

УДК 541.26:678.01:678.664:66.011

Створення біосенсорних систем на основі молекулярно імпринтованих полімерних мембран для визначення фенолів у воді

Т.А. Сергєєва¹, Д.С. Челядіна¹, Л.А. Горбач², О.О. Бровко², Л.М. Сергєєва², Г.В. Єльська¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
150, вул. Заболотного, Київ, 03680, Україна

²Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

Створено аналітичну систему для визначення фенолу на основі молекулярно імпринтованих полімерних (МІП) мембран, отриманих методом полімеризації in situ у комбінації з методом комп'ютерного моделювання, яка забезпечує високоселективне та високочутливе визначення аналіту. Межа визначення фенолу за допомогою такої системи становить 50 нМ, а лінійний динамічний діапазон 50 нМ – 10 мМ, що відповідає концентраціям, які необхідно визначати у природних і стічних водах. Стабільність розроблених сенсорних систем на основі МІП мембран становить 12 міс., що істотно перевищує стабільність аналогічних пристроїв на основі природних рецепторів і ферментів. Доведено придатність застосування створених сенсорних систем для аналізу фенолів як у модельних зразках, так і для визначення вмісту цих речовин у зразках з довкілля (природні та стічні води). Поряд із високою селективністю та чутливістю створені системи характеризуються простотою, компактністю та невисокою вартістю.

Ключові слова: молекулярно імпринтовані полімери, мембрани, біосенсори, тест-системи, фенол.

Проблема забруднення довкілля, в тому числі води, – одна зі світових проблем. Через зростання людської популяції, урбанізації, інтенсифікації агрокультурного та промислового розвитку втричі збільшилось споживання води, і, водночас, ці ж фактори призвели до зниження її якості. Феноли – типові забруднювачі води. Їх широко використовують як антисептики, що інгібують ріст бактерій та грибів у промислових системах водопостачання, при виготовленні вибухівок, паперу, деяких медичних препаратів. Фенол – один з основних проміжних продуктів виробництва фенольних смол, синтетичних волокон і пластиків [1].

Перш за все, впливу фенолів, які потрапили у довкілля, зазнають люди та тварини. Речовина може потрапляти в організм через шкіру, шлунково-кишковий тракт, дихальну систему, викликати опіки, набряки та отруєння. Фенол може призводити до гострого ураження центральної нервової системи, печінки, нирок, серцевого м'яза, крові та інших тканин. Найбільший вплив феноли здійснюють на ендокринну систему [2]. Зважаючи на зазначене вище, доцільний контроль вмісту фенолів у воді, розробка простих і зручних методів для швидкого та точного визначення концентрації фенолів у рідинах залишається актуальним завданням сучасної аналітичної біотехнології.

На сьогодні найпоширеніші методи визначення фенолу – високоефективна рідинна хроматографія [3], газова хроматографія [4], ці методи у поєднанні з мас-спектрометрією [5, 6], спектрофотометрією [7], а також біосенсорні методи аналізу [8, 9]. Проте, недоліками більшості цих методів є неможливість проведення аналізу поза лабораторією, працемісткість, а також необхідність складних підготовчих процедур, таких як попереднє концентрування аналізованих зразків. Найперспективніші із зазначених методів біосенсорні методи аналізу, які забезпечують швидкий та ефективний аналіз. Проте, істотним недоліком усіх біосенсорних пристроїв є нестабільність їхніх чутливих елементів, створених на основі природних рецепторів, антитіл і ферментів. Альтернативою цим методам може стати використання колориметричних біосенсорних систем на основі штучних аналогів біологічних рецепторів – молекулярно імпринтованих полімерів, або так званих полімерів-біоміметиків. Як правило, сенсорні системи такого типу, з одного боку, забезпечують високу селективність і чутливість аналізу [10, 11], а з іншого – виявляють високу стабільність і надають можливість проведення аналізу за польових умов. Одним з підходів до синтезу таких матеріалів є метод молекулярного імпринтингу [12], який дає змогу

отримати «молекулярні відбитки» в органічних полімерах. Один із перспективних напрямів молекулярного імпринтингу – отримання таких матеріалів у вигляді мембран, оскільки вони здатні не тільки до селективного розпізнавання цільових аналітів, а й до генерування сенсорного сигналу, що може бути зареєстрований [10, 11]. Таким чином, метою цієї роботи було створення штучних аналогів біологічних рецепторів, селективних до фенолу, методом молекулярного імпринтингу у структурі полімерних мембран і подальша розробка на їх основі колориметричних біосенсорних систем для визначення фенолу у питній та природних водах.

