

Additives for concrete and mortar. General specifications (2008). National standard of Ukraine, appropriate EN 934-2:2001 "Admixtures for concrete, mortar and grout Part 2: Concrete admixtures – Definitions, requirements, conformity, marking and labelling".

14. DSTU B V.2.7-170:2008. Building materials.

Concretes. Methods for determining the average density, moisture content, water absorption, porosity and water resistance (2008). National standard of Ukraine). Kiev.

15. DSTU B V.2.7-47-96. Building materials. Concretes. Methods for determining the frost resistance. General specifications (1996). Moscow.

Дата надходження рукопису 30.09.2014

Гоц Володимир Іванович, доктор технічних наук, професор, Київський національний університет будівництва та архітектури, пр. Повітрофлотський, 31, м. Київ, Україна, 03680

Рунова Раїса Федорівна, доктор технічних наук, професор, Науково дослідний інститут в'язучих речовин і матеріалів, Київський національний університет будівництва та архітектури, пр. Повітрофлотський, 31, м. Київ, Україна, 03680

Руденко Ігор Ігорович, кандидат технічних наук, старший науковий співробітник, Науково-дослідний інституту в'язучих речовин і матеріалів, Київський національний університет будівництва та архітектури, пр. Повітрофлотський 31, м. Київ, Україна, 03680

Ластівка Олесь Васильович, аспірант, кафедра Технологія будівельних конструкцій виробів і матеріалів Київський національний університет будівництва та архітектури, пр. Повітрофлотський 31, м. Київ, Україна, 03680

Говдун Ярослав Олександрович, Будівельно-технологічний факультет, Київський національний університет будівництва та архітектури, пр. Повітрофлотський 31, м. Київ, Україна, 03680

УДК 66.

DOI: 10.15587/2313-8416.2014.27623

ПЛАНИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА В ОПТИМИЗАЦИИ СИНТЕЗА ВАНКОМИЦИН-СЕЛЕКТИВНЫХ "ИСКУССТВЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ"

© Е. Н. Музыка

Работа направлена на использование хемометрического подхода "планирование эксперимента", реализованного с помощью прикладного программного пакета MODDE 9.0, для оптимизации параметров синтеза ванкомицин-селективных наночастиц ("искусственных рецепторов" на базе молекулярно импринтированных полимеров) на автоматическом реакторе с целью получения их максимального количественного выхода.

Ключевые слова: молекулярно импринтированный полимер, искусственный рецептор, ванкомицин, аффинность, планирование эксперимента

The work is focused on the use of chemometric approach to "design of experiment", implemented using MODDE 9.0 software package to optimize the synthesis of the vancomycin-selective nanoparticles ("artificial receptor" based on molecularly imprinted polymers) in an automatic reactor in order to obtain its maximum quantitative yield.

Keywords: Molecularly imprinted polymer, artificial receptors, vancomicine, affinity, design of experiment

1. Введение

Использование в современных сенсорах природных рецепторов, как правило, обеспечивает удовлетворительные аналитические характеристики, однако проблемой является их дороговизна и нестабильность [1]. Использование технологии, известной как *молекулярный ипринтинг*, способно решить или снизить остроту озвученных выше проблем. Молекулярно импринтированные полимеры (МИПы), или полимеры с молекулярными отпечатками, могут быть дешевой альтернативой природным рецепторам. Получаются «искусственные рецепторы» (на базе МИПов) в результате молекулярного импринтинга – сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов или импринт-

молекул. К настоящему времени для синтеза МИПов наиболее широко используется метод полимеризации в массе (bulk polymerization) [2]. К сожалению, полученные полимеры имеют много ограничений, в том числе высокий уровень неспецифического связывания и плохой доступности сайта для шаблона молекул и, следовательно, не используются в коммерческих анализах. Новые методы синтеза МИП в виде микро- и наночастиц обеспечивают лучший контроль качества сайтов связывания и морфологию полимера. Микро- и наноструктурные импринтированные материалы обладают правильной формой, малыми размерами с очень высоким соотношением площади поверхности к объему. Кроме того, их сайты связывания можно расположить в непосредственной близости к

поверхности. Это значительно повышает массоперенос и кинетику связывания. Эти факторы очень важны для облегчения связывания и улучшения чувствительности и быстродействия сенсоров на основе "искусственных рецепторов" [3]. Однако, существующие протоколы для синтеза МИП в виде нано- и микрочастиц, в основном, используют те же подходы, что и при полимеризации в массе, поэтому им присущи те же недостатки. Недавно в Кранфильдском университете был разработан метод твердофазного синтеза МИП-наночастиц с использованием молекулярного шаблона многократного использования [3]. Этот процесс позволил спроектировать первый опытный образец автоматического синтезатора, который подходит (в принципе) для промышленного производства МИП-наночастиц. Данный прибор предусматривает компьютерное управление процессом фотореакции, подачи смеси мономеров, временем реакции, промыванием и элюированием МИП-наночастиц.

