

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”**

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

"На правах рукопису"

УДК _____

МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

з спеціальності 8.05140101 – промислова біотехнологія
(код та назва спеціальності)

на тему: Створення сенсорних систем для визначення сульфаметоксазолу на основі штучних аналогів біологічних рецепторів

Студент групи БТ-31(м) Іванова А.В.
(шифр групи) (прізвище, ім'я, по батькові)

Науковий керівник доц., к.т.н. Тодосійчук Т.С.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Консультанти: д.б.н., с.н.с. Сергєєва Т.А., к.т.н., доц. Орленко А.Т.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

ВСТУП

Значне погіршення екологічної ситуації в Україні зумовлено багатьма факторами, в тому числі стрімким накопиченням фармацевтичних препаратів у довкіллі і, в результаті, в організмі людини. Виявлення біологічно активних речовин можливе з використанням ряду фізико-хімічних методів, а також з використанням біосенсорних методів. Жоден метод не є досконалим, зокрема, істотним недоліком усіх біосенсорних пристроїв є нестабільність їх чутливих елементів.

Тому метою роботи є створення, оптимізація та дослідження основних робочих характеристик колориметричних біосенсорних систем для селективного визначення сульфаметоксазолу на основі аналогів біологічних рецепторів, отриманих методом молекулярного імпринтингу, та їх застосування для контролю якості комерційно-доступних сульфамідних препаратів, що містять цей антибіотик.

Об'єктом дослідження данної роботи є колориметричні біосенсорні системи для визначення фармацевтичних препаратів, зокрема, сульфаметоксазолу на основі штучних аналогів біологічних рецепторів у формі мембран, синтезованих згідно методу молекулярного імпринтингу. Такі системи здатні до високоселективного розпізнавання речовин - аналітів, в присутності яких були отримані, за механізмами, подібними до природних.

Предметом дослідження є процеси розпізнавання фармацевтичних препаратів штучними аналогами біологічних аналіз властивостей отриманих полімерів та робочих характеристик сенсорних систем на їхній основі.

У результаті проведеної роботи було розроблено колориметричну біосенсорну систему у вигляді МПП зі штучними рецепторними сайтами, селективними до сульфаметоксазолу, оптимізовано метод візуалізації якісного та кількісного визначення сульфаметоксазолу в розчині та за допомогою отриманого МПП, встановлено оптимальні умови для реакції зв'язування аналіт-МПП. Отримана колориметрична система може бути використана для експрес-аналізу розчинів фармацевтичних препаратів.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Методи дослідження

Отримання МПП - мембран методом радикальної полімеризації *in situ*.

Синтез МПП мембран, селективних до сульфаметоксазолу, методом радикальної полімеризації *in situ* проведено за такими етапами: підготування робочої поверхні, розрахунок та приготування композиції для МПП - мембрани, полімеризація композиції, формування сайтів зв'язування.

До складу композицій для МПП - мембран та контрольних мембран включено: 1) матрицю (сульфометоксазол), 2) функціональний мономер, 3) зшиваючий агент, 4) модифікатор-еластифікатор, 5) органічний розчинник, 6) додатковий пороутворювач. Компоненти композиції зважують на аналітичних вагах з точністю до 0,001г, гомогенізують їх до прозорої системи. Суміш підігрівають на плитці до розчинення сипких компонентів та розплавлення пороутворювача. Ініціатор полімеризації додається безпосередньо перед початком процесу. Оскільки кисень повітря інгібує реакцію полімеризації, нагріта підготовлена суміш полімеризується між скляними пластинами. Мономерну суміш наносять на скляну пластину, накривають її другою пластиною та затискають струбцинами.

Підготовка МПП - мембран методом Сокслет-екстракції.

Для звільнення функціональних груп мембрани та видалення матриці застосовують екстракцію в апараті Сокслета. Екстракція проводиться етиловим спиртом, який знаходиться в колбі, розміщеній у гнізді для нагрівання. Цей метод забезпечує значну економію розчинника, що використовується для екстракції матричних молекул та незаполімеризованих компонентів. Під час екстракції відбувається видалення матричних молекул (сульфаметоксазолу) і утворення порожнин, які за формою та розміром, а також розташуванням функціональних груп комплементарні матричним молекулам.

Метод якісного визначення сульфаметоксазолу в розчині.

Сульфаметоксазол в розчині або зв'язаний на поверхні МПП - мембрани візуалізують із застосуванням забарвлюючої суміші водних розчинів феррицианід калію: нітропруссид натрію 15% у співвідношенні 1:1, яка в лужному середовищі (що створюється додаванням 15% - вого розчину натрію гідроксиду) утворює коричневі комплекси з сульфаметоксазолом.