Матеріали і методи.

Матеріали.

В роботі використовували фенол, акриламід (АА), 2-акриламідо-2-метилпропансульфонову кислоту (АМПС), 4-аміноантипірин, ацетонітрил, гідроксид амонію, *N,N*-диметилформамід, ітаконову кислоту (ІК), кеталь (2,2-диметокси-2-фенілацетофенон), *o*-крезол, *p*-крезол, *N,N'*-метилден-бісакриламід, метакрилову кислоту (МАК), 2-нітрофенол, 3-нітрофенол, 4-нітрофенол, триетиленглікольдиметакрилат (ТЕГДМ), поліетиленгліколь (ПЕГ) з ММ 20 000, пірокатехол, фериціанід калію (Sigma-Aldrich, США). Олігоуретанакрилат (ОУА) ММ 2600.

Синтез МПП мембран методом радикальної полімеризації *in situ*.

МПП мембрани, здатні до селективного розпізнавання фенолів, отримували шляхом радикальної фотоініційованої кополімеризації функціонального мономеру (АА, АМПС, ІК або МАК), зшиваючого агента (ТЕГДМ) і модифікатора-еластифікатора (ОУА). Співвідношення ТЕГДМ / ОУА (85/15) було оптимізовано раніше [13]. Як ініціатор УФ-ініційованої радикальної полімеризації застосовували 2,2'-диметокси-2-фенілацетофенон (кеталь). Як пороутворювач у цій системі застосовували суміш диметилформаміду (50 % об.) і поліетиленгліколю (ММ 20 000). Молярне співвідношення фенол/функціональний мономер у вихідній мономерній суміші становило 1:1; 1:2; 1:3 та 1:4. Типова мономерна суміш для синтезу фенол-селективних МПП мембран містила 20 мг фенолу; 55,3 мг ІК (молярне співвідношення 1:2); 293 мг ТЕГДМ; 51,7 мг ОУА; 50 % об. ДМФА та 0,5 % кеталю. Для синтезу МПП мембран на основі напів-взаємопроникних полімерних сіток (напів-ВПС) до мономерної суміші додавали 60 мг полімерного пороутворювача ПЕГ 20 000. Мономерну суміш полімеризували між двома скляними пластинами, фіксованими на відстані 60 мкм. Реакцію радикальної полімеризації ініціювали УФ-опроміненням $\lambda=365$ нм і проводили протягом 30 хв. Контрольні мембрани синтезували з тієї ж мономерної суміші, що не містила фенолу. Матричні молекули та незаполімеризовані компоненти з синтезованих мембран видаляли екстракцією етанолом в

апараті Сокслета протягом 8 год. Полімерний пороутворювач (ПЕГ ММ 20 000) видаляли екстракцією в воді протягом 8 год. (до постійної ваги зразків).

Калібрування колориметричної тест-системи для визначення фенолів.

Зразки фенол-імпринтованих МПП і контрольних мембран розміром 1x1 см застосовували для адсорбції фенолу зі стандартних водних розчинів з концентрацією 50 нМ–10 мМ. Фенол, селективно адсорбований рецепторними сайтами у складі МПП мембран, візуалізували після його взаємодії з 4-аміноантипірином у лужному середовищі за наявності фериціаніду калію. Після процедури адсорбції зразки мембран відмивали дистильованою водою, що містить 5 % об. ацетонітрилу. Зразки мембран змочували сумішню 2 %-вого водного розчину 4-аміноантипірину та 10 % NH_4OH 1:3. Після цього мембрани обробляли 2 %-вим водним розчином $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, що призводило до негайної появи малинового забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації фенолу в аналізованих зразках. Інтенсивність забарвлення мембран оцінювали застосовуючи програму аналізу зображень “Scion Image J” (Wayne Rasband Inc., США).