2. Постановка проблемы

Количество МИП-наночастиц, полученных на выходе, зависит от ряда технологических параметров. Поэтому для получения максимального выхода "искусственных рецепторов" необходимо провести оптимизацию условий эксперимента. Сложность оптимизации обуславливается взаимосвязанным характером факторов (технологических параметров), влияющих на результат.

Поэтому, цель данной работы состоит в разработке протокола синтеза МИП-наночастиц на разработанном в Кранфильдском университете автоматическом синтезаторе с использованием хемометрического подхода – "планирование эксперимента", который даст возможность при минимальном количестве проведенных опытов оптимизировать технологические параметры синтеза МИП-наночастиц для получения их максимального количества на выходе.

3. Литературный обзор

Как правило, оптимизацию проводят по принципу "одна переменная-по-времени" (ОППВ), что в англоязычной литературе имеет название ("one-variable-at-the-time"). Данный подход не может гарантировать достижение реального оптимума и действует только, когда переменные, которые будут оптимизированы, являются полностью независимыми друг от друга [4]. Однако в последние десятилетия произошел резкий скачок в развитии компьютерной техники. Стали активно разрабатываться методы обработки данных, основанные на различных математических аппаратах. Группа этих методов получила название «хемометрика». Сейчас хемометрика широко используется и в смежных областях науки: физике, биологии, медицине, везде, где есть необходимость в анализе большого количества данных и поиске различного рода закономерностей. Планирование эксперимента (англ. "Design of Experiments")

является одним из комплексов хемометрических мероприятий, направленных на эффективную постановку опытов, свободных от недостатков ОППВ [4]. Основная цель планирования эксперимента – достижение максимальной точности измерений при минимальном количестве проведенных опытов и сохранении статистической достоверности результатов. Планирование эксперимента применяется при поиске оптимальных условий, построении интерполяционных формул, выборе значимых факторов, оценке и уточнении констант теоретических моделей и др. Примеры применения планирования эксперимента в контексте синтеза МИПов немногочисленны, и систематизированы в обзоре [5].

4. Планирование эксперимента синтеза МИП-наночастиц

4.1 Установка для синтеза МИП-наночастиц

Экспериментальная установка для автоматизированного синтеза МИП-наночастиц была разработана в Кранфильдском университете, и позволяет программно контролировать температуру колонки, доставку смеси мономеров и растворителей, а также время УФ-облучения. Установка включает в себя управляемый компьютером стеклянный УФ-реактор с внутренним нагревательным элементом; иммобилизованный в реакторе шаблон; насосы, подающие реакционную смесь и растворители, а также обеспечивающих их слив. Колонка расположена в светонепроницаемом ящике, оснащенном УФ-источником, который может быть активирован с помощью программного управления в течение заданного времени для инициирования полимеризации. Также используется многоходовой клапан для направления высокоафинных наночастиц в накопительную емкость или слива раствора в отходы. Общий протокол для автоматизированного синтеза и очистки МИП-наночастиц был разработан и описан ранее в [3, 6].

4.2. Дизайн эксперимента

Схема эксперимента выполнялась при помощи программного обеспечения MODDE 9.0 (Umetrics) Для проведения эксперимента были выбраны следующие входные параметры: концентрация функционального мономера (1–5 %), время облучения (2.5–4.5 мин), температура облучения и температура элюирования низкоафинных фракций (10–30 °C). С помощью программного обеспечения MODDE 9.0 было выбрано 19 комбинаций этих параметров (табл. 1). Выходным параметром была масса МИП-наночастиц (синтезированная с использованием ванкомицина), которая оценивалась по спектрам абсорбции, измеренных на длине волны 209 нм, что соответствует максимуму поглощения МИП-наночастиц. На основе данных, представленных в табл. 1, при помощи программного пакета MODDE 9.0 был получен график с коэффициентами, влияющими на отклик (рис. 1).

Как видно из рис. 1, значения специальных критериев ($R^2=0,868$ и $Q^2=0,517$) указывают на то,

что полученная модель качественна. R2 – мера того, насколько хорошо модель соответствует исходным данным, а Q2 – показатель предсказательной силы и воспроизводимости модели.

