

Колориметричні тест-системи на основі молекулярно імпринтованих полімерів для визначення токсичних сполук

Л.А. Горбач

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

Продемонстрована можливість сумісного використання технології молекулярного імпринтингу із методами аналітичної хімії, а саме якісними кольоровими реакціями в колориметричних тест-системах. Отримано колориметричні тест-системи у вигляді композиційних мембрани з молекулярно імпринтованим поверхневим шаром для проведення швидкого медичного діагностування стану людини і визначення патологічних концентрацій креатиніну. Діапазон дії тест-систем для швидкої діагностики становить 0,25–2,50 мМ. На основі поліуретан-поліакрилатних композицій отримано колориметричні тест-системи для виявлення фенолів у модельних і реальних зразках природних і стічних вод. Діапазон дії колориметричних тест-систем для моніторингу довкілля 50 нМ–10 мМ. Аналітичні тест-системи прості у використанні поза лабораторними умовами, працюють за типом «лакмусовий папірець» і впродовж тривалого часу зберігають стійке забарвлення.

Ключові слова: молекулярно імпринтовані полімери, колориметричні тест-системи, креатинін, фенол, «лакмусовий папірець».

Вступ.

Сьогодні в усьому світі витрачаються значні кошти на закупівлю пристрій для виявлення токсичних сполук як у довкіллі, так і в організмі людини. Проте, сучасне обладнання – це коштовне, зазвичай громіздке обладнання, не придатне для використання поза лабораторних умов. Це і є однією з вагомих причин, що робить нагальним пошук нових підходів для проведення попереднього аналізу з використанням дешевих, доступних і надійних тест-систем. Експресні тест-системи можна застосовувати як для проведення якісної медичної діагностики, так і для визначення забруднювачів-токсикантів довкілля, в тому числі у воді.

Існуючі методи виявлення токсичних сполук мають ряд недоліків, таких як висока вартість і тривалість аналізу, а також у багатьох випадках вони недостатньо селективні та чутливі. Тому для виявлення токсикантів в реальних умовах як у довкіллі, так і в організмі людини, запропонували молекулярно імпринтовані полімери (МІП), у структурі яких формують специфічні сайти зв'язування, що забезпечують високий рівень селективності [1–6]. Сьогодні МІП широко використовують у різних напрямах тривалого хімічного аналізу [6–11], у твердофазовій екстракції [8], різноманітних сенсорах [9–11] у вигляді часток подрібненого полімеру. МІП, синтезовані у формі полімерних плівок, почали застосовувати для тест-систем порівняно недавно [1–3, 12]. В основу ідеї створення колориметричних тест-систем у вигляді полімерних плівок було покладено, з

одного боку, здатність МІП високоселективно абсорбувати сполуку-аналіт, з іншого боку, давати кольоровий відгук під дією відповідних реагентів (якісна реакція). Створення нових колориметричних тест-систем, необхідних для проведення швидкої медичної діагностики, що працюють за типом «лакмусовий папірець», було реалізовано саме за рахунок поєднання молекулярного імпринтингу та кольорових якісних реакцій.

Колориметричні тест-системи для медико-біологічної експрес-діагностики.

Так, при створенні колориметричних тест-систем для медико-біологічної експрес-діагностики, зокрема вмісту креатиніну, враховували абсорбційні здатності МІП і можливість надавати стійке забарвлення (кольоровий відгук) при проведенні якісної реакції. Молекулою-аналітом було обрано саме креатинін, оскільки зміна його концентрації в крові та сечі – важливий показник при діагностуванні стану організму в цілому, і особливо при лікуванні захворювань нирок [13, 14].

Колориметричні тест-системи для медичного діагностування отримували у вигляді композиційних мембрани. Підкладкою для модифікації слугували стандартні полівінілденфторидні мікропористі мембрани діаметром 47 або 25 мм з розміром пор 0,22 мкм, на поверхню яких завдяки графт-полімеризації наносили молекулярно імпринтований шар, в якому формували сайти зв'язування, специфічні до креатиніну [13, 14]. За даними комп’ютерного моделювання (ІМБіГ НАН України) та