Визначення концентрації фенолу методом спектрофотометрії.

У комірки 96-лункових полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу додавали по 180 мкл досліджуваного водного розчину, 60 мкл суміші 2 %-вого водного розчину 4-аміноантипірину та 10 % NH_4OH за співвідношення 1:3 та 30 мкл 2 %-вого водного розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Результати обчислювали на мікрофотоколориметрі фірми DYNEX Technologies (Велика Британія) за $\lambda = 450$ нм.

Результати дослідження та їх обговорення.

Вплив вмісту функціональних мономерів на чутливість тест-систем.

Детекція фенолу, адсорбованого штучними рецепторними сайтами у складі МПП мембран, ґрунтується на здатності фенолу утворювати забарвлені комплекси з 4-аміноантипірином у лужному середовищі за наявності фериціаніду калію (рис. 1). При цьому інтенсивність забарвлення мембран має бути пропорційною концентрації фенолу в аналізованому зразку.

Штучні аналоги біологічних рецепторів, отримані методом молекулярного імпринтингу у вигляді мембран, аналізували щодо їхніх функціональних власти-

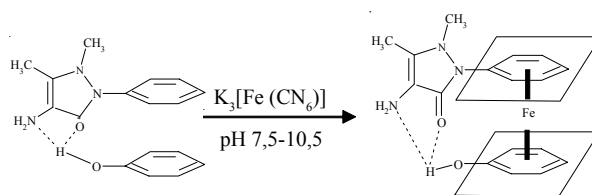


Рис. 1. Утворення забарвленого комплексу фенолу з 4-аміноантипірином [14]

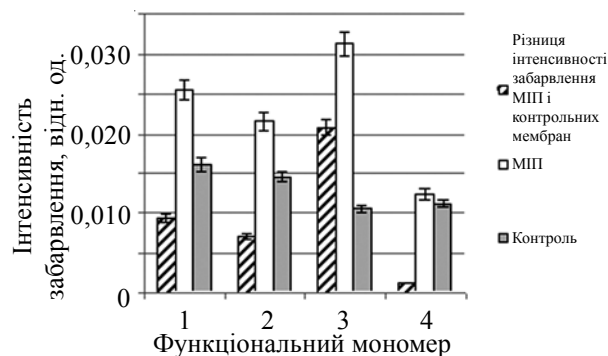


Рис. 2. Залежність вибіркової адсорбції фенолу від типу функціонального мономеру, застосованого при синтезі: 1 – акриламід; 2 – метакрилова кислота; 3 – ітаконова кислота; 4 – 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонова кислота. Адсорбція фенолу відбувалась з його 500мкМ водного розчину

востей. Для цього варіювали склад МПП мембран; змінюючи тип функціонального мономеру та його співвідношення з матрицею, визначали оптимальні умови адсорбції фенолу такими мембранами, досліджували аналітичні характеристики біосенсорної системи (межа визначення та лінійний динамічний діапазон), загальну селективність системи, аналізували ефективність роботи створеної системи у природних водах.

Відомо, що формування стабільних комплексів матриця–функціональний мономер вирішальне у технології молекулярного імпринтингу, оскільки безпосередньо впливає на афінність і селективність полімеру. Раціональний підхід до вибору функціонального мономеру – метод комп’ютерного моделювання, який забезпечує швидкий та ефективний скринінг великої кількості потенційних функціональних мономерів, які традиційно використовуються у молекулярному імпринтингу, та вибір оптимальних мономерів для синтезу полімеру. Оптимальні функціональні мономери для фенолу, згідно з результатами нашої попередньої роботи, – ітаконова кислота, 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонова кислота, акриламід і метакрилова кислота, які забезпечують найвищі енергії взаємодії: -34,80, -30,86, -24,14 і -23,17 кКал/Моль відповідно [15].

