskami CIN: 0.05 %wg (CIN \square , CID \blacksquare) i 0.4 %wg (CIN \circ , CID \bullet).

Druga faza badań z membranami afinitywnymi polegała na przepuszczaniu roztworów alkaloidów przez membrany. Tym razem do wdrukowania molekularnego wybrano cynchonidynę, CID.

Na Rys. 29. przedstawiono wykresy sorpcji CID podczas filtracji przez membranę bez odcisków jak i z odciskami molekularnymi, otrzymaną z kopolimeru PAAN r1. Nie sposób nie zauważyć, że ilość zatrzymanego alkaloidu na membranach ze „ślądami” CID jest o wiele wyższa w porównaniu z ilością na membranie kontrolnej. Ponownie używając równania kinetyki pierwszego rzędu obliczono maksymalne wysycenie badanych membran. Wynosiło ono 36.5, 25.5 oraz 11.8 $\mu\text{mol/g}$ dla membran przygotowanych odpowiednio w obecności 4 %wg, 2 %wg oraz bez dodatku CID. Ten wynik potwierdza dobrze znany już fakt, że liczba miejsc rozpoznających właściwe cząsteczki wzrasta ze stężeniem wzorca w polimerze [94, 95].



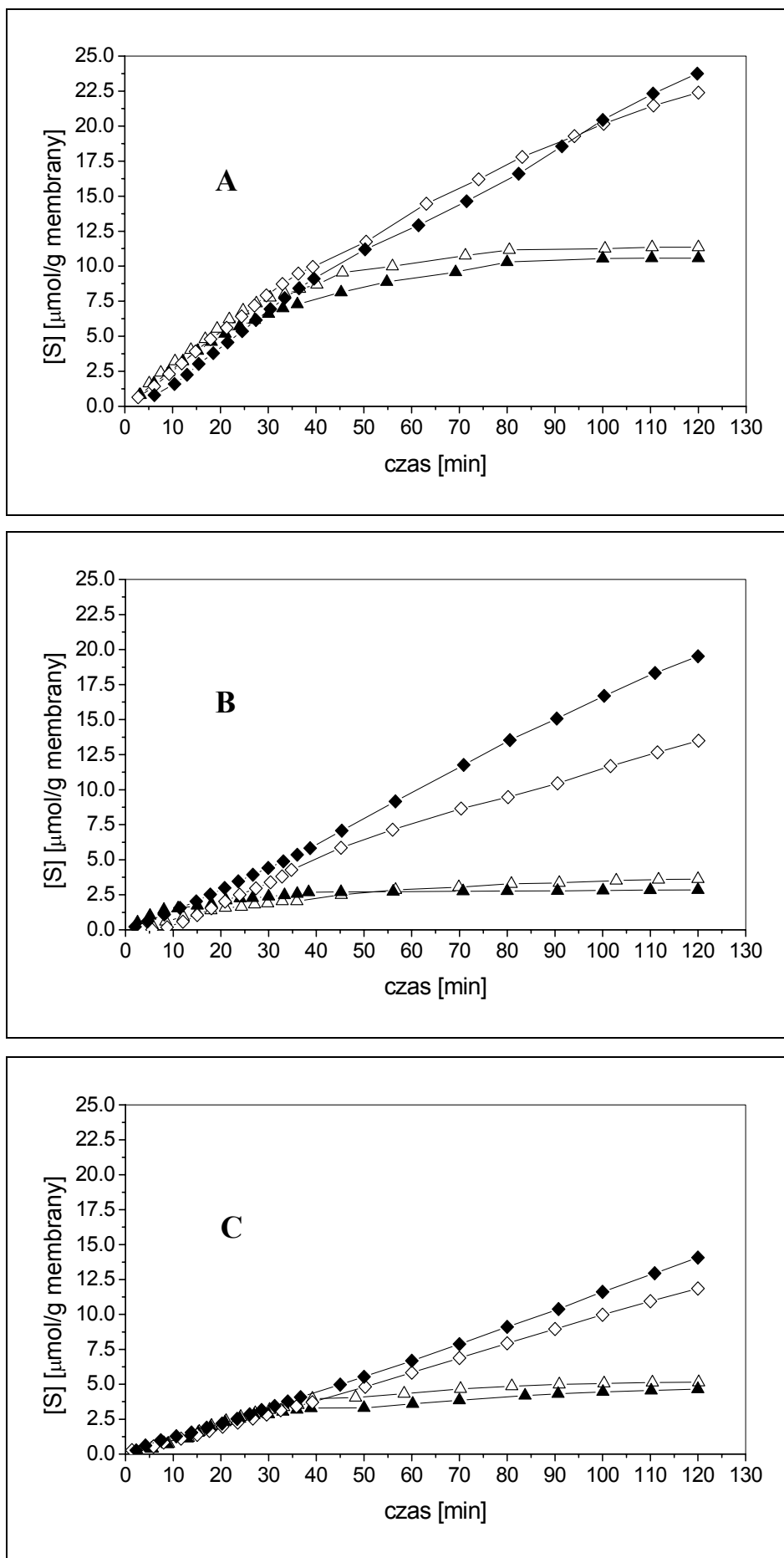
Rys. 29. Sorpcja CID w membranach PAAN r1 bez odcisków (▲) i z odciskami CID: 2 %wg (■) oraz 4 %wg (◆).

Kobayashi w swoich wcześniejszych badaniach zauważył, że wzrost ciężaru cząsteczkowego P[AN-co-AA], wynikający ze zwiększania frakcji AA w kopolimerze, przyczyniał się do lepszych właściwości sorpcyjnych membrany. Ponadto stwierdził on, że przekroczenie optymalnej zawartości kwasu akrylowego w układzie, powodowało

pogorszenie się tych właściwości [140]. Ciężar cząsteczkowy kopolimerów użytych w niniejszej pracy nie zależał jednak od składu ilościowego monomerów (ten pozostawał niezmienny), lecz od metody i warunków przeprowadzonej polimeryzacji. Membrana otrzymana z kopolimeru PAAN r1 z odciskami molekularnymi CID wykazywała lepsze właściwości sorpcyjne, Rys. 30A. Ilości zatrzymanych alkaloidów, CID i CIN, na tej membranie były o wiele większe, niż w przypadku innych badanych membran z PAAN. Zauważono z kolei, że wysycenie membran bez odcisków CID przez oba alkaloidy następowało po 80. minucie i w bardzo zbliżonych ilościach. Membrana uformowana z PAAN t w obecności 4 %wg CID już od pierwszych minut filtracji wykazywała swoistą enancjoselektywność, Rys. 30B. Preferencyjnie bowiem zatrzymywała CID, użytą jako wzorzec. Wydaje się, że zjawisko to w przypadku membrany z kopolimeru PAAN r1 (4 %wg CID) obserwowane będzie dopiero po około dwóch godzinach. Trzecia i ostatnia membrana przygotowana z PAAN r4, pomimo zwiększonego stężenia kopolimeru do 11 %wg, charakteryzowała się najgorszymi właściwościami, Rys. 30C. Wykazała najniższą zdolność zatrzymywania obu izomerów, a także słabo je różnicowała.

