

ПОЛУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННОГО ПОЛИМЕРА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИЗОЛИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНОФЕНОНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

А.В. Воронин

д.фарм.н., доцент,
ФГБОУ «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (Самара)

И.В. Сынбулатов

аспирант,
ФГБОУ «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (Самара)
E-mail: i.v.synbulatov@samsmu.ru

Цель работы. Получение сорбента, представляющего собой молекулярно импринтированный полимер на основе производных акриловой кислоты, селективного к соединениям класса пирролидинофенонов.

Материал и методы. Сорбенты получали методом радикальной полимеризации метакриловой кислоты, акриламида, N,N'-метилен-бис-акриламида, диаллиламина в присутствии темплата (молекулы-шаблона) – фенилпирацетама. При получении варьировали количеством используемого акриламида и N,N'-метилен-бис-акриламида. Для полученных сорбентов определяли степень набухания в воде и изопропиловом спирте, импринтинг-фактор, коэффициент перекрестного реагирования и степень извлечения фенилпирацетама из водных растворов.

Результаты. Исследование степени набухания полученных сорбентов показало, что объемное набухание в воде и органических растворителях повышается при увеличении содержания акриламида и уменьшении N,N'-метилен-бис-акриламида. Объемное набухание в воде всех полученных сорбентов ниже, чем в изопропиловом спирте, что позволяет использовать их для сорбции анализируемых веществ из водной среды и последующей десорбции. Величина импринтинг-фактора по фенилпирацетаму для образца сорбента, содержащего 56% акриламида, была на 47% выше, чем для образца, содержащего 44% акриламида. Низкая величина импринтинг-фактора всех образцов сорбентов при исследовании циннаризина и амитриптилина свидетельствует о том, что полученные сорбенты содержат «молекулярные отпечатки» темплата – фенилпирацетама. Вышеуказанные образцы сорбента способны распознавать фенилпирацетам в бинарных смесях, что подтверждает наличие центров селективного связывания. Степень извлечения фенилпирацетама из водных растворов с использованием образца сорбента, содержащего 56% акриламида, составила $89 \pm 17\%$. Исследование структуры вышеуказанного образца сорбента методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием выявило наличие выраженных пиков при 1451, 1660, 2934, 3198, 3343 см^{-1} , что свидетельствует о наличии карбоксимодифицированной полиакриламидной матрицы сорбента.

Выводы. Получен молекулярно импринтированный полимер на основе производных акриловой кислоты, который является стабильным в водной среде и изопропиловом спирте. Данный полимерный сорбент проявляет высокий уровень селективности к производным пирролидинофенона, что доказано в эксперименте с модельным соединением фенилпирацетамом. Данный полимерный сорбент может быть использован для пробоподготовки биологических жидкостей при исследовании на производные пирролидинофенона.

Ключевые слова: производные пирролидинофенона, твердофазная экстракция, молекулярно импринтированные полимеры, фенилпирацетам, судебно-химическая экспертиза.

Для цитирования: Воронин А.В., Сынбулатов И.В. Получение молекулярно импринтированного полимера на основе производных акриловой кислоты для изолирования производных пирролидинофенона из биологических жидкостей. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(12):18–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-12-03>

В настоящее время актуальной проблемой судебно-химической экспертизы и химико-токсикологического анализа является изолирование производных пирролидинофенона из биологических жидкостей. Невысокий уровень концентрации производных пирролидинофенона в биологических жидкостях (в плазме крови до 200 нг/мл) и необходимость концентрирования практически исключают возможность применения жидкость-жидкостной

экстракции (ЖЖЭ) для проведения пробоподготовки. Подготовка проб с применением ферментативного гидролиза и твердофазной экстракции (ТФЭ) позволяет добиться получения низких пределов обнаружения для нативных веществ и «маркерных» метаболитов (до 0,5 и 1,0 нг/мл для α -пирролидиновалерофенона (α -ПВП) и 3,4-метилендиоксипировалерона (МДПВ) соответственно) при использовании малых объемов проб биологических

жидкостей, однако достаточно сложная техника пробоподготовки и дорогостоящие расходные материалы препятствуют широкому использованию этого метода в рутинной практике [1]. Одним из вариантов решения данной проблемы является применение в качестве сорбентов для ТФЭ молекулярно импринтированных полимеров.