З погляду застосування колориметричних біосенсорних систем як основи для визначення фенолу найбільш ефективними виявились МПП мембрани, синтезовані із застосуванням ітаконової кислоти. Для таких МПП мембран була характерна як найвища інтенсивність забарвлення порівняно з мембранами, синтезованими на основі інших функціональних мономерів, так і найвищі рівні вибіркової адсорбції фенолу, що визначається за різницею інтенсивності забарвлення МПП і відповідних контрольних мембран (рис. 2). Важливо, що цей результат співпадає з даними комп’ютерного моделювання, згідно з якими саме

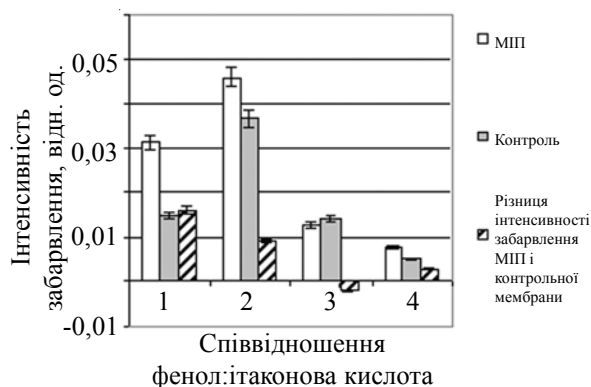


Рис. 3. Залежність інтенсивності забарвлення МПП і контрольних мембран, синтезованих за участю ітаконової кислоти як функціонального мономеру від співвідношення фенол:функціональний мономер у вихідній мономерній суміші за співвідношення 1:1 (1); 1:2 (2); 1:3 (3) та 1:4 (4). Адсорбція фенолу відбувалась з його 500 мкМ водного розчину

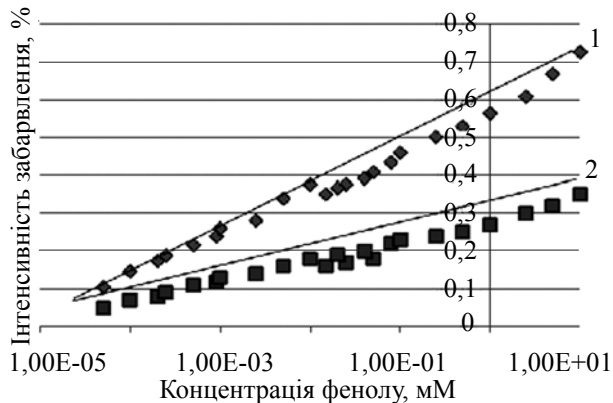


Рис. 4. Калібрувальний графік для визначення фенолу у воді, отриманий із застосуванням колориметричної біосенсорної системи: 1 – МПП мембрана; 2 – контрольна мембрана

ітаконова кислота забезпечує енергію зв’язування із найбільшим негативним значенням з фенолом порівняно з іншими функціональними мономерами. Варто також зазначити, що практично у всіх випадках рівень неспецифічного зв’язування фенолу контрольними мембранами був досить високим. Очевидно, це пов’язано із високим рівнем неспецифічної адсорбції фенолу на поверхні МПП мембран за рахунок гідрофобних взаємодій.

Зважаючи на це, саме ітаконову кислоту використовували для синтезу МПП мембран, які були надалі використані для створення біосенсорної системи для визначення фенолу.

Теоретично, не всі молекули функціонального мономеру, що є у мономерній суміші, включаються у полімер, тож був синтезований ряд МПП і контрольних мембран зі співвідношенням матриця:функціональний мономер, рівним 1:1, 1:2, 1:3 та 1:4, щоб отримати сайти зв’язування з оптимальною селективністю.