Każdorazowo analiza polegająca na przepuszczaniu przez membranę afinitywną roztworów izomerów z rodziny Cinchona trwała co najmniej dwie godziny. Po tym czasie możliwe było porównanie sorpcji alkaloidów na badanych membranach. W przypadku membrany z PAAN r1 sorpcja osiągnęła poziom 23.7 i 22.2 $\mu\text{mol/g}$ odpowiednio dla CID i CIN ($\alpha=1.07$). W membranie uformowanej z PAAN t wysycenie CID wyniosło 19.6 $\mu\text{mol/g}$, natomiast CIN 13.5 $\mu\text{mol/g}$ ($\alpha=1.45$). Ostatnia membrana z PAAN r4 sorbowała oba alkaloidy na poziomie 14.0 i 11.9 $\mu\text{mol/g}$ ($\alpha=1.18$). We wszystkich rodzajach membran dochodzi zatem do oddziaływania pomiędzy grupami funkcyjnymi cząsteczki alkaloidu i odcisku.

Interesujące wyniki otrzymano podczas sorpcji niespecyficzej na membranach bez odcisków molekularnych CID. W przypadku membrany otrzymanej z PAAN r1 sorpcja obu alkaloidów zredukowała się do 10.9 i 11.3 $\mu\text{mol/g}$ wobec CID i CIN ($\alpha=0.96$). Dla membrany z PAAN r4 wartość sorpcji spadła do poziomu 4.6 i 5.2 $\mu\text{mol/g}$ odpowiednio dla tych samych alkaloidów ($\alpha=0.88$). Jednakże, membrana otrzymana z kopolimeru PAAN t wykazała się najbardziej pożądaną sorpcją niespecyficzną zatrzymując CID na poziomie 2.8 $\mu\text{mol/g}$, natomiast CIN 3.6 $\mu\text{mol/g}$ ($\alpha=0.78$). Te różnice pomiędzy poszczególnymi membranami doskonale odzwierciedlają współczynniki wdrutowania cynchonidyny $k_{if\text{ CID}}$ zaprezentowane w Tabeli 16. Największe, a zarazem najkorzystniejsze dysproporcje obserwowane są podczas filtracji alkaloidów przez membrany PAAN t.



Rys. 30. Sorpcja alkaloidów w membranach bez odcisków: CID▲, CIN△ i w membranach z odciskami 4 %wg CID: CID◆, CIN◇; (A) 8 %wg PAAN r1, (B) 8 %wg PAAN t, (C) 11 %wg PAAN r4.

Tabela 16. Współczynniki wdrukowania CID k_{if} podczas filtracji roztworów CID i CIN

POLIMER	ROZTWÓR ALKALOIDU:	
	CID	CIN
	k_{if}	k_{if}
PAAN r1	2.2	2.0
PAAN t	7.0	3.8
PAAN r4	3.0	2.3

$$k_{if} = [S]_{m. z 4 \%wg CID} / [S]_{m. bez CID}$$

Podsumowując przedstawione badania afinitywnych membran typu MIP jednoznacznie można stwierdzić, iż najlepsze właściwości sorpcyjno-separacyjne posiada membrana otrzymana z kopolimeru PAAN t. Po trwającym dwie godziny procesie CID była sorbowana na niej w o wiele wyższym stopniu niż CIN. Mimo nie osiągnięcia przez żadną z membran satysfakcjonującej stereoselektywności powyżej 1.5 zaprezentowane rezultaty pokazały jednak jak ważny jest ciężar cząsteczkowy polimeru, którego użyto do formowania takich membran. Wydaje się zatem, że istnieje krytyczna wartość długości łańcucha kłęбка polimerowego, która wpływa na dokładną konstrukcję odcisku molekularnego z odpowiednio rozmieszczonymi grupami funkcyjnymi. Właściwa komplementarność pomiędzy cząsteczką substancji zatrzymywanej a odciskiem pozwala na separację izomerów optycznych. Niższą zdolnością rozpoznawania odpowiedniego enancjomeru cechują się odciski, w przypadku membran z kopolimerów PAAN r1 i PAAN r4. Pomimo, że sorbują one oba alkaloidy, jakość odcisków wydaje się gorsza. Nie wpływa to jednak na fakt, że omawiane membrany afinitywne charakteryzowały się indukowaną pamięcią, tym samym zdolne były do wiązania cząsteczek, które zostawiały swój odcisk lub też cząsteczek do nich podobnych.

Wciąż jednak pozostaje trudne znalezienie prostej zależności pomiędzy masą cząsteczkową P[AN-co-AA] a właściwościami dyskryminującymi membrany, choć ta relacja jest wyraźnie zauważalna. Poprawa jakości ultrafiltracyjnych membran typu MIP pod względem liczby frakcji prawidłowych odcisków i jak i ich selektywności wobec wzorca powinna być skorelowana z odpowiednią masą cząsteczkową i strukturą chemiczną kopolimeru.

6. PODSUMOWANIE

Zainicjowano badania i opanowano podstawowe techniki związane z otrzymywaniem i oceną właściwości sorbentów i membran z odciskami molekularnymi.

Poznano zdolność samoorganizacji kompleksów monomery-wzorzec, prekursorów kompleksów odcisk-wzorzec, powstających wskutek polimeryzacji mieszaniny reakcyjnej. Ustalono miejsca w cząsteczkach wzorców (cynchoniny i cynchonidyny), przy których dochodzi do oddziaływań wodorowych z monomerem funkcyjnym (kwasem metakrylowym). Oszacowano sumaryczne wartości energii tych wiązań.

Cynchoninę i cynchonidynę z powodzeniem wykorzystano do tworzenia odcisków molekularnych w matrycy polimerowej, otrzymując dwa typy membran – monolityczne, z odciskami w całej objętości oraz afinitywne, z odciskami zlokalizowanymi w warstwie powierzchniowej. Do tworzenia membran monolitycznych wykorzystano doświadczenia z syntezy sorbentów polimerowych. Otrzymywanie tych obiektów poszerzono o wnioski wypływające z modelowania kompleksów monomery-wzorzec.