Молекулярно импринтированные полимеры (МИП) представляют собой полимеры, полученные из функциональных мономеров и сшивающего агента вокруг молекул-шаблонов (темплатов). Функциональные мономеры обеспечивают взаимодействие с темплатом, которое может быть ковалентным или нековалентным (образование водородных связей, электростатические силы, Ван-дер-Ваальсовы связи). Поры в структуре МИП имеют комплементарность к темплату, в качестве которого может выступить либо целевое анализируемое вещество, либо модельное химическое соединение близкое по структуре и воспроизводящее свойства анализируемого вещества [2].

Производные пирролидинофенона имеют статус наркотических средств, они включены в Список I Перечня и не могут широко применяться в качестве темплатов в лабораторном эксперименте [3]. Анализ *in silico* физико-химических и биологических свойств α -ПВП, МДПВ и их метаболитов позволил предложить фенилпираретам (ФП) в качестве модельного соединения, способного заменить α -ПВП, МДПВ и их аналоги в качестве темплата при синтезе МИП[4].

Цель работы – получение сорбента, представляющего собой молекулярно импринтированный полимер на основе производных акриловой кислоты и диаллиламина, селективного к соединениям класса пирролидинофенонов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве функциональных мономеров при синтезе полимера были выбраны метакриловая кислота (МАК) и диаллиламин (ДАА), а сшивающим агентом выступает N,N'-метилен-бисакриламид (МБАА). Функциональные мономеры и сшивающий агент подобраны на основании литературных данных, из которых следует, что компоненты способны вступать в реакцию радикальной полимеризации и формировать при этом поры комплементарные темплату. В качестве структурного мономера выбран акриламид (АА), что обусловлено его способностью вступать в реакцию радикальной полимеризации [5]. При этом акриламид не будет вступать во взаимодействие с темплатом и образовавшийся полиакриламид выступит в роли «подложки», которая будет удерживать сформированные поры. В качестве темплата использовали ФП. Соотношение компонентов, используемых для синтеза сорбентов, представлено в табл. 1. При получении сорбентов варьировали количеством структурного и сшивающего мономеров. В качестве инициаторов радикальной полимеризации использовали персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТМЭД).

Таблица 1. Соотношение компонентов при получении молекулярно импринтированных полимерных сорбентов

Сорбент, образец №	МАК, г	АА, г	ДАА, г	МБАА, г	ФП, г
1	0,25	0,25	0,25	1,25	0,25
2	0,25	0,5	0,25	1,0	0,25
3	0,25	0,75	0,25	0,75	0,25
4	0,25	1,0	0,25	0,5	0,25
5	0,25	1,25	0,25	0,25	0,25

Синтез сорбентов. ФП и АА растворяют в 25 мл воды очищенной при температуре 40 °С. К полученному раствору прибавляют МАК и ДАА и оставляют на 20 мин. К полученной смеси прибавляют МБАА, персульфат аммония, ТМЭД и перемешивают в течение 15 мин. Полученную смесь охлаждают до полной полимеризации при температуре 8 °С.

Полученный полимер измельчают, промывают изопропиловым спиртом и хлороформом для удаления темплата из пор полимера, после чего высушивают при комнатной температуре до постоянной массы и повторно измельчают полученный сорбент до размеров частиц 500 мкм. Параллельно получают полимер сравнения по аналогичной методике, без добавления ФП.

Определение характеристик полученных сорбентов. Определение объемного набухания полученных сорбентов в воде и изопропиловом спирте проводили по методике [6]. Для расчета использовали формулы:

$$Q_v = \frac{V_n}{V_c} \times 100\%, \quad Q_{ипс} = \frac{V_n}{V_c} \times 100\%,$$

где Q_v и $Q_{ипс}$ – степень набухания сорбента в воде и изопропиловом спирте соответственно, %; V_n – объем набухшего сорбента, см³; V_c – объем сухого сорбента, см³.

Оценку селективности полученных сорбентов проводили путем сравнения значений импринтинг-фактора (IF) и коэффициентов перекрестного реагирования (PP , %), рассчитанные по формулам

$$IF = \frac{\Delta A_{мин}}{\Delta A_{ис}},$$

$$PP = \frac{\Delta A_{ав}}{\Delta A_{фп}} \times 100\%,$$

где $\Delta A_{мин}$ – интенсивность сигнала масс-детектора для элюата, полученного после сорбции компонента на сорбенте с ФП; $\Delta A_{ис}$ – интенсивность сигнала масс-детектора для элюата, полученного после сорбции компонента на полимере сравнения; $A_{ав}$ и $A_{фп}$ – интенсивность сигнала масс-детектора для элюата при исследовании веществ других химических групп и ФП соответственно.