Графическое представление (полученного в MODDE.9) количественного выхода

МИП наночастиц после синтеза, как функции от времени полимеризации, концентрации мономера, температуры элюирования частиц низкой аффинности, и температуры, при которой проходила полимеризация, показано на рис. 2.

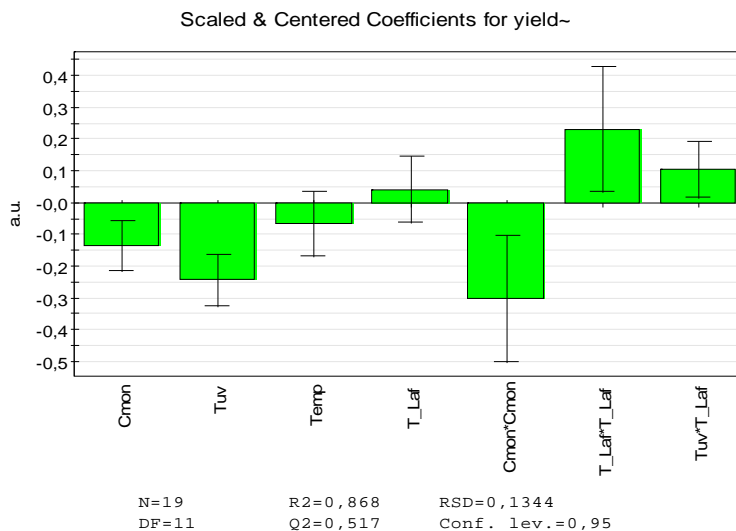


Рис. 1. Графическое представление коэффициентов модели

Таблица 1

Матрица, полученная в программе MODDE 9, для оптимизации количественного выхода МИП-наночастиц

Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/ Excl	Conc of mon.	Irradiation time	Temperature of irradiation	Temperature of low affinity wash	Yield
1	N1	14	Incl	1	2,5	10	10	3,4
2	N2	19	Incl	5	2,5	10	10	0,796
3	N3	24	Incl	1	4,5	10	10	0,336
4	N4	5	Incl	5	4,5	10	10	0,269
5	N5	26	Excl	1	2,5	30	10	–
6	N6	6	Excl	5	2,5	30	10	–
7	N7	9	Excl	1	4,5	30	10	–
8	N8	4	Excl	5	4,5	30	10	–
9	N9	15	Incl	1	2,5	10	30	1,478
10	N10	2	Incl	5	2,5	10	30	0,812
11	N11	13	Incl	1	4,5	10	30	0,739
12	N12	12	Incl	5	4,5	10	30	0,567
13	N13	10	Incl	1	2,5	30	30	0,922
14	N14	22	Incl	5	2,5	30	30	0,937
15	N15	16	Incl	1	4,5	30	30	0,585
16	N16	11	Incl	5	4,5	30	30	0,269
17	N17	23	Incl	1	3,5	20	20	0,75
18	N18	7	Incl	5	3,5	20	20	0,245
19	N19	3	Incl	3	2,5	20	20	1,038
20	N20	8	Incl	3	4,5	20	20	0,488
21	N21	18	Incl	3	3,5	10	20	0,833
22	N22	20	Excl	3	3,5	30	20	–
23	N23	17	Excl	3	3,5	20	10	–
24	N24	25	Incl	3	3,5	20	30	1,768
25	N25	27	Incl	3	3,5	20	20	0,858
26	N26	21	Excl	3	3,5	20	20	–
27	N27	1	Excl	3	3,5	20	20	–

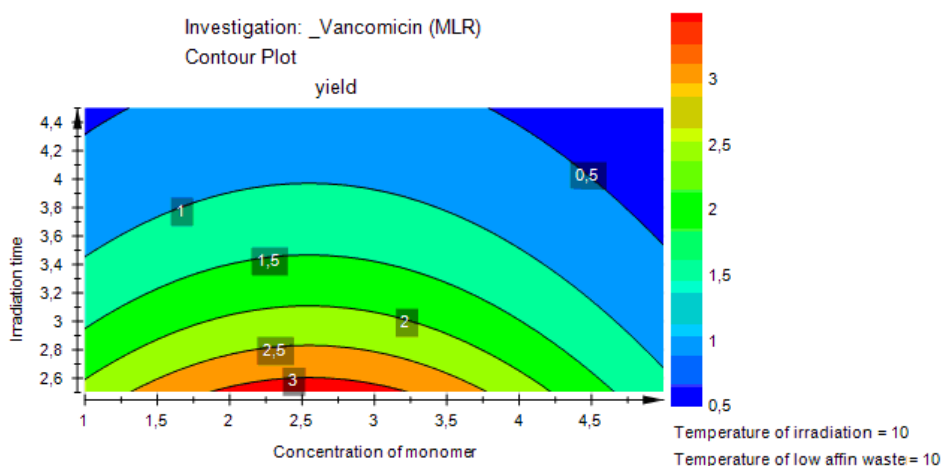


Рис. 2. Графическое представление количественного выхода МИП наночастиц (в а. е.) от входных параметров