Badano właściwości sorbentów oraz membran pod względem ich enancjoselektywności oraz właściwości sorpcyjno-separacyjnych. Stwierdzono, że sorbenty typu MIP mogą skutecznie rozpoznawać właściwy enancjomer. Membrany monolityczne charakteryzowały się z kolei różną przepuszczalnością i właściwościami selektywnego transportu wobec stosowanych enancjomerów. Właściwości sorpcyjno-separacyjne membran afinitywnych zależały natomiast od średniego ciężaru cząsteczkowego kopolimeru. Zauważono jednocześnie, że w testowanych układach indukowana pamięć molekularna zależała od obecności odpowiednio rozlokowanych grup funkcyjnych we wnętrzu odcisku.

Ustalono odpowiedni sposób usuwania wzorców z układów polimerowych przez właściwy dobór ekstrahenta. Usunięcie cząsteczek alkaloidów, znajdujących się we wnękach odcisków molekularnych, powodowało przywrócenie efektywności separacyjnej matrycy polimerowej.

Membrany z odciskami molekularnymi są potencjalnie cennymi obiektami w separacji mieszanin izomerów optycznych. Obok chromatografii cieczowej, krystalizacji frakcyjnej czy drogich metod enzymatycznych zastosowanie techniki molekularnego wdrukowania może się stać alternatywnym sposobem do rozdziału układów racemicznych.

7. WNIOSKI

1. Istnieje wiele możliwości tworzenia wiązań wodorowych między cząsteczką alkaloidu a kwasem metakrylowym. Liczba wszystkich możliwych kompleksów monomery-wzorzec, choć bardzo duża, zostaje ograniczona przeszkodami sterycznymi wzajemnego rozlokowania cząsteczek kwasu metakrylowego względem siebie oraz względem cząsteczki wzorca. W konsekwencji powstaje kompleks przedpolimeryzacyjny, w skład którego obok jednej cząsteczki wzorca, CIN lub CID, wchodzi trzy cząsteczki MAA.
2. Skład mieszaniny prepolimeryzacyjnej decyduje o typie odcisków molekularnych. Wprowadzanie karboksylowych grup funkcyjnych w matrycę polimerową oraz podwyższanie stężenia wzorca powoduje zwiększenie liczby miejsc rozpoznających odpowiednie cząsteczki. W badaniach chromatograficznych obserwuje się wyższe wartości współczynnika retencji k alkaloidów, gdy otrzymywany polimer z odciskami molekularnymi stanowi wypełnienie kolumn. Natomiast budując z takiego polimeru membrany lite zauważa się, że szybkości dyfuzji alkaloidów są zasadniczo mniejsze niż przez materiały otrzymane bez monomeru funkcyjnego. Wskazuje to na istotną rolę polarnych grup karboksylowych w tworzeniu centrów decydujących o rozdziale enancjomerów. Z kolei membrany afinitywne z indukowaną pamięcią efektywniej zatrzymują cząsteczki alkaloidu, użytego jako wzorzec (obserwuje się ogólny wzrost wartości współczynników enancjoselektywności α testowanych układów) wyłącznie wtedy gdy łańcuch zawiera ugrupowania karboksylowe.
3. Istnieje optymalny stosunek monomeru względem wzorca, dający polimery z odpowiednią selektywnością wiązania oraz stosunkowo wysoką specyficzną. Niewłaściwy stosunek prowadzi do powstawania mniej usieciowanych złóż (E iii 0.75 i E iii 0.7) a zbyt duże stężenie alkaloidu (E iv 0.9, E iv 0.8) powoduje prawdopodobnie kowalencyjne wbudowanie cząsteczek wzorca w sieć polimerową. W konsekwencji mamy do czynienia z zaburzeniem regularności sieci i niekorzystną sorpcją niespecyficzną.
4. Kopolimery zbudowane z monomerów MAA:EGDMA oraz AA:AN spełniają wymogi układów, w które z powodzeniem można wprowadzać odciski molekularne wzorców CIN lub CID. Późniejsze rozpoznawanie właściwych cząsteczek (sorpcja

- bądź dyfuzja) wywołane jest istnieniem oddziaływań wodorowych pomiędzy odpowiednio ułożonymi w przestrzeni grupami karboksylowymi łańcucha polimerowego a ugrupowaniem hydroksylowym oraz atomami azotu w cząsteczce alkaloidu. Obecne w polimerze ugrupowania polarne powodują właściwe ustawienie się transportowanych cząsteczek związku w odciskach molekularnych (selektywność medium).
5. Różny jest mechanizm rozdziału izomerów optycznych w poszczególnych mediach. W membranach monolitycznych (EGDMA/EGDMA:MAA) cząsteczki odciskanego wzorca dyfundują szybciej niż cząsteczki jego antypody. Jest to zjawisko przeciwne do efektów obserwowanych w separacji chromatograficznej, gdzie cząsteczki wzorca zostają zatrzymywane dłużej na kolumnie. Różnice te można tłumaczyć tym, że w separacji membranowej cząsteczka permeatu po zasorbowaniu na powierzchni membrany dyfunduje przez nią (mechanizm sorpcyjno-dyfuzyjny). W związku z tym pojawia się większa siła napędowa procesu transportu dla związku, którego ślad utrwalono w matrycy polimerowej. Z kolei w chromatografii separacja jest wynikiem licznych procesów sorpcji i desorpcji cząsteczek związku. W ich wyniku, cząsteczki komplementarne do odcisku poruszają się znacznie wolniej w kolumnie.
 6. Wzrost temperatury wydłuża czas retencji alkaloidu w kolumnie (współczynnik retencji k wzrasta). Jest to prawdopodobnie wywołane wpływem oddziaływań dyspersyjnych (podobieństwo MIP-ów do enzymów) oraz możliwości przebudowy cząsteczki alkaloidu i tworzenia przez nią silniejszych oddziaływań wodorowych z odciskiem.
 7. Różnice we właściwościach transportowych pomiędzy membranami monolitycznymi z odciskami CIN i CID są wynikiem wielu efektów. Zaliczyć do nich można różne stabilności obu kompleksów przedpolimeryzacyjnych oraz różnice w budowie obu typów membran (żelowa i porowata). Efekt ten pogłębiał się gdy zamiast EGDMA został użyty TEGDMA. Na obecnym etapie badań nie jest możliwe precyzyjne określenie wpływu każdego z tych elementów oddzielnie.
 8. W zależności od metody i warunków polimeryzacji, przy niezmiennym stosunku ilościowym AN i AA, otrzymujemy kopolimery różniące się ciężarem cząsteczkowym. Długość łańcucha polimerowego posiada istotny wpływ na dokładną

konstrukcję odcisku molekularnego z odpowiednio rozmieszczonymi karboksylowymi grupami funkcyjnymi. Obserwowana jest większa sorpcja na membranie z kopolimeru o największym ciężarze cząsteczkowym. Natomiast membrany z kopolimeru o średnim ciężarze cząsteczkowym cechuje najlepsza enancjoselektywność.