Для оценки способности сорбента к перекрестному реагированию с другими лекарственными веществами использовали циннаризин и амитриптилин. Для измерения интенсивности сигнала масс-детектора получали элюаты следующим образом: 1 мл водных растворов ФП, циннаризина и амитриптилина с концентрацией 500 нг/мл пропускают через колонку с подготовленным сорбентом (100 мг) и элюируют 10 мл воды. Полученный элюат I отбрасывают, колонку высушивают при комнатной температуре. Затем колонку элюируют 2 мл изопропилового спирта, элюат II собирают и упаривают в токе азота при температуре не выше 40 °С, сухой остаток реконструируют 2 мл этилацетата.

Хромато-масс-спектрометрический анализ элюатов проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890 с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 в режиме селективного ионного мониторинга: 104, 160, 174 (ФП); 201, 167, 251 (циннаризин); 50, 204, 214 (амитриптилин). Разделение компонентов пробы

проводили по методике, используемой для скрининга лекарственных веществ [7].

Количественную оценку содержания ФП, циннаризина и амитриптилина в элюате II проводили методом внутреннего стандарта с применением раствора дифениламина с концентрацией 1 мг/мл в метаноле. Рабочие диапазоны составили: для ФП 50–2000 нг/мл, для циннаризина 100–2500 нг/мл, амитриптилина 50–3000 нг/мл. Содержание анализируемых веществ рассчитывали по результатам 10 параллельных определений.

Определение степени извлечения ФП ($СИ$, %) осуществляли по вышеописанной методике, расчет проводили по формуле

$$СИ = \frac{\bar{X}_1}{\bar{X}_2} \times 100\%,$$

где \bar{X}_1 – концентрация ФП в пробе, наносимой на сорбент, нг/мл; \bar{X}_2 – концентрация ФП в элюате II, нг/мл.

Структурный анализ сорбентов проводили методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием на спектрометре Agilent Technologies Cary 630 FTIR. Исследование выполняли в соответствии с методикой ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области» для твердых веществ [8]. Идентификацию структурных фрагментов полимера проводили с использованием библиотеки ИК-спектров Agilent Polymer Handheld ATR Library программного обеспечения Agilent MicroLab Expert, версии 1.0.0.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важной характеристикой сорбентов, предназначенных для ТФЭ, является их набухание в воде и органических растворителях. На рис. 1 и 2 представлены зависимости объемного набухания сорбентов от содержания АА и МБАА. Объемное набухание полученных сорбентов в воде и изопропиловом спирте повышается при увеличении содержания АА и уменьшении МБАА.

Данная особенность обусловлена получением более жесткой структуры матрицы сорбента за счет увеличения поперечных сшивок фрагментом МБАА. Объемное набухание в воде всех полученных образцов сорбента было ниже, чем в изопропиловом спирте, что обеспечивает сорбцию анализируемых веществ из водной среды и последующую десорбцию органическим растворителем за счет изменения площади поверхности сорбента.

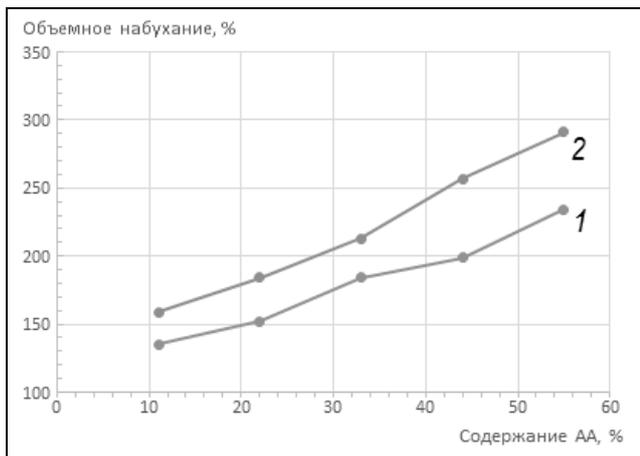


Рис. 1. Зависимость объемного набухания сорбентов от содержания АА при полимеризации: 1 - вода; 2 - изопропиловый спирт

