

О. О. Бровко, О. А. Слінченко, Л. А. Горбач, Л. М. Сергеева,
Т. А. Сергеева

Композиційні молекулярно-імпринтовані полімерні мембрани для селективної адсорбції біоорганічних молекул

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Ю. Ю. Керчею)

Запропоновано новий спосіб створення аналітичних тест-систем для якісного та напівкількісного експрес-визначення вмісту біоорганічних молекул, зокрема креатиніну, в розчинах патологічних концентрацій поза лабораторними умовами. В основу способу покладено метод молекулярного імпринтингу. Застосовуючи поверхневу модифікацію полівініліденфторидних мембран тонким шаром молекулярно-імпринтованого полімеру (МІП) на основі N, N'-метиленбіс(акриламід) та функціонального мономера — 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонової кислоти, отримано композиційні полімерні мембрани, селективні до креатиніну. Для візуалізації креатиніну, адсорбованого поверхневим шаром МІП, використовували здатність креатиніну утворювати у ході реакції Яффе забарвлені комплекси з пікратами.

Останнім часом при розробці нових аналітичних методів, а також у сенсорних технологіях широко використовуються полімерні матеріали з такими властивостями, як міцність, стійкість до агресивних середовищ, біосумісність та можливість багаторазового застосування. Зокрема, при створенні нових сенсорних або аналітичних систем, чутливими елементами яких є полімери, набула поширення технологія молекулярного імпринтингу (матричної полімеризації) [1].

Отримання полімерів за технологією молекулярного імпринтингу, тобто синтез молекулярно-імпринтованих полімерів (МІП) [1, 2], дозволяє формувати у структурі сітчастих полімерів активні сайти, які є синтетичними аналогами біологічних рецепторів. Молекулярний імпринтинг ґрунтується на синтезі сітчастих полімерів у присутності молекул-матриць, які водночас є аналітами, та функціонального мономера. Останній — проміжна ланка між полімерною сіткою та молекулою-матрицею: з першою він сполучений ковалентними зв'язками, а з другою, утворюючи комплекс, — водневими. Подальша екстракція матричних молекул з полімерної сітки веде до утворення в ній “відбитків” з функціональними групами, комплементарними до таких в молекулах-матрицях, і здатних до повторного селективного зв'язування останніх. МІП отримують у вигляді полімерних частинок [3] або плівок [2]. Проте МІП можна отримати також шляхом модифікації, наприклад, полімерних мікрофільтраційних мембран, прищеплюючи на їхній поверхні молекулярно-імпринтований полімер [4]. Таким чином створюється шар, селективний до певних біоорганічних молекул, зокрема креатиніну. У такий спосіб отримували амперометричні [5–7] або потенціометричні сенсори [8, 9].

Враховуючи зазначене вище, метою даної роботи було продемонструвати принципову можливість створення нових ефективних, типу лакмусового папірця, тест-систем для визначення креатиніну на основі композиційних молекулярно-імпринтованих полімерних мембран.