9. Przyłączanie cząsteczek alkaloidów do sorbentów i membran jest odwracalne a zdolności ich selektywnego wiązania są przywracane poprzez ponowny odpowiedni dobór ekstrahenta.

10. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdzają możliwość tworzenia membran typu MIP, potrafiących skutecznie rozpoznawać właściwy enancjomer, który zostawił swój ślad w matrycy polimerowej. Tym samym możliwy jest membranowy rozdział izomerów związków optycznie czynnych.

8. LITERATURA

- [1]. S. Loeb, S. Sourirajan, *Sea water demineralization by means of an osmotic membrane*, Adv. Chem. Ser., 38, 1963, 117
- [2]. L.A. Ultracki, *History of commercial polymer alloys and blends*, Polym. Eng. Sci., 35, 1995, 2
- [3]. K. Schneider, W. Holz, R. Wollbeck, *Membranes and modules for transmembrane distillation*, J. Membr. Sci., 39, 1988, 25
- [4]. R. Prasad, R.R. Bhave, A.K. Kiani, K.K. Sirkar, *Further studies on solvent extraction with immobilized interfaces in a microporous hydrophobic membrane*, J. Membr. Sci., 26, 1986, 79
- [5]. Z. Qi, E.L. Cussler, *Microporous hollow fibers for gas absorption*, J. Membr. Sci., 23, 1985, 321
- [6]. H.K. Lonsdale, *The growth of membrane technology*, J. Membr. Sci., 10, 1982, 81
- [7]. S.Z. Li, X.Y. Li, Z.F. Cui, D.Z. Wang, *Application of ultrafiltration to improve the extraction of antibiotics*, Sep. Purif. Technol., 34, 2004, 115
- [8]. M.A. Mehaia, M. Cheryan, *Lactic acid from whey permeate in a membrane recycle reactor*, Enzyme Microb. Technol., 8, 1986, 289
- [9]. H.C. van der Horst, J.H. Heneaaijer, *Cross-flow microfiltration in the food industry; state of the art*, Desalination, 77, 1990, 235
- [10]. A. Cassano, R. Molinari, M. Romano, E. Drioli, *Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane process. A review*, J. Membr. Sci., 181, 2001, 111
- [11]. I. Miesiąc, M. Kańska, *Recovery of hydrochloric acid from spent pickling liquors by diffusion dialysis*, Mat. 4. Konferencji Membrany i procesy membranowe w ochronie środowiska, 46, 2002, 321
- [12]. M.K. Turner, *Effective industrial membrane processes: benefits and opportunities*, Elsevier, London, 1991
- [13]. J. Howell, *The membrane alternative: energy implications for industry*, Elsevier Applied Science, London, New York, 1990
- [14]. V. Calabro, G. Pantano, M. Kang, R. Molinari, E. Drioli, *Experimental study on integrated membrane processes in the treatment of solutions simulating textile effluents. Energy and exergy analysis*, Desalination, 78, 1990, 257
- [15]. A.S. Jönsson, G. Trögörðh, *Ultrafiltration applications*, Desalination, 77, 1990, 135
- [16]. O.K. Buros, *Desalting practices in the United States*, Journal Am. Water Works Assoc., 81, 1989, 38
- [17]. W.J. Conlon, S.A. McClellan, *Membrane softening: a treatment process*, Journal Am. Water Works Assoc., 81, 1989, 47
- [18]. D. Vezzani, S. Bardini, *Donna equilibrium and dielectric exclusion for characterization of nanofiltration membranes*, Desalination, 149, 2002, 477
- [19]. J. Sójka-Ledakowicz, T. Koprowski, W. Machnowski, H. Knudsen, *Membrane filtration of textile dyehouse wastewater for technological water reuse*, Desalination, 119, 1998, 1
- [20]. M.Y. Jaffrin, *Biomedical application of membranes. Achievements and challenges*, Mat. 1. Konferencji Engineering with membranes, Granada, I, 2001, 8
- [21]. R. Ray, R. Wright, D. Newbold, S. McCray, D. Friesen, D. Brose, *Synergetic membrane-based hybrid separation systems*, J. Membr. Sci., 62, 1991, 349
- [22]. G. Wulff, A. Sarhan, *Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates*, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 11, 1972, 341
- [23]. B. Sellergren, *Molecularly imprinted polymers. Man made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam 2001
- [24]. <http://www.smi.tu-berlin.de>
- [25]. X. Huang, H. Zou, X. Chen, Q. Luo, L. Kong, *Molecularly imprinted monolithic stationary phases for liquid chromatographic separation of enantiomers and diastereomers*, J. Chromatogr. A, 984, 2003, 273
- [26]. S.C. Zimmerman, M.S. Wendland, N.A. Rakow, I. Zharov, K.S. Suslick, *Synthetic hosts by monomolecular imprinting inside dendrimers*, Nature, 418, 2002, 399