Из анализа рис. 2 можно сделать ряд заключений:

а) максимальный выход анти-ванкомицин наноМИП равен 3.4 а. е., что соответствовало диапазону концентраций функционального мономера между 1.8–3.25 % (процентное содержание функционального мономера в полимеризационной смеси). В данной работе снижение концентрации мономера до минимально заданного значения (1 %), или увеличение до максимально заданного (5 %) не привело к значительному снижению массы полученных МИП-наночастиц (2 а. е.). Это может быть связано с тем, что соотношение функционального мономера к сшивающему мономеру влияет на жесткость полимерной матрицы, что отражается на степени ассоциации полимеризационной смеси с иммобилизованным шаблоном (ванкомицином) и, следовательно, влияет на количество МИП-наночастиц с низкой аффинностью, которые должны вымываться из реактора в течение первого элюирования. Таким образом, теоретически выход МИП-наночастиц с высокой аффинностью, т. е. частиц, полученных в ходе второго элюирования, будет уменьшаться с увеличением количества частиц низкой аффинности и наоборот;

б) выход МИП-наночастиц зависит от времени УФ-полимеризации во всем диапазоне значений, исследованных в этой работе. Максимальный выход частиц (3.4 а. е.) наблюдали при времени УФ-полимеризации, равном 2.5 мин. Дальнейшее увеличение времени облучения привело к значительному снижению выхода МИП-частиц. Разумно предположить, что длительное время полимеризации увеличивает диаметр частиц, которые менее эффективно связываются с иммобилизованным шаблоном из-за появления стерических препятствий. Таким образом, можно сделать вывод, что время полимеризации 2.5 мин является оптимальным для производства МИП-наночастиц с хорошими связывающими свойствами;

в) температура, равная 10 °С, была наиболее оптимальной для элюирования МИП-наночастиц

малой аффинности (из рассмотренного набора значений температур).

5. Апробация результатов исследований

Связывающие свойства (аффинность) синтезированных (при оптимальных условиях) ванкомицин-селективных МИП-наночастиц были проанализированы с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, реализованного на аппарате Biacore, который содержал микрочип с иммобилизованными молекулами шаблона (ванкомицина), как было описано в [3]. Константа диссоциации, рассчитанная для ванкомицин-селективных МИП-наночастиц, составила $K_d=3,4 \times 10^{-9}$ М. Этот результат дал возможность сделать вывод, что с помощью автоматического устройства твердофазного синтеза при оптимизированных параметрах можно производить высококачественные МИП-наночастицы "искусственные рецепторы", которые являются по своим свойствам близки к моноклональным антителам.

6. Выводы

В данном исследовании подход "планирование эксперимента" (программное обеспечение MODDE 9), был использован для оценки влияния концентрации функционального мономера в полимеризационной смеси; времени и температуры УФ-полимеризации; температуры элюирования фракций с низкой аффинностью на выход МИП-наночастиц селективных к ванкомицину, которые были синтезированы в автоматическом фотореакторе, разработанном в университете Кранфилд. Планирование эксперимента позволило значительно сократить количество опытов, необходимых для оптимизации параметров синтеза "искусственных рецепторов" на ванкомицин. Максимальный выход МИП-наночастиц ванкомицина в автоматическом фотореакторе был достигнут при следующих параметрах: концентрация мономера 1.8–3.25 %, время облучения 2,5–2,6 мин и температура облучения и промывки низкоаффинных фракций – 10 °С. Таким образом, выход

МИП-наночастиц "искусственных рецепторов", полученных в одном производственном цикле, выполненном при оптимизированных условиях, составлял 25 мг, при константе диссоциации равной $K_d=3,4 \times 10^{-9}$ М.

Дальнейшее развитие данной работы видется в расширении спектра параметров оптимизации, например, тип растворителя, концентрация сшивающего мономера, а также в нахождении оптимальных соотношений функциональный мономер: сшивающий мономер и т. д.

Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору Лестерского университета (Великобритания) Пилецкому С. А. и его научной группе за предоставление возможностей синтеза МИП-наночастиц на разработанном ими автоматическом устройстве, и проведение экспериментальных исследований аффинности синтезированных МИП-наночастиц, а также за консультации в ходе выполнения работы.