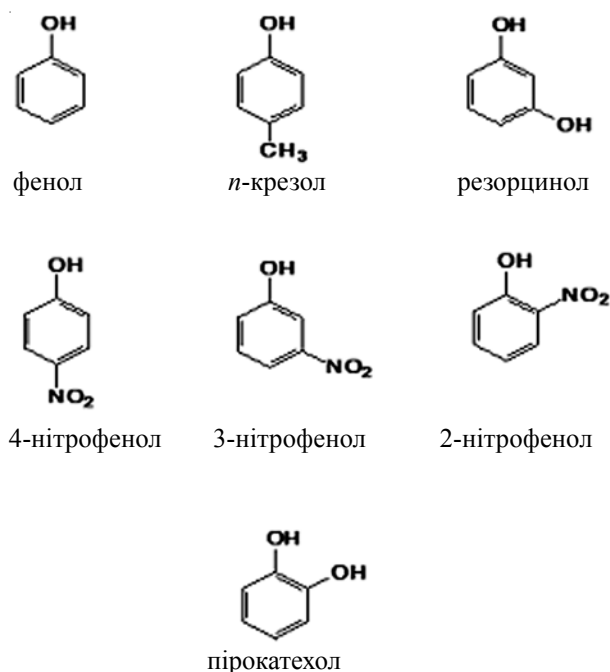


Рис. 5. Структурні аналоги фенолу

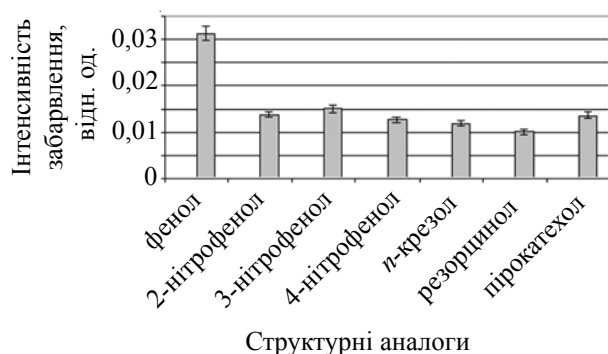


Рис. 6. Перехресна реактивність колориметричної сенсорної системи на основі МІП мембран при визначенні фенолів у водних розчинах

Показано, що оптимальне співвідношення фенол:ітаконна кислота у вихідній мономерній суміші становило 1:1 (рис. 3). Це можна пояснити тим, що надлишок функціонального мономеру стерично заважає адсорбції фенолу, закриваючи просвіт пор і сайти зв'язування.

Типовий калібрувальний графік створеної колориметричної біосенсорної системи наведено на рис. 4, з якого видно істотну різницю інтенсивності забарвлення МІП мембрани та контрольної. Це свідчить про те, що зв'язування фенолу із МІП мембраною визначається наявністю в ній штучних рецепторних сайтів зв'язування, що підтверджує ефект імпринтингу. Межа визначення фенолу за допомогою цього методу становить 50 нМ, а лінійний діапазон визначення 50 нМ – 10 мМ.

Загальну селективність колориметричних біосенсорних систем на основі синтезованих МІП мембран

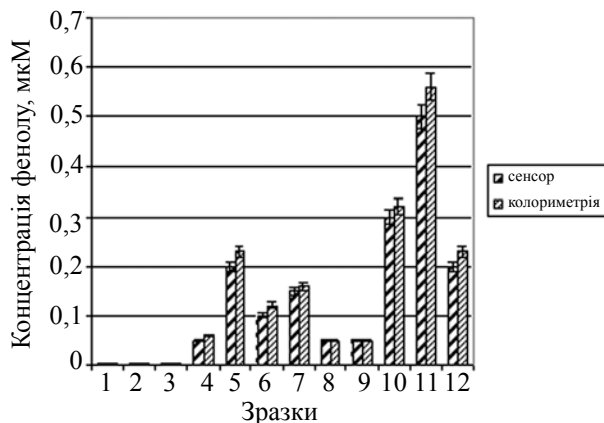


Рис. 7. Результати аналізу вмісту фенолів у зразках вод: 1 – скважина “Троянда”, с. Морозовка, Барішевського р-ну; 2 – водопровідна вода, м. Київ; 3 – джерело “Дубки”, м. Київ; 4 – р. Сирець; 5 – молокозавод “Ічня”, стічні води; 6 – ставок “Ічня”; 7, 8 – Київводоканал, вхідна і вихідна вода; 9 – УкрНІПпластмаш, стічні води; 10 – р. Віта, с. Пирогів, Київська обл.; 11 – фільтрат міського звалища с. Пирогів, Київська обл.; 12 – р. Стугна, м. Васильків, Київська обл.