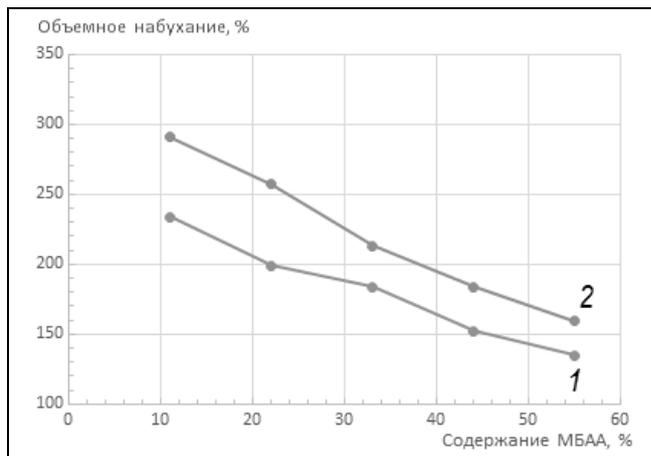


Рис. 2. Зависимость объемного набухания сорбентов от содержания МБАА при полимеризации: 1 - вода; 2 - изопропиловый спирт

Таблица 2. Параметры селективности молекулярно импринтированных полимерных сорбентов на основе производных акриловой кислоты

Параметр	Анализируемые вещества		
	ФП	Циннаризин	Амитриптилин
Образец № 1			
IF	1,3	1,2	1,3
ПР, %	100,0	83,7	84,2
Образец № 2			
IF	1,7	1,5	1,4
ПР, %	100,0	85,3	84,5
Образец № 3			
IF	2,2	1,8	1,3
ПР, %	100,0	84,4	83,2
Образец № 4			
IF	3,4	1,6	1,7
ПР, %	100,0	9,3	9,5
Образец № 5			
IF	6,4	1,1	1,2
ПР, %	100,0	8,1	7,5

Основной задачей являлось получение полимерного сорбента способного селективно удерживать целевые анализируемые вещества – производные пирролидинофенона, используя в качестве темплата ФП. Параметры селективности образцов полученных сорбентов представлены в табл. 2.

Величина *IF* для ФП образца № 5 составила 6,4, что на 47% превышает соответствующий показатель образца № 4. Величина *IF* для циннари-

зина и амитриптилина у образцов №№ 4 и 5 существенно ниже соответствующих величин для ФП. Из этого следует, что МИП содержит отпечатки ФП и не способен к молекулярному распознаванию циннаризина и амитриптилина. Кроме этого, высокую селективность образцов сорбентов №№ 4 и 5 к ФП характеризуют низкие значения *ПР* для циннаризина и амитриптилина.

Полученные сорбенты способны распознавать ФП в бинарных смесях, что косвенно подтверждает наличие центров селективного связывания. Результат определения степени извлечения ФП из водных растворов, в том числе в составе бинарных смесей, с использованием образцов сорбентов №№ 4 и 5 представлены в табл. 3.

Степень извлечения ФП с использованием образца сорбента № 5 была на 32% выше, чем для образца № 4. Присутствие в пробах циннаризина и амитриптилина практически не влияет на степень извлечения ФП. Таким образом, соотношение компонентов, выбранное при синтезе образца сорбента № 5, может быть использовано для получения МИП с заданными параметрами селективности к соединениям класса пирролидинофенонов.

Исследование структуры образца сорбента № 5 методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием выявило наличие выраженных пиков при 1451, 1660, 2934, 3198, 3343 см⁻¹ (рис. 3), что свидетельствует о наличии карбоксимодифицированной полиакриламидной матрицы сорбента.

Следует предположить, что матрица полимера содержит свободные карбоксильные и амидные группы, которые обеспечивают сорбцию модельного соединения ФП за счет водородных связей.

Таблица 3. Степень извлечения ФП из водных растворов на молекулярно импринтированных полимерных сорбентах на основе производных акриловой кислоты

Анализируемое вещество	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Сходимость Sr, %	СИ, %
Образец сорбента № 4				
ФП	500	284±44	10,1	57±9
ФП/циннаризин	500/500	257 ± 49/<100	14,5/-	51±10
ФП/амитриптилин	500/500	249±37/<50	14,8/-	50±7
Образец сорбента № 5				
ФП	500	443±84	8,9	89±17
ФП/циннаризин	500/500	407±69/<100	12,1/-	81±14
ФП/амитриптилин	500/500	425±68/<50	13,7/-	85±14