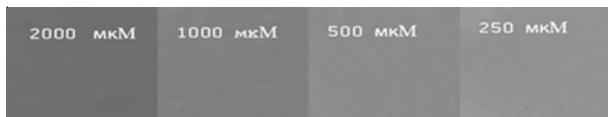
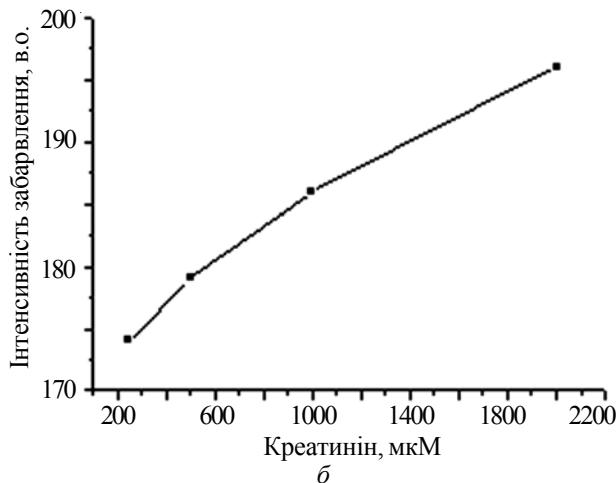
*a**б*

Рис. 1. Залежність інтенсивності забарвлення МП_{АМПСК} мембрани після занурення у розчин креатиніну різної концентрації та дії реакції Яффе: *а* – ступінь забарвлення МП_{АМПСК}; *б* – калібрувальний графік для визначення вмісту креатиніну у розчині

отриманих експериментальних результатів було визначено 2-акриламідо-2-метил-1-пропансульфонову кислоту (АМПСК) найкращим функціональним мономером, що утворює найбільш стійкі кольорові комплекси з креатиніном. Порівняння проводили з контрольними мембраниами, які не мали сайтів зв'язування креатиніну.

Контролювали здатність МП_{АМПСК} мембрани адсорбувати креатинін з водних розчинів за допомогою реакції Яффе [15, 16], що відбувається в лужному середовищі з утворенням креатинін-пікратного комплексу, забарвленого у помаранчево-червоний колір, інтенсивність якого залежить від вмісту креатиніну.

Тестування колориметричних тест-систем проводили за двома методиками: для визначення адсорбційної здатності їх занурювали у розчин креатиніну різної концентрації, а для визначення накопичувальної здатності розчин креатиніну сталої концентрації прокачували крізь них. Після проведення реакції Яффе, за допомогою цифрового фотоапарата робили фотографії забарвленіх МП_{АМПСК} мембрани і визначали відносну інтенсивність забарвлення мембрани.

При тестуванні МП_{АМПСК} мембрани за першою методикою досліджували водні розчини креатиніну з концентраціями від 250 до 2000 мкМ. У кожен з них занурювали МП_{АМПСК} мембрани, проводили визначення креатиніну за реакцією Яффе. На рис. 1*а* наведено зміну інтенсивності забарвлення МП_{АМПСК} мембрани у сірій гамі від дуже темного кольору до ледве сірого (в реальності кольори змінюються від помаранчево-

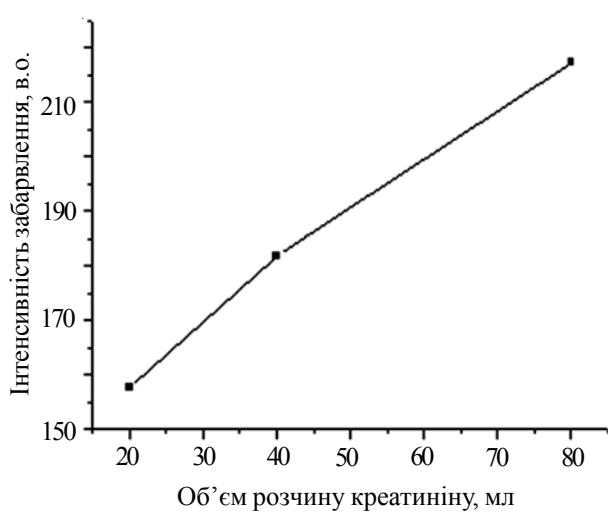
*a**б*

Рис. 2. Залежність інтенсивності забарвлення МП_{АМПСК} мембрани після прокачування 100 мкмоль/л креатиніну у кількості 20, 40, і 80 мл та дії реакції Яффе (*а*); калібрувальний графік для визначення вмісту креатиніну у розчині (*б*)

червоних до ледь жовтих). Побудовано калібрувальний графік (рис. 1*б*) для визначення вмісту креатиніну у розчині та отримано чітку кореляцію між ступенем забарвлення МП_{АМПСК} і концентрацією креатиніну. Слід зауважити, що отримане забарвлення стійке й не змінюється впродовж місяця.