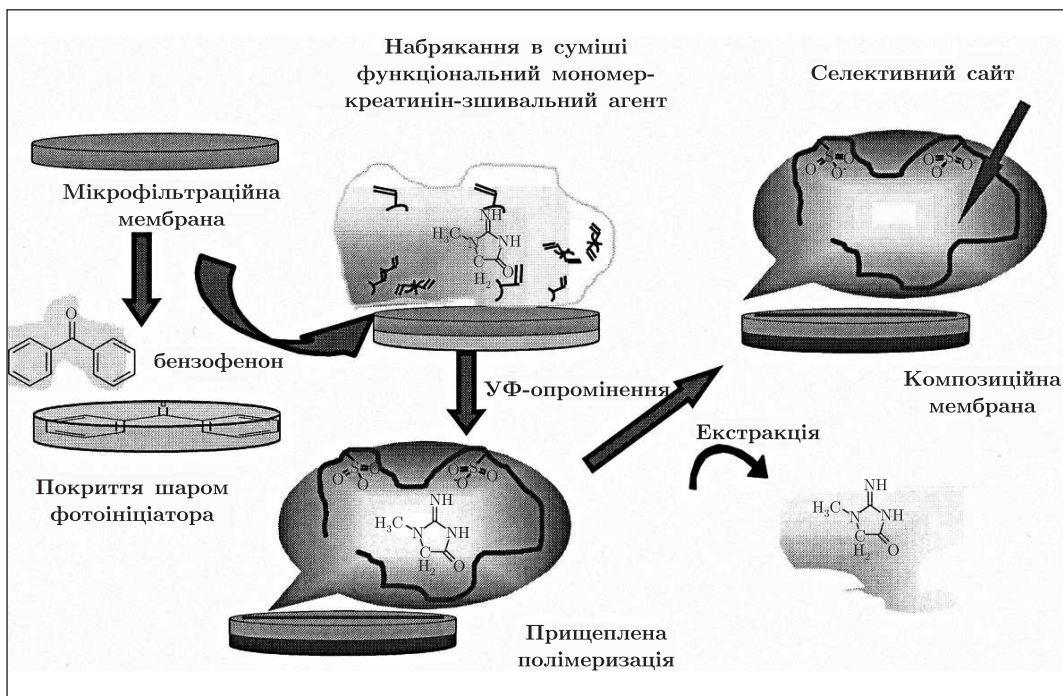


Рис. 1. Схема поверхневої фотоініційованої графт-полімеризації МІП на поверхні мікрофільтраційної полівинілденфторидної мембрани

Як аналіт креатинін був вибраний через те, що визначення його концентрації в крові та сечі є однією з важливих процедур у клінічній хімії. Концентрація креатиніну в плазмі крові практично здорових дорослих людей відносно постійна (62–115 мкМ), збільшення вмісту креатиніну — симптом гострої та хронічної ниркової недостатності, променевої хвороби, гіпертиреозу. Отже, вміст креатиніну в крові та сечі — це показник, який дає можливість судити про стан організму в цілому.

Для модифікації тонким шаром молекулярно-імпринтованого полімеру було вибрано комерційно-доступні мікрофільтраційні полівинілденфторидні (ПВДФ) мембрани з діаметром пор 0,22 мкм. Такий вибір був зумовлений хімічною та механічною стабільністю ПВДФ та високою продуктивністю мембран.

Запропонований підхід дав змогу поєднати високу продуктивність, що властива мікрофільтраційним мембранам, із селективністю при розпізнаванні креатиніну, яка є особливістю МІП. Схему поверхневої фотоініційованої прищепленої полімеризації МІР на поверхні мембрани наведено на рис. 1.

Спочатку мембрани піддавали екстракції у спирті. Потім висушені мембрани обробляли спиртовим розчином бензофенону. Після цього мембрани занурювали в чашки Петрі у водний розчин суміші, що складалась із зшивального агента N,N' -метилєнбіс(акриламід), функціонального мономера — 2-акриламідо-2-метил-1-пропансульфонової кислоти та креатиніну. Передбачали, що використання N,N' -метилєнбіс(акриламід) у процесі поверхневої модифікації мембран буде збільшувати їхню гідрофільність, що є важливим фактором при роботі з водними розчинами. Формування прищепленого на поверхні МІП здійснювали, проводячи ініційовану УФ-опроміненням полімеризацію. Поверхнево модифіковані мембрани піддавали спочатку екстракції у спирті для видалення незаполімеризованих низькомолеку-

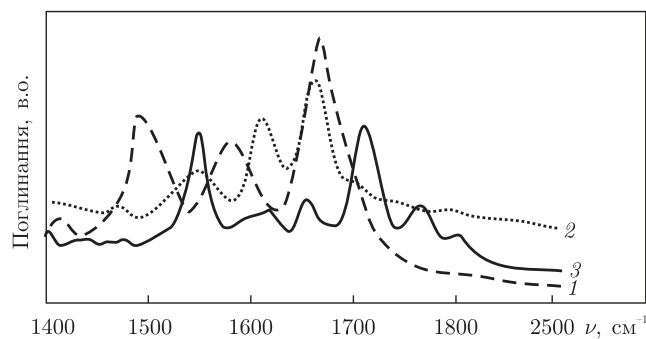


Рис. 2. Фрагменти ІЧ-спектрів поглинання в області 1400–1900 см^{-1} для креатиніну (1), 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонової кислоти (2) та суміші креатиніну з 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфоновою кислотою (3)

лярних компонентів, а потім відмивали у воді. Висушені мембрани зважували та визначали їхній ступінь прищеплення за різницею їхньої маси до та після поверхневої модифікації.