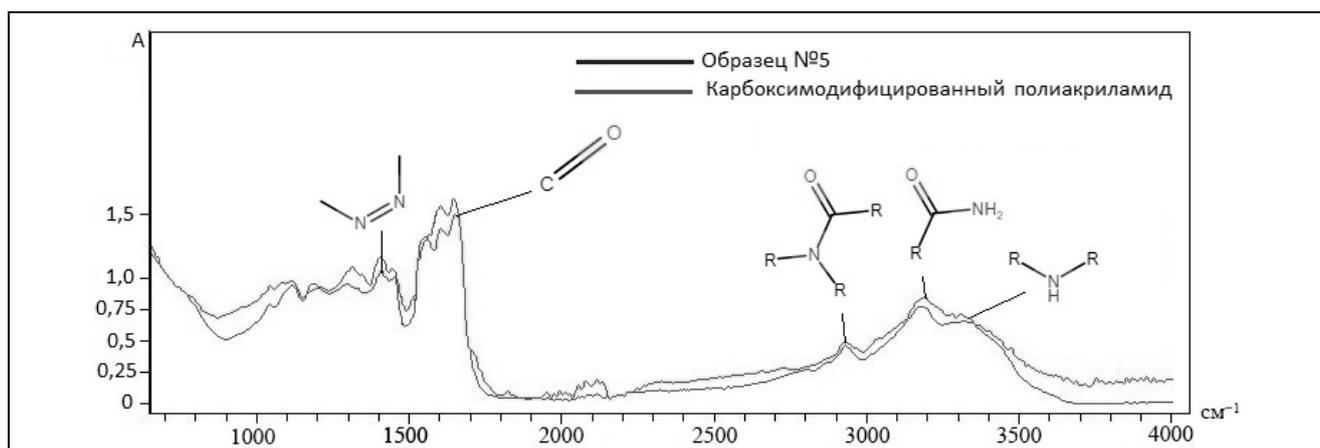


Рис. 3. ИК-спектр образца молекулярно импринтированного сорбента на основе производных акриловой кислоты (образец №5)

ВЫВОДЫ

Получен молекулярно импринтированный полимер на основе производных акриловой кислоты, который является стабильным в водной среде и органических растворителях. Данный полимерный сорбент проявляет высокий уровень селективности к производным пирролидинофенона, что доказано в эксперименте с модельным соединением фенилпиретамамом. Степень извлечения фенилпиретамама из водных растворов составила 89±17%.

Полученный полимерный сорбент может быть использован для пробоподготовки биологических жидкостей при исследовании на производные пирролидинофенона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сынбулатов И.В., Воронин А.В., Воронина Т.В. Анализ производных пирролидинофенона в биологических жидкостях. Аспирантский вестник Поволжья. 2019; 12:33–40. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.1.33-40>.
2. Дмитриенко С.Г. Влияние соотношения функциональный мономер-темплат в предполимеризационной смеси на сорбционные свойства полимеров с молекулярными

3. отпечатками органических соединений. Вестник Московского университета. 2006; 3: 210–217.
4. Постановление правительства Российской Федерации «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» от 30 июня 1998 г. № 681 с изм. и допол. в ред. постановления Правительства РФ от 25.02.2011 № 112.
5. Сынбулатов И.В. Компьютерное моделирование физико-химических и биологических свойств наркотических средств и психоактивных веществ группы пирролидинофенона. «Молодая фармация – потенциал будущего». СПб. 2018. С. 131–133.
6. Komiya M., Takeuchi T., Mukawa T., Asanuma H. Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Kga A. 2003; 159–147.
7. Попов А.Ю. Синтез и физико-химические свойства сверхсшитых полистирольных материалов органического допуста. Высокомолекулярные соединения. 2018; 5:408–415.
8. Мелентьев А.Б. Скрининг лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. Проблемы экспертизы в медицине. 2002; 4: 15–21.
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.: МЗ РФ. 2018. Т. 1. URL: <http://femb.ru/femb/pharmascopea.php> (дата обращения 20.09.2020 г.).

Поступила 1 октября 2020 г.

SYNTHESIS OF MOLECULAR IMPRINTED POLYMER BASED ON ACRYLIC ACID DERIVATIVES FOR SAMPLE PREPARATION OF PYRROLIDINOPHENONE DERIVATIVES FROM BIOLOGICAL FLUIDS

© A.V. Voronin, I.V. Synbulatov, 2020

A.V. Voronin

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor,
Samara State Medical University (Samara)

I.V. Synbulatov

Post-graduate Student,
Samara State Medical University (Samara)
E-mail: i.v.synbulatov@samsmu.r

The study objective was to obtain a sorbent, which is a molecularly imprinted polymer based on acrylic acid derivatives, selective to compounds of the pyrrolidinophenone derivatives.