- [27]. G. Wulff, G. Kirstein, *Measuring the optical activity of chiral imprints in insoluble highly cross-linked polymers*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 1990, 684
- [28]. G. Wulff, *Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates – a way towards artificial antibodies*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 1995, 1812
- [29]. A.G. Mayes, K. Mosbach, *Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?*, *Trends Anal. Chem.*, 16, 1997, 321
- [30]. A. Rachkov, N. Minoura, *Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 2001, 255
- [31]. K. Haupt, K. Mosbach, *Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors*, *Chem. Rev.*, 100, 2000, 2495
- [32]. K. Mosbach, *Molecular imprinting*, *Trends in Biochem. Sci.*, 19, 1994, 9
- [33]. A. Sarhan, M.A. El-Zahab, *Racemic resolution of mandelic amid on polymers with chiral cavities. Enzyme-analogue stereospecific conversion configuration*, *Mikromol. Chem. Rapie Commun.*, 8, 1987, 555
- [34]. G. Wulff, B. Heine, G Helfmeier, *Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrices via a template approach*, *React. Polym.*, 6, 1987, 299
- [35]. D.H. Williams, J.P.L. Cox, A.J. Doig, M. Gardner, U. Gerhard, P. Kaye, A.R. Lal, I.A. Nicholls, C.J. Salter, J. Mitchell, *Towards the semiquantitative estimation of binding constants. Guides for peptide+peptide binding in aqueous solution*, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1991, 7020
- [36]. S.A. Piletsky, T.L. Panasyuk, E.V. Piletskaya, I.A. Nicholls, M. Ulbricht, *Receptor and transport properties of imprinted polymer membranes – a review*, *J. Membr. Sci.*, 157, 1999, 263
- [37]. I.A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarloo, J. Hedin-Dahlstrom, P. Jokela, J.G. Karlsson, L. Olofsson, J. Rosengren, S. Shoravi, J. Svenson, S. Wikman, *Can we rationally design molecularly imprinted polymers?*, *Anal. Chim. Acta*, 435, 2001, 9
- [38]. H.S. Andersson, A.-C. Koch-Schmidt, S. Ohlson, K. Mosbach, *Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers*, *J. Mol. Recog.*, 9, 1996, 675
- [39]. J. Matsui, I.A. Nicholls, T. Takeuchi, *Highly stereoselective molecularly imprinted polymer synthetic receptors for cinchona alkaloids*, *Tetrahedron: Asymm.*, 7, 1996, 1357
- [40]. J. Matsui, M. Okada, M. Tsuruoka, T. Takeuchi, *Solid phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor*, *Anal. Comm.* 34, 1997, 85
- [41]. M. Knutsson, H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *Novel cinchona alkaloid selective molecularly imprinted polymer artificial antibodies prepared using hydroxyl moiety based template recognition*, *J. Mol. Recog.*, 11, 1998, 87
- [42]. K. Sreenivasan, *Synthesis and evaluation of a beta cyclodextrin-based molecularly imprinted copolymer*, *J. Appl. Polym. Sci.*, 70, 1998, 15
- [43]. H.S. Andersson, O. Ramström, *Crown ethers as a tool for the preparation of molecularly imprinted polymers*, *J. Mol. Recog.*, 11, 1998, 103
- [44]. B. Sellergren, *Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions*, *Trends Anal. Chem.* 18, 1999, 164
- [45]. L.I. Andersson, *Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay*, *J. Chromatogr. B*, 739, 2000, 163
- [46]. T. Takeuchi, J. Haginaka, *Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers*, *J. Chromatogr. B*, 728, 1999, 1
- [47]. M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, *Molecular imprinting: from fundamentals to applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003
- [48]. M. Ulbricht, *Membrane separations using molecularly imprinted polymers*, *J. Chromatogr. B*, 804, 2004, 113
- [49]. I.A. Nicholls, L.I. Andersson, K. Mosbach, B. Ekberg, *Recognition and enantioselection of drugs and biochemicals using molecularly imprinted polymer technology*, *Trends Biotechnol.*, 13, 1995, 47
- [50]. C. Baggiani, F. Trotta, G. Giraudi, C. Giovannoli, A. Vanni, *A molecularly imprinted polymer for the pesticide bentazone*, *Anal. Commun.*, 36, 1999, 263

- [51]. F. Lanza, A.J. Hall, B. Sellergren, A. Berezki, G. Horvai, S. Bayouhd, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytion and nifedipine*, Anal. Chim. Acta, 435, 2001, 91
- [52]. K.D. Shimizu, *New methods of synthesizing and characterizing molecularly imprinted polymers*, Polymer Preprints, 44, 2003, 654
- [53]. J. Matsui, N. Minamimura, K. Nishimoto, K. Tamaki, N. Sugimoto, *Synthetic cinchonidine receptors obtained by cross-linking linear poly(methacrylic acid) derivative as an alternative molecular imprinting technique*, J. Chromatogr. B, 804, 2004, 223
- [54]. L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Molecular imprinting on microgel spheres*, Anal. Chim. Acta, 435, 2001, 187
- [55]. L. Ye, R. Weiss, K. Mosbach, *Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres*, Macromolecules 33, 2000, 8239
- [56]. L. Ye, I. Surugiu, K. Haupt, *Scintillation proximity assay using molecularly imprinted microspheres*, Anal. Chem. 74, 2002, 959
- [57]. B. Sellergren, *Imprinted dispersion polymers. A new class easily accessible affinity stationary phases*, J. Chromatogr. A, 673, 1994, 133
- [58]. G. Iberer, R. Hahn, A. Jungbauer, *Monoliths as stationary phases for separation of biopolymers: the fourth generation of chromatography sorbents*, LC-GC, 17, 1999, 998
- [59]. H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography*, J. Chromatogr. A, 954, 2002, 5
- [60]. D. Kriz, M. Kempe, K. Mosbach, *Introduction of molecularly imprinted polymers as recognition elements in conductometric chemical sensors*, Sensors Actuators B, 31, 1996, 178
- [61]. M.C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers*, Trends Anal. Chem., 23, 2004, 36
- [62]. M. McNiven, M. Kato, R. Levi, K. Yano, I. Karube, *Chloramphenicol sensor based on an in situ imprinted polymer*, Anal. Chim. Acta, 365, 1998, 69
- [63]. T.A. Sergeeva, H. Matuschewski, S.A. Piletsky, J. Bending, U. Schedler, M. Ulbricht, *Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from water by surface photo-grafting polymerization*, J. Chromatogr. A, 907, 2001, 89
- [64]. T. Pap, V. Horvath, A. Tolokan, G. Horvai, B. Sellergren, *Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction*, J. Chromatogr. A, 973, 2002, 1
- [65]. G. Wulff, *Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers*, Chem. Rev., 102, 2002, 1
- [66]. L.X. Liu, K. Mosbach, *Studies towards a tailor made catalyst for the Diels-Alder reaction using the technique of molecular imprinting*, Macromol. Rapid Commun., 18, 1997, 609
- [67]. P. Kafarski, B. Lejczak, *Chemia bioorganiczna*, Warszawa, PWN, 1994
- [68]. V.A. Davankov, *Chiral selectors with chelating properties in liquid chromatography: fundamental reflections and selective review of recent developments*, J. Chromatogr. A, 666, 1994, 55
- [69]. W.H. Pirkel, C.J. Welch, *An investigation into the role of solvation in a well characterized chiral recognition system*, J. Liq. Chromatogr., 14, 1991, 2027
- [70]. S. Allenmark, S. Andersson, *Some mechanistic aspects on chiral discrimination of organic acids by immobilized bovine serum albumin (BSA)*, Chirality, 4, 1992, 24
- [71]. A. Maruyama, K. Adachi, T. Taksutsuki, M. Torii, K. Sanui, N. Ogata, *Enantioselective permeation of α -amino acids through poly(aminoacid)-derived membrane*, Macromolecules, 23, 1990, 2748,
- [72]. J. Ceynowa, *Separation of racemic mixture by membrane method*, Chem. Analit., 43, 1998, 917
- [73]. A. Sengupa, R. Basu, R. Prasad, K.K. Sirkar, *Separation of liquid solutions by contained liquid membranes hollow fiber*, Separat. Sci. Technol., 23, 1988, 1735
- [74]. A. Sengupa, R. Basu, K.K. Sirkar, *Separation of solutes from aqueous-solutions by contained liquid membranes*, AIChE J., 34, 1988, 1698
- [75]. J.D. Lamb, M.D. Christenson, *Macrocyclic ligands in separations*, J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem., 32, 1998, 107