Найважливішою складовою МПП є функціональний мономер, який вибирається таким чином, щоб він, з одного боку, завдяки ковалентному зв'язуванню вбудовувався в структуру сітчастого полімеру, а, з другого — завдяки водневим зв'язкам утворював сталий комплекс з молекулами аналіту (молекулами-матрицями). На стадії формування МПП головну роль відіграє взаємодія між групами молекул функціонального мономера і молекул-матриць, оскільки це зумовлює геометричне формування сайтів зв'язування в таких полімерах. Ця взаємодія дуже важлива також при подальшому селективному розпізнаванні молекул аналітів за допомогою відповідних МПП. Отже, синтезу будь-яких МПП мають передувати дослідження взаємодії між функціональним мономером і аналітом — утворення сталого комплексу.

Для визначення особливостей взаємодії креатиніну з 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфоновою кислотою використовували метод ІЧ-спектроскопії. Використовуючи ІЧ-спектрометр з фур'є-перетворенням “Tensor37” (Bruker) було отримано спектри в області 600–4000 см^{-1} . Зразки для досліджень використовували у вигляді таблеток з КВг.

На рис. 2 наведено спектри креатиніну, 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонової кислоти та суміші креатиніну з 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфоновою кислотою. Зразки креатиніну з 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфоновою кислотою готували в етанолі, потім видаляли розчинник, при цьому утворювалися білі голчаті кристали.

ІЧ-спектр суміші креатиніну з кислотою на відміну від спектрів індивідуальних компонентів характеризується появою нових смуг, см^{-1} : 1710, 1767, 1800. Смуга при 1710 см^{-1} може бути пояснена утворенням в суміші $-\text{C}=\text{N}^+$ (смуга $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ на 20–50 см^{-1} вища, за таку для вільної $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ [10], для індивідуального креатиніну цю смугу спостерігаємо при 1668 см^{-1}). Автори роботи [11] припускають, що у випадку взаємодії кислот з креатиніном утворюється комплекс з переносом протона та пояснюють появу смуг в області 1750–1800 см^{-1} протонуванням іміногрупи креатиніну. Отже, поява на спектрах додаткових смуг свідчить про взаємодію креатиніну з кислотою. Таким чином, дані ІЧ-спектроскопії доводять, що між креатиніном та 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфоновою кислотою утворюється комплекс з переносом протона.

Як відомо, найбільш характерною якісною реакцією на креатинін є реакція Яффе [12], яка відбувається між креатиніном і пікриновою кислотою (ПК) у лужному середови-



Рис. 3. Залежність ступеня забарвлення модифікованих молекулярно-імпринтованим полімером полівініліденфторидних мембран від концентрації водних розчинів креатиніну, з яких було проведено сорбцію

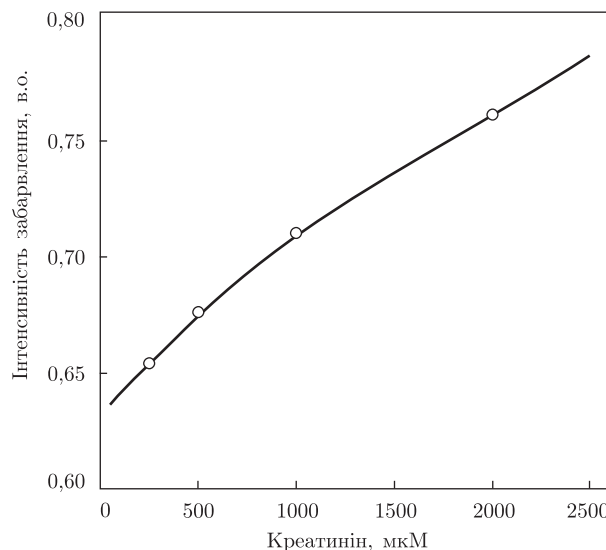


Рис. 4. Залежність інтенсивності забарвлення модифікованих молекулярно-імпринтованим полімером полівініліденфторидних мембран від концентрації водних розчинів креатиніну, з яких було проведено сорбцію

щі з отриманням креатинін-пikратного комплексу, забарвленого у помаранчево-червоний колір.

З метою контролю здатності поверхнево-модифікованих мембран адсорбувати креатинін з водних розчинів було використано візуальний метод, що базується на формуванні забарвлених комплексів креатиніну з пікратами.