За другою методикою для визначення накопичувальної здатності тест-систем три модифіковані МП_{АМПСК} мембрани послідовно поміщали в комірку, крізь яку пропускали розчин креатиніну однакової концентрації 100 мкмоль/л, але різного об'єму: 20, 40, і 80 мл відповідно. Кількість креатиніну, який накопичився на поверхні, виявляли також за реакцією Яффе. На рис. 2*а* показана зміна інтенсивності забарвлення тест-системи залежно від кількості прокачаного крізь мембрани креатиніну. На рис. 2*б* наведено калібрувальний графік для визначення вмісту креатиніну при дослідженні накопичувальної здатності мембрани.

Отримані результати за другою методикою тестування композиційних МП_{АМПСК} мембрани застосовували при дослідженні реальних зразків [17]. Об'єктами дослідження слугували зразки діалізної рідини, відбір якої робили через 15 хв. після початку діалізу у чоловіка 48 років (№1) та у жінки 29 років (№2). Модельною системою слугував зразок №3: вихідний діалізний розчин відомої концентрації креатиніну 500 мкмоль/л. Для

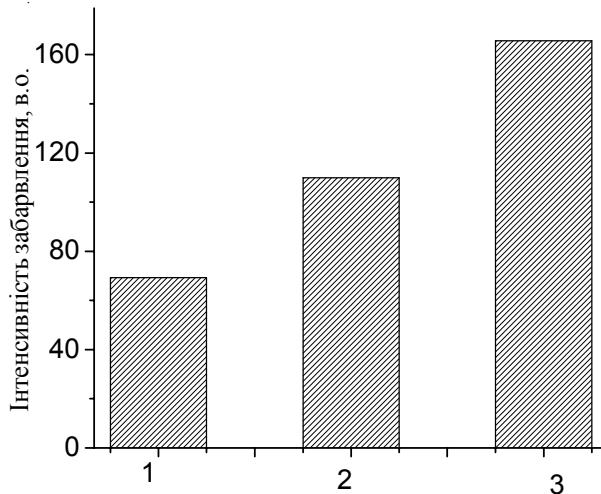


Рис. 3. Залежність інтенсивності забарвлення МП_{АМПСК} після пропускання крізь них реальної діалізної рідини та проведення кольорової реакції: 1 – чоловік 48 років; 2 – жінка 29 років; 3 – модельна система

визначення кількості креатиніну у реальних зразках кріз комірку з МП_{АМПСК} мембраною за допомогою шприца прокачували однакову кількість (20 мл) кожної проби. Кількість адсорбованого креатиніну МП_{АМПСК} мембраною та інтенсивність її забарвлення наведено на рис. 3. Отримані результати з визначення концентрації креатиніну колориметричними тест-системами та за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) добре узгоджуються [13, 14, 17].

Було експериментально визначено та оптимізовано умови проведення якісної реакції Яффе таким чином, щоб специфічно визначати тільки креатинін серед його структуроподібних аналогів: сарказину, сечовини, D(+) глюкози та креатину [13, 14, 17].

Крім тест-систем для медичного діагностування на основі МП було запропоновано колориметричні тест-системи для виявлення забруднювачів води, а саме фенолів, що впливають на стан здоров'я людини та викликають гостре ураження центральної нервової системи, печінки, нирок, серцевого м'яза, крові та ендокринної системи [18, 19]. Феноли – найбільш розповсюджені органічні токсичні сполуки-забруднювачі, які потрапляють у поверхневі води зі стоками нафтопереробної, шкіряної, лісохімічної, коксохімічної та лакофарбової промисловості. За допомогою таких колориметричних тест-систем можливе швидке виявлення їх у воді, що дає змогу запобігти захворюванням, спричиненим фенолом. Для контролю вмісту цих токсинів у воді запропоновано зручні експрес-методи та тест-системи, що працюють як «лакмусовий папірець».

Колориметричні тест-системи для якісного та напівкількісного визначення фенолу у воді.