Material and methods. Sorbents were obtained by the radical polymerization method of methacrylic acid, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, diallylamine in the presence of a template - phenylpiracetam. Amount of acrylamide and N, N'-methylene-bis-acrylamide used was varied. For the obtained sorbents, the degree of swelling in water and isopropanol, the imprinting factor, the cross-reaction coefficient, and the phenylpiracetam recovery from water solutions were determined.

Results. The study of the degree of swelling of the obtained sorbents showed that the volumetric swelling in water and organic solvents increases with an increase in the content of acrylamide and a decrease in N,N'-methylene-bis-acrylamide. The volumetric swelling in water of all the obtained sorbents is lower than in isopropanol, which makes it possible to use them for analytes sorption from water and desorption. The value of the phenylpiracetam imprinting factor for the sorbent sample containing 56% acrylamide was 47% higher than for the sample containing 44% acrylamide. The low value of the imprinting factor of all sorbent samples in the study of cinnarizine and amitriptyline indicates that the obtained sorbents contain "molecular imprints" of the template, phenylpiracetam. The above sorbent samples are capable of recognizing phenylpiracetam in binary mixtures, which confirms the presence of selective binding sites. Phenylpiracetam recovery from water solutions using a sorbent sample containing 56% acrylamide was 89±17%. Structure analysis of this sorbent sample by FTIR revealed the availability of pronounced peaks at 1451, 1660, 2934, 3198, 3343 cm⁻¹, which indicates the presence of carboxy-modified polyacrylamide matrix of the sorbent.

Conclusion. A molecularly imprinted sorbent based on acrylic acid derivatives was obtained, which is stable in water and isopropanol. The produced sorbent exhibits a high level of selectivity to pyrrolidinophenone derivatives, which has been proven in an experiment with a model compound phenylpiracetam. This polymer sorbent can be used for sample preparation of biological fluids in the study for pyrrolidinophenone derivatives.

Key words: pyrrolidinophenone derivatives, solid-phase extraction, molecularly imprinted polymers, phenylpiracetam, forensic toxicology.

For citation: Voronin A.V., Synbulatov I.V. Synthesis of molecular imprinted polymer based on acrylic acid derivatives for sample preparation of pyrrolidinophenone derivatives from biological fluids. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(12):18-23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-12-03>

REFERENCES

1. Synbulatov I.V., Voronin A.V., Voronina T.V. Analiz proizvodnyh pirrolidinofenona v biologicheskikh zhidkostyah. Aspirantskiy vestnik Povolzh'ja. 2019; 12:33-40. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.1.33-40>.
2. Dmitrienko S.G. Vliyanie sootnosheniya funkcional'nykh monomer-templat v predpolimerizacionnoy smesi na sorbionnyye svoystva polimerov s molekulyarnymi otpechatkami organicheskikh soedinenij. Vestnik Moskovskogo universiteta. 2006; 3: 210-217.
3. Postanovlenie pravitel'stva Rossijskoj Federacii «Ob utverzhenii perechnja narkoticheskikh sredstv, psihotropnykh veshhestv i ih prekursorov, podlezhashih kontrolju v Rossijskoj Federacii» ot 30 ijunya 1998 g. № 681 s izm. i dopol. v red. postanovlenija Pravitel'stva RF ot 25.02.2011 № 112.
4. Synbulatov I.V. Komp'juternoe modelirovanie fiziko-himicheskikh i biologicheskikh svoystv narkoticheskikh sredstv i psihoaktivnykh veshhestv grupy pirrolidinofenona. «Molodaja farmacija – potencial budushhego». SPb. 2018. S. 131-133.
5. Komiyama M., Takeuchi T., Mukawa T., Asanuma H. Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Kga A. 2003; 159-147.
6. Popov A.Ju. Sintez i fiziko-himicheskie svoystva sverhshchityh polistirol'nykh materialov organicheskogo dostupa. Vysokomolekuljarnye soedinenija. 2018; 5:408-415.
7. Melent'ev A.B. Skriniring lekarstvennykh, narkoticheskikh veshhestv i ih metabolitov metodom gazovoj hromatografii s mass-selektivnym detektorom. Problemy jekspertizy v medicine. 2002; 4: 15-21.
8. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIV izd. M.: MZ RF. 2018. T. 1. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (data obrashhenija 20.09.2020 g.).