- [76]. W. Zielenkiewicz, O. Pieraszkiwicz, M. Wszelaka-Rylik, M. Pieraszkiwicz, G. Roux-Desgranges, A.H. Roux, J.P.E. Grolier, *Molecular interaction of macrocycles with dipeptides in aqueous solutions. Partial molar volumes and heat capacities of transfer of a chiral 18-crown-6 and of a calix[4]resorcinarene derivative from water to aqueous dipeptide solutions at 25°C*, J. Sol. Chem., 27, 1998, 120
- [77]. M. Bryjak, P. Wieczorek, P. Kafarski, B. Lejczak, *Transport of amino acids and their phosphonic acid analogues through supported liquid membranes containing macrocyclic carriers*, J. Membr. Sci., 56, 1991, 167
- [78]. H.M. Krieg, J.C. Breytenbach, K. Keizer, *Chiral resolution by β -cyclodextrin polymer-impregnated ceramic membranes*, J. Membr. Sci., 164, 2000, 177
- [79]. M. Barboiu, C. Luca, C. Guizard, N. Hovnanian, L. Cot, G. Popescu, *Hybrid organic-inorganic fixed site dibenzo 18-crown-6 complexant membranes*, J. Membr. Sci., 129, 1997, 197
- [80]. M. Kempe, K. Mosbach, *Binding studies on substrate and enantioselective molecularly imprinted polymers*, Anal. Lett., 24, 1991, 1137
- [81]. S.A. Piletsky, I.Y. Dubey, D.M. Fedoryak, V.P. Kukhar, *Substrate-selective polymeric membranes. Selective transfer of nucleic acid components*, Biopolym. Kletka 6, 1990, 55
- [82]. S. Marx-Tibbon, I. Willner, *Photostimulated polymers: A light-regulated medium for transport of amino acids*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1994, 1261
- [83]. T.A. Sergeeva, S.A. Piletsky, A.A. Brovko, L.A. Slinchenko, L.M. Sergeeva, T.L. Panasyuk, A.V. El'skaya, *Conductometric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes*, Analyst, 124, 1999, 331
- [84]. J. Mathew-Krotz, K.J. Shea, *Imprinted polymer membranes for the selective transport of targeted neutral molecules*, J. Am. Chem. Soc., 118, 1996, 8154
- [85]. S.A. Piletsky, T.L. Panasyuk, E.V. Piletskaya, A.V. El'skaya, R. Levi, I. Karube, G. Wulff, *Imprinted membranes for sensor technology: opposite behavior of covalently and noncovalently imprinted membranes*, Macromolecules 31, 1998, 2137
- [86]. A. Dzgoev, K. Haupt, *Enantioselective molecularly imprinted polymer membranes*, Chirality, 11, 1999, 465
- [87]. J.-M. Hong, P.E. Anderson, J. Qian, C.R. Martin, *Selectively-permeable ultrathin film composite membranes based on molecularly-imprinted polymers*, Chem. Mater., 10, 1998, 1029
- [88]. M. Yoshikawa, J. Izumi, T. Kitao, S. Koya, S. Sakamoto, *Molecularly imprinted polymeric membranes for optical resolution*, J. Membr. Sci., 108, 1995, 171
- [89]. M. Yoshikawa, J. Izumi, T. Kitao, *Enantioselective electrodialysis of amino acids with charged polar side chains through molecularly imprinted polymeric membranes containing DIDE derivatives*, Polym. J., 29, 1997, 2005
- [90]. M. Yoshikawa, A. Shimada, J. Izumi, *Novel polymeric membranes having chiral recognition sites converted from tripeptide derivatives*, Analyst, 126, 2001, 775
- [91]. M. Yoshikawa, J. Izumi, T. Kitao, S. Sakamoto, *Alternative molecularly imprinted polymeric membranes from tetrapeptide residue consisting of D- or L- amino acids*, Macromol. Rapid Commun., 18, 1997, 76
- [92]. M. Yoshikawa, J. Izumi, T. Ooi, T. Kitao, M.D. Guiver, G.P. Robertson, *Carboxylated polysulfone membranes having a chiral recognition site induced by an alternative molecular imprinting technique*, Polym. Bull., 40, 1998, 517
- [93]. T. Kobayashi, H.Y. Wang, N. Fujii, *Molecular imprinting of theophylline in acrylonitrile-acrylic acid co-polymer membrane*, Chem. Lett., 10, 1995, 927
- [94]. H.Y. Wang, T. Kobayashi, N. Fujii, *Molecular imprint membranes prepared by the phase inversion technique*, Langmuir, 12, 1996, 4850
- [95]. F. Trotta, E. Drioli, C. Baggiani, D. Lacopo, *Molecular imprinted polymeric membrane for naringin recognition*, J. Membr. Sci., 201, 2002, 77
- [96]. F. Trotta, C. Baggiani, M.P. Luda, E. Drioli, T. Massami, *A molecular imprinted membrane for molecular discrimination of tetracycline hydrochloride*, J. Membr. Sci., 254, 2005, 13
- [97]. M. Yoshikawa, T. Ooi, J. Izumi, *Alternatively molecularly imprinted membranes from a derivative of natural polymer, cellulose acetate*, J. Appl. Polym. Sci., 72, 1999, 493
- [98]. P. Reddy, T. Kobayashi, N. Fujii, *Recognition characteristic of dibenzofuran by molecularly imprinted polymers made of common polymers*, Eur. Polym. J., 38, 2002, 779