При створенні колориметричних тест-систем для визначення фенолів також поєднували два аналітичних підходи – молекулярний імпринтинг та кольорові якісні реакції. Критерій створення колориметричних тест-

систем базувались на здатності МП високоселективно адсорбувати сполуку-аналіт та отримувати кольоровий відгук при селективній взаємодії останньої з відповідним реагентом (якісна реакція). Відомо, що при взаємодії з фенолом дають кольорові реакції солі металів, наприклад хлорид заліза – FeCl₃ (фіолетове забарвлення), але це забарвлення не стійке. Було встановлено, що кольорова реакція з 4-аміноантіпріном за наявності фериціаніду калію – K₃[Fe(CN)₆] в аміачному середовищі більш чутлива до фенолу та відбувається з утворенням стійких комплексів малинового кольору [15].

Порядок приготування поліуретан-поліакрилатних МП мембрани, здатних до селективного розпізнавання фенолів, детально описаний в роботах [19–22]. Фенол обирали як аналіт. Порівняння проводили з контрольними мембраними, які не мали сайтів зв'язування фенолу. Відбір функціонального мономеру проводили на основі даних комп'ютерного моделювання та експериментальної оцінки впливу синтезованих плівок на рівень забарвлення. Як найкращий функціональний мономер для фенолу було визнано ітаконову кислоту (ІК) [18]. МП_{ІК} синтезовані на її основі, при проведенні якісної кольорової реакції з 4-аміноантіпріном за наявності K₃[Fe(CN)₆] в аміачному середовищі утворювали стійкі кольорові комплекси.

Контроль здатності МП_{ІК} мембрани адсорбувати

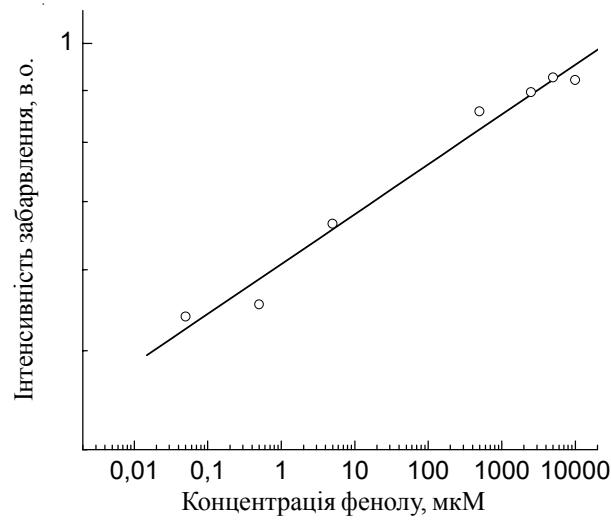
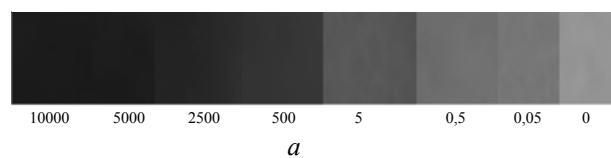


Рис. 4. Ступінь забарвлення МП_{ІК} мембрани після занурення у розчин фенолу різної концентрації та дії якісної кольорової реакції з 4-аміноантіпріном за наявності K₃[Fe(CN)₆] в аміачному середовищі (а); калібрувальний графік для визначення вмісту фенолу у розчині (б)

фенол з водних розчинів проводили за допомогою саме цієї кольорової реакції. На основі експериментальних результатів отримували шкалу відносного забарвлення, з якою в подальшому візуально порівнювали забарвлені МІП_{ІК}.

Тестування МІП_{ІК} і контрольних мембрани, що не містили сайтів зв'язування фенолу, проводили паралельно шляхом занурення у фенольні водні розчини концентрації 0,05–10000 мКМ. Після проведення якісної кольорової реакції фотографували зразки за допомогою цифрового фотоапарата та визначали інтенсивність забарвлення тест-системи у відносних одиницях (в. о.). На рис. 4а спостерігали зміну інтенсивності забарвлення МІП_{ІК} мембрани в сірій гамі від дуже темного кольору до ледве сірого, залежно від концентрації фенолу в розчині. Насправді, кольорова гама забарвлених МІП_{ІК} охоплює різновид малинових відтінків і змінюється від темно-малинового до ледве рожевого.