оцінювали із застосуванням близьких структурних аналогів фенолу: 2-нітрофенолу, 3-нітрофенолу, 4-нітрофенолу, *n*-крезолу, резорцинолу та пірокатехолу (рис. 5, 6).

Отже, створена сенсорна система виявляє високу селективність до фенолу, що дає змогу визначати його вміст у аналізованому зразку, при цьому, наявність структурних аналогів фенолу майже не впливатиме на точність визначення аналіту за допомогою цього методу.

Створені колориметричні біосенсорні системи були апробовані для визначення фенолів як у модельних розчинах, так і реальних зразках природних і стічних вод (рис. 7). Було показано, що склад аналізованих зразків мав незначний вплив на точність визначення фенолів за допомогою колориметричної тест-системи, тоді як результати визначення концентрації фенолу відповідали таким, отриманим за допомогою традиційного спектрофотометричного методу визначення фенолів.

Стабільність колориметричних сенсорних систем на основі фенол-селективних МІП мембран за кімнатної температури зберігалася принаймні 12 міс. Порівняно з традиційними інструментальними методами розроблена сенсорна система високочутлива, проста у використанні та забезпечує експрес-аналіз вмісту фенолів у воді.

Висновки.

Методом полімеризації *in situ* синтезовано та оптимізовано склад полімерів-біоміметиків у формі мембран, здатних селективно розпізнавати феноли. На їх основі розроблено просту у використанні та дешеву колориметричну біосенсорну систему для визначен-

ня фенолу у воді. Біосенсорна система виявляє високу селективність до фенолу і майже не чутлива до його близьких структурних аналогів. Проведено апробацію та доведено ефективність розробленої біосенсорної

системи при визначенні фенолу у зразках з довкілля (природні та стічні води).

Автори статті висловлюють подяку к.х.н. В.Ф. Матюшову (ІХВС НАН України) за наданий олігоуретанакрилат ММ 2600.

Література

1. Fink J.K. Reactive Polymers Fundamentals and Applications (Second Edition). – 2013. - chapter 4. - P.155-177.
2. Skinner M., Mannikam M., Guerrero-Bosagna C. // Reproductive Toxicology. – 2011. - **31**, N3. - P.337–343.
3. Zakeri-Milani P., Barzegar-Jalali M., Tajerzadeh H., Azarmi Y., Valizadeh H. // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2005. - **39**, N 3-4. - P. 624-630.
4. Kim K.-R., Kim H. // J. of Chromatography. Part A. – 2000. - **866**, N 1. - P. 87-96.
5. Jakopic J., Mikulic Petkovsek M., Likozar A., Solar A., Stampar F., Veberic R. // Food Chemistry. – 2011. - **124**, N 3. - P. 1100-1106.
6. Guerra Simoes N., Vale Cardoso V., Ferreira E., Joao Benoliel M., Almeida C. M.M. // Chemosphere. – 2007. – **68**, N 3. - P. 501-510.
7. Lavilla I., Gil S., Costas M., Bendicho C. // Talanta. – 2012. - Vol. 98. - P. 197-202.
8. Zhou X.-H., Liu L.-H., Bai X., Shi H.-C. // Sensors and Actuators. Part B: Chemical. – 2013. - Vol.181. - P. 661-667.
9. Cevik E., Senel M., Baykal A., Abasiyani M.F. // Sensors and Actuators. Part B: Chemical. – 2012. - Vol.173. - P. 396-405.
10. Сергеева Т.А., Пилецька О.В., Гончарова Л.А., Бровко О.О., Пилецький С.А., Сльська Г.В. // Укр. біохім. журн. – 2008. - **80**, № 3. - С. 84-93.
11. Sergeeva T.A., Slinchenko O.A., Gorbach L.A., Matyushov V.F., O.O. Brovko V.F., Piletsky S.A., Sergeeva L.M., El'ska G.V. // Anal. Chim. Acta. – 2010. - **659**, N 1–2. - P. 274-279.
12. Wulff G. // Angewandte Chemie International Edition in English. – 1995. - **34**, N 17. - P. 1812-1832.
13. Sergeeva T.A., Piletsky S.A., Brovko O.O., Slinchenko E.A., Sergeeva L.M., Panasyuk T.L., El'skaya A.V. // Analyst. – 1999. - Vol.124. - P. 331-334.
14. Fiamegos Y., Stalikas C., Pilidis G. // Analytica Chimica Acta. – 2002. – **467**, №1–2. – P. 105-114.
15. Sergeeva T.A., Gorbach L.A., Slinchenko O.A., Goncharova L.A., Piletska O.V., Brovko O.O., Sergeeva L.M., El'ska G.V. // Mater. Sci. Eng. Part C. – 2010. – Vol. 30. – P. 431- 436.