- [99]. M. Ramamoorthy, M. Ulbricht, *Molecular imprinting of cellulose acetate-sulfonated polysulfone blend membranes for Rhodamine B by phase inversion technique*, J. Membr. Sci., 217, 2003, 207
- [100]. Y. Kondo, M. Yoshikawa, *Effect of solvent composition on chiral recognition ability of molecularly imprinted DIDE derivatives*, Analyst, 126, 2001, 781
- [101]. H.Y. Wang, T. Kobayashi, N. Fuji, *Surface molecular imprinting on photosensitive dithiocarbamoyl polyacrylonitrile membrane using photo graft polymerization*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 70, 1997, 355
- [102]. S.A. Piletsky, H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, E.V. Piletskaya, T.A. Thiele, M. Ulbricht, *Surface functionalization of porous polypropylene membranes with molecularly imprinted polymers by photograft copolymerization in water*, Macromolecules 33, 2000, 3092
- [103]. L. Donato, A. Figoli, E. Drioli, *Novel composite poly(4-vinylpyridine)/polypropylene membranes with recognition properties for (S)-naproxen*, J. Pharm. Biomed. Anal., 37, 2005, 1003
- [104]. M. Ulbricht, M. Belfer, U. Langenhangen, F. Schneider, W. Weigel, *Novel molecularly imprinted polymer (MIP) composite membranes via controlled surface and pore functionalizations*, Desalination, 149, 2002, 293
- [105]. C.R. Martin, M. Nishizawa, K. Jirage, M. Kang, *Investigation of the transport properties of gold nanotubule membranes*, J. Phys. Chem. B, 105, 2001, 1925
- [106]. T. Lipiec, Z.S. Szmal, *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*, PZWL, Warszawa 1978, 458
- [107]. S.K. Ray, S.B. Sawant, J.B. Joshi, V.G. Pangarkar, *Dehydration of acetic by pervaporation*, J. Membr. Sci., 138, 1998, 1
- [108]. Y.M. Lee, B.-K. Oh, *Dehydration of water-pyridine mixture through poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) membrane by pervaporation*, J. Membr. Sci., 98, 1995, 183
- [109]. M.S. Oak, T. Kobayashi, Y.W. Hong, T. Fukaya, N. Fujii, *pH effect on molecular size exclusion of polyacrylonitrile ultrafiltration membranes having carboxylic acid groups*, J. Membr. Sci., 123, 1997, 185
- [110]. Z.-K. Xu, R.-Q. Kou, Z.-M. Liu, F.-Q. Nie, Y.-Y. Xu, *Incorporating α -allyl glucoside into polyacrylonitrile by water-phase precipitation copolymerization to reduce protein adsorption and cell adhesion*, Macromolecules 36, 2003, 2441
- [111]. A. Bottino, G. Capannelli, S. Munari, *Effect of coagulation medium on properties of sulfonated polyvinylidene fluoride membranes*, J. Appl. Polym. Sci., 30, 1985, 3009
- [112]. T. Kobayashi, H.Y. Wang, T. Fukaya, N. Fujii, *Molecular imprinted membranes prepared by phase inversion of polyacrylonitrile copolymers containing carboxylic acid groups*, J. Membrane Sci., 86, 1994, 188
- [113]. M. Bryjak, I. Garncarz, A. Krajciewicz, J. Pięłowski, *Air plasma treatment of polyacrylonitrile porous membrane*, Angew. Makromol. Chem., 234, 1996, 21
- [114]. J.S. Glasby, *Encyclopedia of the alkaloids*, Plenum Press, New York, London, 1975
- [115]. B.J. Oleksyn, A. Suszko-Purzycka, G. Dive, J. Lamotte-Brasseur, *Molecular properties of Cinchona alkaloids: a theoretical approach*, J. Pharm. Sci., 81, 1992, 122
- [116]. T.R. Kinsley-Scott, S.A. Norton, *Useful plants of dermatology. VII: Cinchona and antimalarials*, J. Am. Acad. Dermatol., 49, 2003, 499
- [117]. J.M. Karle, A.K. Bhattacharjee, *Stereoelectronic features of the cinchona alkaloids determine their differential antimalarial activity*, Bioorg. Med. Chem., 7, 1999, 1769
- [118]. H.S. Bukhtiar, Z. Nawaz, S.S. Virani, J.Q. Ali, S.A. Saeed, A.H. Gilani, *The inhibitory effect of cinchonine on human platelet aggregation due to blockade of calcium influx*, Biochem. Pharmacol., 56, 1998, 955
- [119]. S. Levy, S. Azoulay, *Stories about the origin of quinidina and quinidine*, J. Cardiovascul. Electrophysiol., 5, 1994, 635
- [120]. P. Genne, M.T. Dimanche-Boitrel, R.Y. Mauvernay, G. Gutierrez, O. Duchamp, J.M. Petit, F. Martin, B. Chauffert, *Cinchonine, a potent efflux inhibitor to circumvent anthracycline resistance in vivo*, Cancer Res., 52, 1992, 2797
- [121]. O. Kuhlmann, H.S. Hofmann, S.P. Müller, M. Weiss, *Pharmacokinetics of idarubicin in the isolated perfused rat lung: effect of cinchonine and rutin*, Anti-Cancer Drug, 14, 2003, 411