На базі цих даних було побудовано калібрувальний графік, що надавав змогу визначати концентрацію фенолу у водних розчинах (рис. 4б). Як видно з рисунка,

отримана залежність задовільно (з коефіцієнтом кореляції 0,989) описується лінійною функцією, що свідчить про кореляцію між ступенем забарвлення МІП_{ІК} і концентрацією фенолу в розчині. Діапазон визначення фенолу становить 50 нМ – 10 мМ. Отримане забарвлення стійке, не змінюється впродовж тривалого часу. Створена колориметрична тест-система виявляє високу селективність до фенолу, причому наявність його аналогів майже не впливає на точність визначення. Створені колориметричні тест-системи були апробовані для визначення фенолів не тільки у модельних розчинах, а й на реальних зразках природних і стічних вод [21, 22].

Висновки

Отже, продемонстрована можливість сумісного використання технології молекулярного імпринтингу із методами аналітичної хімії, а саме якісними кольоровими реакціями, що дає змогу створити принципово нові, експресні колориметричні тест-системи для медико-біологічної швидкої діагностики або моніторингу довкілля, що працюють за принципом «лакмусовий папірець».

Література

1. Cameron A., Hakan S. Andersson, Lars I. Andersson, Richard J. Ansell, Nicole Kirsch, Ian A. Nicholls, John O'Mahony, Michael J. Whitcombe Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. // *J. Mol. Recognit.* – 2006. – **19**. – P. 106–180.
2. Wulff G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates – a way towards artificial antibodies // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1995. – **34**. – P. 1812–1840.
3. Guijian Guan, Bianhua Liu, Zhenyang Wang, Zhongping Zhang. Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Applications in Chemosensors // *Sensors*. – 2008. – **8**. – P. 8291–8320.
4. Holthoff E.L., Bright F.V. Molecularly templated materials in chemical sensing // *Anal. Chim. Acta*. – 2007. – **594**. – P. 147–161.
5. Сергеєва Т.А., Сергеєва Л.М. Бровко О.О. Молекулярно-імпринтовані полімери для створення новітніх аналітичних методів. Молекулярно-імпринтовані полімерні мембрани / Полімер. журн. – 2009. – **31**, № 3. – С. 199–206.
6. Svenson J., Nicholls I.A. On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers // *Anal. Chim. Acta* – 2001. – **435**. – P. 19–24.
7. Shiho Tokonami, Hiroshi Shiigi, Tsutomu Nagaoka. Micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications // *Analytica Chim. Acta*. – 2009. – **641**. – P.7–13.
8. Baggiani C., Giovannoli C., Anfossi L., Tozzi C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples // *J. Chromatogr. A*. – 2001. – **938**. – P.35–44.
9. Sant W., Pourcel-Gouzy M.L., Launay J., Colin R., Martinez A., Temple-Boyer P. Development of a creatinine-sensitive sensor for medical analysis // *Sensors and Actuators B-Chem.* – 2004. – **103**, № 1–2. – P.260–264.
10. Ramanavicius A. Amperometric biosensor for the determination of creatinine // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – **387**(5). – P.1899–1906.
11. Rasmussen C.D., Andersen J. E.T., Zachau-Christiansen B. Improved performance of the potentiometric biosensor for the determination of creatinine // *Analytical Lett.* – 2007. – **40**, № 1. – P.39–52.
12. Sergeyeva T.A., Brovko O.O., Piletska E.V., Piletsky S.A., Goncharova L.A., Karabanova L.V., Sergeyeva L.M., El'skaya A.V. Porous molecularly imprinted polymer membranes and polymeric particles // *Analytica Chimica Acta*. – 2007. – **582**. – P.311–319.
13. Бровко О.О., Слінченко О.А., Горбач Л.А., Сергеєва Л.М., Сергеєва Т.А. Композиційні молекулярно-імпринтовані полімерні мембрани для селективної адсорбції біоорганічних молекул // Доп. НАН України. – 2010. – №1. – С.143–147.
14. Горбач Л.А., Бровко О.О., Слінченко О.А., Гончарова Л.А., Сергеєва Л.М., Сергеєва Т.А. Колориметричні тест-системи на основі молекулярно-імпринтованих полімерів для селективного розпізнавання малих біоорганічних молекул // Укр. хим. журн. - 2011. - **77**, № 3. - С. 59-64.
15. Губен-Вейль. Методы органической химии. Т.2. Методы анализа. - М.: Химия, 1967. – 361с.
16. Butler A.R. The Jaff reaction: Identification of the colored species // *Clin.Chim.Acta*. -1976. - **59**. – P.227-232.