Для цього модифіковані мембрани занурювали у розчини креатиніну різних концентрацій на 3 год, промивали дистильованою водою, яку потім видаляли з поверхні мембран за допомогою фільтрувального паперу. В подальшому мембрани обробляли сумішню водних розчинів 2%-ї пікринової кислоти та 10%-м NaOH. Адсорбований поверхневим шаром модифікованих мембран креатинін під дією ПК у лужному середовищі забарвлював мембрани в помаранчево-червоний колір. Інтенсивність цього забарвлення залежала від концентрації креатиніну (рис. 3). Використовуючи програмне забезпечення BioRag “Quantity One”, було визначено відносні значення інтенсивності забарвлення смуг, зображених на рис. 3, та з отриманими даними побудовано залежність інтенсивності забарвлення від вмісту креатиніну в розчині (рис. 4).

Таким чином, запропоновано новий спосіб створення аналітичних тест-систем для якісного та напівкількісного визначення вмісту біоорганічних молекул поза лабораторними умовами, в основу якого покладено метод молекулярного імпринтингу. Отримані експериментальні результати показали, що досліджувані композиційні молекулярно-імпринтовані полімерні мембрани можуть бути основою для створення простих та ефективних коло-

риметричних тест-систем для експрес-визначення креатиніну патологічних концентрацій у фізіологічних розчинах.

1. Wulff G. Molecular recognition in polymers prepared by imprinting with templates // *Reactive Polymers*. – 1991. – **15**. – P. 233–247.
2. Sergeeva T. A., Piletsky S. A., Piletska E. V. et al. In Situ Formation of Porous Molecularly Imprinted Polymer Membranes // *Macromolecules*. – 2003. – **36**. – P. 7352–7357.
3. Baggiani C., Anfossi L., Giovannoli C. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers // *Anal. Chim. Acta*. – 2007. – **591**, No 1. – P. 29–39.
4. Sreenivasan K. Detection of creatinine enriched on a surface imprinted polystyrene film using FT-ATR-IR // *J. Mol. Recog.* – 2006. – **19**. – P. 408–412.
5. Ramanavicius A. Amperometric biosensor for the determination of creatinine // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – **387**, No 5. – P. 1899–1906.
6. Hsiue G. H., Lu P. L., Chen J. C. Multienzyme-immobilized modified polypropylene membrane for an amperometric creatinine biosensor // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2004. – **92**, No 5. – P. 3126–3134.
7. Benkert A., Scheller F., Schossler W. et al. Development of a creatinine ELISA and an amperometric antibody-based creatinine sensor with a detection limit in the nanomolar range // *Anal. Chem.* – 2000. – **72**, No 5. – P. 916–921.
8. Magalhaes Julia M. C. S., Machado Adelio A. S. C. Array of potentiometric sensors for the analyst of creatinine in urine samples // *Analyst*. – 2002. – **127**, No 8. – P. 1069–1075.
9. Rasmussen C. D., Andersen J. E. T., Zachau-Christiansen B. Improved performance of the potentiometric biosensor for the determination of creatinine // *Anal. Lett.* – 2007. – **40**, No 1. – P. 39–52.
10. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. – Москва: Мир, 1965. – 216 с.
11. Smith G., White J. M. Molecular cocrystals of carboxylic acids: the preparation of the 1: 1 proton-transfer compounds of creatinine with a series of aromatic acids and the crystal structure of that with pyrazine-2,3-dicarboxylic acid // *Aust. J. Chem.* – 2001. – **54**. – P. 97–100.
12. Butler A. R. The Jaff reaction: Identification of the colored species // *Clin. Chim. Acta*. – 1976. – **59**. – P. 227–232.

Інститут хімії високомолекулярних
сполук НАН України, Київ
Інститут молекулярної біології
та генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 06.05.2009

**O. O. Brovko, O. A. Slinchenko, L. A. Gorbach, L. M. Sergeeva,
T. A. Sergeeva**

Composite molecular-imprinted polymeric membranes for selective absorption of bioorganic molecules

A new technique is proposed to develop the analytical test-systems for the qualitative and semi-quantitative analysis of bioorganic molecules, particularly creatinine, within solutions of pathological concentrations outside the laboratory conditions. The technique is based on the molecular imprinting method. Using the method of surface modification of polyvinylidene fluoride membranes with a thin layer of molecularly imprinted polymer (MIP) based on N,N'-methylenebis(acrylamide) and functional monomer – 2-acrylamide-2-methyl-1-propanesulfonic acid, the creatinine selective composite polymeric membranes are obtained. In order to visualize creatinine adsorbed by the surface MIP layer, the ability of creatinine to form, due to Jaff's reaction, the colored complexes with picrates is used.