- [122]. T.S. Brima, *Manufacture of gamma-crotonolactone by carbonylation of glycidol*, Chem. Austr., 114, 1991, 185246y
- [123]. I.A. Nicholls, *Thermodynamic considerations for the design of and ligand recognition by molecularly imprinted polymers*, Chem. Lett., 1995, 1035
- [124]. H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *Spectroscopic evaluation of molecular imprinting polymerization systems*, Bioorganic Chemistry, 25, 1997, 203
- [125]. <http://www.monoliths.com>
- [126]. J. Matsui, O. Doblhoff-Dier, T. Takeuchi, *Atrazine-selective polymer prepared by molecular imprinting technique*, Chem. Lett., 489, 1995
- [127]. O. Ramström, I.A. Nicholls, K. Mosbach, *Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers*, Tetrachedron: Asymm., 5, 1994, 649
- [128]. B. Sellergren, K.J. Shea, *Origin of peak asymmetry and the effect of temperature on solute retention in enantiomer separations on imprinted chiral stationary phases*, J. Chromatogr. A, 690, 1995, 29
- [129]. R. Kielczyński, M. Bryjak, *Molecularly imprinted membranes for cinchona alkaloids separation*, Sep. Purif. Technol., 41, 2005, 231
- [130]. B. Sellergren, *Making the most of MIPs*, Trends Anal. Chem., 22, 2003, xii
- [131]. R.D. Noble, *Generalized microscopic mechanism of facilitated transport in fixed site carrier membranes*, J. Membr. Sci., 75, 1992, 121
- [132]. P. Cormak, A.Z. Elorza, *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization*, J. Chromatogr. B, 804, 2004, 173
- [133]. M. Yoshikawa, J. Izumi, T. Kitao, *Enantioselective electro dialysis of N- α -acetyltryptophans through molecularly imprinted polymeric membranes*, Chem. Lett., 8, 1996, 611
- [134]. T. Kobayashi, T. Fukaya, M. Abe, N. Fujii, *Phase inversion molecular imprinting by using template copolymers for high substrate recognition*, Langmuir, 18, 2002, 2866
- [135]. P. Reddy, T. Kobayashi, M. Abe, N. Fujii, *Molecular imprinted Nylon-6 as a recognition material of amino acids*, Eur. Polym. J., 38, 2002, 521
- [136]. N. Fu-Qiang, X. Zhi-Kang, W. Lin-Shu, Y. Peng, W. Jian, *Acrylonitrile-based copolymers containing reactive groups: synthesis and preparation of ultrafiltration membranes*, J. Membr. Sci., 230, 2004, 1
- [137]. R. Kielczyński, F. Trotta, M. Bryjak, *Phase inversion molecular imprinted membranes*, Mat. 5. Konferencji Membrany i procesy membranowe w ochronie środowiska, 22, 2004, 379
- [138]. R. Kesting, M.K. Barsh, A. Vincent, *Semipermeable membranes of cellulose acetate for desalination in the process of reverse osmosis*, J. Appl. Polym. Sci., 9, 1965, 1873
- [139]. H.Y. Wang, S.L. Xia, H. Sun, Y.K. Liu, S. K. Cao, T. Kobayashi, *Molecularly imprinted copolymer membranes functionalized by phase inversion imprinting for uracil recognition and permselective binding*, J. Chromatogr. B, 804, 2004, 127
- [140]. T. Kobayashi, H.Y. Wang, N. Fujii, *Molecular imprint membranes of polyacrylonitrile copolymers with differ acrylic acid segments*, Anal. Chim. Acta, 365, 1998, 81
- [141]. C.J. Pouchert, *The Aldrich library of infrared spectra*, 3rd ed., Milwaukee, 1981
- [142]. DMS. *Working atlas of infrared spectroscopy*, Butterworth & Co., London, 1972
- [143]. R.J. LeBlanc, W. Chu, C.T. Williams, *Surface Raman characterization of cinchonine-modified platinum in ethanol: effects of liquid-phase concentration and co-adsorbed hydrogen*, J. Mol. Catal. A, 212, 2004, 277
- [144]. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, *Spectrometric identification of organic compound*, 4th ed., Jon Wiley, New York, 1991, 183
- [145]. C.W. Cheung, J.F. Porter, G. McKay, *Sorption kinetics for the removal of copper and zinc from effluents using bone char*, Sep. Purif. Technol., 28, 1999, 87
- [146]. Y.S. Ho, G. McKay, *The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat*, Water Res., 34, 200, 735

Spis treści

1. STRESZCZENIE PRACY.....	4
2. CEL PRACY.....	8
3. OMÓWIENIE LITERATURY.....	9
3.1. Wstęp - membrany i technologie membranowe.....	9
3.2. Polimery z odciskami molekularnymi.....	12
3.2.1. Stan obecny.....	12
3.2.2. Technika wdrukowania molekularnego.....	15
3.2.3. Czynniki wpływające na właściwości polimerów negatywowych.....	20
3.2.4. Pole zastosowań MIP.....	23
3.3. Membrany w separacji związków optycznie czynnych.....	24
3.4. Membrany typu MIP – otrzymywanie, transport oraz właściwości separacyjne.....	26
3.4.1. Membrany tworzone przez polimeryzację <i>in situ</i>	26
3.4.2. Membrany tworzone przez inwersję faz.....	28
3.4.3. Membrany szczepione powierzchniowo.....	30
3.5. Przyszłość membran MIP.....	32
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	34
4.1. Odczynniki.....	34
4.2. Aparatura.....	35
4.3. Tworzenie kompleksów wzorzec-monomery.....	36
4.3.1. Miareczkowanie.....	36
4.3.2. Modelowanie oddziaływań.....	36
4.4. Złoża chromatograficzne zawierające odciski molekularne.....	37
4.4.1. Przygotowanie wypełnień chromatograficznych.....	37
4.4.2. Usuwanie wzorca.....	38
4.4.3. Charakterystyka złożeń chromatograficznych.....	38
4.4.3.1. Oznaczanie zawartości chloru metoda Volharda.....	38
4.4.3.2. Sprawność rozdzału - dobór fazy mobilnej.....	38
4.4.3.3. Wyznaczanie współczynnika selektywności.....	39
4.5. Membrany monolityczne z odciskami molekularnymi.....	40
4.5.1. Synteza membran.....	40
4.5.2. Usuwanie wzorca z membrany.....	41
4.5.3. Charakterystyka membran.....	41
4.5.3.1. Zdolność separacyjna.....	41
4.5.3.2. Wyznaczanie współczynnika selektywności.....	42
4.6. Membrany afinitywne z odciskami molekularnymi.....	43
4.6.1. Synteza kopolimeru poli(akrylonitryl-co-kwas akrylowy).....	43
4.6.1.1. Kopolimeryzacja emulsyjna.....	43
4.6.1.2. Kopolimeryzacja w roztworze.....	43
4.6.1.3. Wiskozymetria.....	44
4.6.2. Formowanie membran.....	45
4.6.3. Charakterystyka membran.....	46
4.6.3.1. Wyznaczanie średnich wielkości porów.....	46
4.6.3.2. Mikroskopia AFM.....	46
4.6.3.3. Identyfikacja metodą spektroskopii IR.....	46
4.6.3.4. Usuwanie wzorca z membrany.....	47
4.6.3.5. Równoważenie membran.....	47
4.6.3.6. Filtracja przez membrany.....	47
4.6.3.7. Wyznaczanie współczynników selektywności i wdrukowania.....	48

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	49
5.1. Skład kompleksu wzorzec-monomery i jego zdolność do samoorganizacji.....	49
5.2. Złoża chromatograficzne zawierające odciski molekularne.....	61
5.3. Membrany monolityczne z odciskami molekularnymi.....	70
5.4. Membrany afinitywne z odciskami molekularnymi.....	80
6. PODSUMOWANIE	96
7. WNIOSKI	97
8. LITERATURA	100