Надійшла до редакції 29 жовтня 2013 р.

Создание биосенсорных систем на основе молекулярно импринтированных полимерных мембран для определения фенолов в воде

Т.А.Сергеева¹, Д.С. Челядина¹, Л.А. Горбач², А.А. Бровко², Л.М. Сергеева², Г.В. Ельська¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина

²Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины, 48 Харьковское шоссе, 02160, Киев, Украина

*Создано аналитическую систему для определения фенола на основе молекулярно импринтированных мембран, полученных методом полимеризации *in situ* в сочетании с методом компьютерного моделирования. Аналитическая система обеспечивает высокоселективное и высокочувствительное определения аналита. Предел обнаружения фенола с помощью такой системы составляет 50 нМ, а линейный динамический диапазон составляет 50 нМ - 10 мМ, что соответствует концентрациям, которые необходимы для определения в природных и сточных водах. Стабильность разработанных сенсорных систем на основе МИП мембран составляет 12 месяцев, что существенно превышает стабильность аналогичных устройств на основе природных рецепторов и ферментов. Доказана пригодность применения созданных сенсорных систем для анализа фенолов как в модельных образцах, так и для определения содержания этих веществ в реальных образцах (природные и сточные воды). Наряду с высокой селективностью и чувствительностью, созданные системы характеризуются простотой, компактностью и невысокой стоимостью.*

Ключевые слова: молекулярно импринтированные полимерные мембраны, аналитическая сенсорная система, фенол.

Create biosensor systems based on molecularly imprinted polymer membranes for the determination of phenols in water

T.A. Sergeyeva¹, D.S. Cheljadina¹, L.A. Gorbach², O.O. Brovko², L.M. Sergeeva², G.V. Elska¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

150, Zabolotnogo str., Kyiv, 03680, Ukraine

²Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine

48 Kharkiv's'ke shose, Kyiv, 02160, Ukraine

*An analytical system for highly selective and sensitive detection of phenol based on molecularly imprinted polymer membranes, synthesized using method of *in situ* polymerization in a combination with the method of computational modeling, was developed. The detection limit for phenol detection comprised 50 nM, while the linear dynamic range – 50 nM–10 mM, which corresponds to the concentrations that are necessary to be detected in natural and waste waters. Stability of the developed MIP-based sensor systems was estimated as 12 months, which significantly increases stability of analogous devices based on receptors and enzymes. Applicability of the developed sensor systems for the analysis of phenols in both model solutions and real environmental samples (natural and waste waters) was proven. The developed systems are characterized with high selectivity, sensitivity, small sized and low cost.*

Keywords: molecularly imprinted polymer membranes, an analytical system, phenol.