Литература

1. Moreno-Bondi, M. C. Immuno-Like Assays and Biomimetic Microchips [Text] / M. C. Moreno-Bondi, M. E. Benito-Peña, J. L. Urraca, G. Orellana // Top Curr. Chem. – 2012. – Vol. 325. – P. 111–164. doi: 10.1007/128_2010_94
2. Muzyka, K. Current Trends in the Development of the Electrochemiluminescent Immunosensors [Text] / K. Muzyka // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – Vol. 54. – P. 393–407. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.011
3. Poma, A. Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with a Reusable Template – “Plastic Antibodies” [Text] / A. Poma, A. Guerreiro, M. J. Whitcombe, E.V. Piletska, A.P.F. Turner and S. A. Piletsky // Advanced Functional Materials. – 2013. – Vol. 23, Issue 22. – P.2821–2827. doi: 10.1002/adfm.201202397
4. Leardi, R. Experimental design in chemistry: A tutorial [Text] / R. Leardi // Analytica Chimica Acta. – 2009. – Vol. 652, Issue 2. – P.161-172. doi: 10.1016/j.aca.2009.06.015
5. Nicholls, I. A. Rational design of biomimetic

molecularly imprinted materials: theoretical and computational strategies for guiding nanoscale structured polymer development [Text] / I. A. Nicholls, H. S. Andersson, K. Golker, H. Henschel, B. C. G. Karlsson, G. D. Olsson, S. Wikman // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2011. – Vol. 400, Issue 6. – P. 1771–1786. doi: 10.1007/s00216-011-4935-1

6. Muzyka, K. Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreator [Text] K. Muzyka, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma and S. Piletsky // Nanoscale Research Letters. – 2014. – Vol. 9, Issue 1. – P. 154–161. doi: 10.1186/1556-276x-9-154

References

1. Moreno-Bondi, M. C., Benito-Peña, M. E., Urraca, J. L., Orellana, G. (2012). Immuno-Like Assays and Biomimetic Microchips. Top Curr. Chem, 325, 111–164. doi: 10.1007/128_2010_94
2. Muzyka, K. (2014). Current Trends in the Development of the Electrochemiluminescent Immunosensors. Biosensors and Bioelectronics, 54, 393–407. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.011
3. Poma, A., Guerreiro, A., Whitcombe, M. J., Piletska E.V., Turner A.P.F. and Piletsky, S. A. (2013). Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with a Reusable Template – “Plastic Antibodies”. Advanced Functional Materials, 23 (22), 2821–2827. doi: 10.1002/adfm.201202397
4. Leardi, R. (2009) Experimental design in chemistry: A tutorial. Analytica Chimica Acta, 652 (2), 161–172. doi: 10.1016/j.aca.2009.06.015
5. Nicholls, I. A., Andersson, H. S., Golker, K., Henschel, H., Karlsson, B. C. G., Olsson, G. D., Wikman, S. (2011). Rational design of biomimetic molecularly imprinted materials: theoretical and computational strategies for guiding nanoscale structured polymer development. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400 (6), 1771–1786. doi: 10.1007/s00216-011-4935-1
6. Muzyka, K., Karim, K., Guerreiro, A., Poma A., Piletsky, S. (2014). Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreator. Nanoscale Research Letters, 9 (1), 154–161. doi: 10.1186/1556-276x-9-154

*Рекомендовано до публікації д-р техн. наук Аврунін О. Г.
Дата надходження рукопису 27.09.2014*

Музыка Катерина Миколаївна, кандидат технічних наук, с.н.с., кафедра біомедицинської інженерії, Харківський національний університет радіоелектроніки, пр. Леніна 14, Харків, Україна, 61166
E-mail: mkm@kture.kharkov.ua

УДК 004.932

DOI: 10.15587/2313-8416.2014.27536

ОБРОБЛЕННЯ ЗОБРАЖЕНЬ ПЛЯМ ЛАЗЕРНИХ ПУЧКІВ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ПАРАЛЕЛЬНО-ІЄРАРХІЧНИХ МЕРЕЖ

© Л. І. Тимченко, С. В. Наконечна

Представлено основні етапи для класифікації та прогнозування координат енергетичних центрів зображень плям лазерного променя, що дає можливість розробити нову інтелектуальну технологію для їх класифікації та прогнозування положення координат їх енергетичних центрів. Проведено експерименти з порівняльної оцінки прогнозування на основі відомих нейронних мереж і запропонованого методу з використанням паралельно-ієрархічної мережі.

Ключевые слова: класифікація, плямоподібне зображення профілю лазерного променя, енергетичний центр.