17. Sergeyeva T.A., Gorbach L.A., Piletska E.V., Piletsky S.A., Brovko O.O., Honcharova L.A., Lutsyk O.D., Sergeeva L.M., Zinchenko O.A., El'skaya A.V. Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes // *Analytica Chim. Acta.* - 2013. -770. -P.161–168.
18. Sergeyeva T.A., Slinchenko O.A., Gorbach L.A., Matyushov V.F., Brovko O.O., Piletsky S.A., Sergeeva L.M., El'skaya A.V. Colorimetric biomimetic sensor systems based on molecularly imprinted polymer membranes: Development of the biomimetic sensor for phenols detection // *Analytica Chim. Acta.* – 2010. – **659**. – P.274–279
19. Горбач Л.А., Бровко О.О., Гончарова Л.А Слинченко О.А., Сергеєва Л.М., Сергеєва Т.А. Полімерні аналітичні тест-системи для визначення монофенолів у водних розчинах // Полімер. журн. – 2010. – **32**, №1. – С.79-83.
20. Sergeyeva T.A., Gorbach L.A., Slinchenko O.A., Goncharova L.A., Piletska O.V., Brovko O.O., Sergeeva L.M., Elska G.V. Towards development of colorimetric test-systems for phenols detection based on computationally-designed molecularly imprinted polymer membranes // *Mater. Sci. and Eng.* – 2010. – **C30**. – P.431–436.
21. Sergeyeva T.A., Chelyadina D.S., Gorbach L.A., Brovko O.O., Piletska E.V., Piletsky S.A., Sergeeva L.M., El'skaya A.V. Colorimetric biomimetic sensor systems based on molecularly imprinted polymer membranes for highly-selective detection of phenol in environmental samples // *Biopolymers and Cell.* - 2014. - **30**, N3. - P.209-216.
22. Сергеєва Т.А., Челядіна Д.С., Горбач Л.А., Бровко О.О., Сергеєва Л.М., Єльська Г.В. Створення біосенсорних систем на основі молекулярно імпринтованих полімерних мембран для визначення фенолів у воді // Полімер. журн. - 2014. - **36**, №3. - С.289-295.

Надійшла до редакції 18 червня 2015 р.

Колориметрические тест-системы на основе молекулярно импринтированных полимеров для определения токсических веществ

Л.А. Горбач

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

Продемонстрирована возможность совместного применения технологии молекулярного импринтинга и методов аналитической химии, качественных цветных реакций в колориметрических тест-системах. Получены колориметрические тест-системы в виде композиционных мембран с молекулярно импринтированным поверхностным слоем для проведения быстрой медицинской диагностики состояния человека и определения патологических концентраций креатинина. Диапазон действия тест-систем быстрой диагностики составляет 0,25–2,50 mM. На основе полиуретан-полиакрилатных композиций получены колориметрические тест-системы для определения фенолов в модельных и реальных образцах природных и сточных вод. Диапазон действия колориметрических тест-систем для мониторинга окружающей среды 50 нМ –10 mM. Аналитические тест-системы просты в использовании вне лаборатории, работают по принципу «лакмусовой бумажки» и в течении продолжительного времени сохраняют стойкое окрашивание.

Ключевые слова: молекулярно-импринтированные полимеры, колориметрические тест-системы, креатинин, фенол, “лакмусовая бумажка”.

Colorimetric test-systems based on molecular imprinted polymer for detection of toxic substances

L.A. Gorbach

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine
48, Kharkiv'ske shose, Kyiv, 02160, Ukraine

A possibility of combined application of molecular imprinting technology and analytic chemical methods, namely qualitative colour reactions, for colorimetric test-systems was demonstrated. Colorimetric test-systems as composite membranes possessing the surface layer modified with molecular imprinted polymer were obtained. These test-systems were aimed for fast medical diagnostication of outpatient and for detection of the pathological concentration of creatinine. Creatinine concentration region of fast diagnostic test-system sensitivity was 0,25–2,50 mM. Poly(urethane)-poly(acrylate) composite based colorimetric test-systems for detection of phenols in model samples and those of natural water and sewage were obtained as well. Phenol concentration region of test-system for environmental monitoring was 50 nM –10 mM. Analytical test-systems being obtained were used very easy out-laboratory conditions and they worked like “litmus paper” and kept fast coloring very long.

Key words: molecular imprinting polymers, colorimetric test-systems, creatinine, phenols, “litmus paper”.