Колориметрична біосенсорна системи для визначення сульфаметоксазолу на основі МПП - мембран.

Зразки МПП-мембран та контрольних мембран розміром 0,5×0,5 см застосовують для адсорбції сульфаметоксазолу та його аналогів з розчину. Після цього адсорбований на поверхні мембран аналіт виявляють шляхом реакції із забарвлюючою сумішшю та проявником. Спочатку на мембрану наносять 50 мкл суміші для фарбування (10-15% - вий розчин феррицианіду калію + 10-15%-вий розчин нітропруссиду натрію у співвідношенні 1:1), потім 20 мкл 10-15%-вого розчину натрію гідроксиду, що призводить до появи коричневого забарвлення. Інтенсивність забарвлення, що утворюється в результаті цієї реакції, є пропорційною концентрації сульфаметоксазолу в аналізованому зразку.

Метод оцінки забарвленості системи з використанням комп'ютерної обробки зображень

Інтенсивність забарвлення мембран оцінювали з використанням програми аналізу зображень "Scion Image 4.0". Дана програма дозволяє оцінити інтенсивність забарвлення області екрану, мінімальне та максимальне значення, розподілення густини кольору.

Результати та їх обговорення

Згідно даних попереднього комп'ютерного моделювання, описаного у роботі [1], розраховано енергії молекулярної взаємодії з сульфаметоксазолом ряду функціональних мономерів, сформовано уявлення про можливу структуру штучних рецепторний сайтів зв'язування сульфаметоксазолу у молекулярно імпринтованих полімерних мембранах. Для виконання роботи обрано 2-

акриламід-2-метил-1-пропансульфонову, ітаконову та метакриловою кислоти, що забезпечують такі енергії взаємодії з сульфаметоксазолом: $-50,29$ кКал/М, $-35,15$ кКал/М та $-29,46$ кКал/М, відповідно.

Обрано методом синтезу штучних рецепторів метод молекулярного імпринтингу як найбільш ефективний через отримання таких матеріалів у вигляді полімерних мембран. Розраховано та підготовлено композиції для синтезу МПІ та контрольних мембранз використанням в якості функціональних мономерів наступних речовин: метакрилова кислота (МАК), ітаконова кислота (ІК), 2-акриламід-2-метилпропансульфонові кислота (АМПСК) із співвідношенням компонентів 1:1, 1:2, 1:3, 1:4.

Проведено кількісне спектрофотометричне визначення сульфаметоксазолу в розчині при оптимальному співвідношенні забарвлюючих компонентів (розчини ферриціаніду калію та нітропруссиду натрію) та регулятора рН (розчину гідроксиду натрію).

Отримані МПІ використані як колориметричні системи для визначення концентрації сульфаметоксазолу в розчині ацетонітрилу. Найкращий сенсорний відгук отриманий для МПІ з ІК та АМПСК при співвідношенні компонентів у мономерній композиції 1:2.

Встановлено, що отримані МПІ з АМПСК є високоселективними до сульфаметоксазолу порівняно з його структурними аналогами. Зменшення неспецифічного зв'язування і зростання сенсорного відгуку спостерігається при зміщенні рН зразка в кислу область (рН 3,5 - 5).

Колориметричну систему з АМПСК використано для аналізу реальних зразків лікарських засобів (Бісептол у формі таблетки виробника " Паб'яніцький фармацевтичний завод Польфа" та Бісептол у формі сиропу виробника " Мейдана Фарма").

За отриманими даними підтверджена заявлена виробником мінімальна концентрація сульфаметоксазолу для таблетки та виявлено, що для сиропу фактична концентрація значно менша за заявлену.

ВИСНОВКИ

В даній роботі розглянуто проблеми ідентифікації фармацевтичних препаратів, зокрема, сульфаніламідів. Перспективним визнаний метод з використанням МПП - мембран на основі штучних аналогів біологічних рецепторів, розроблений на базі Інституту молекулярної біології НАН України та описаний в роботах Сергєєвої Т.А. та співавторів [1].

На основі даних попереднього комп'ютерного моделювання розраховано склад та отримані колориметричні системи у формі мембран методом полімеризації *in situ*, селективні до сульфаметоксазолу, з ІК, МАК та АМПСК в якості функціональних мономерів.

Вивчення властивостей отриманих МПП та особливостей якісної реакції на сульфаметоксазол у розчині дозволило створення простих у використанні колориметричних систем. Розроблені системи використані для визначення концентрації чистого препарату сульфаметоксазолу в розчині та аналізу реальних зразків лікарських засобів.

Ключові слова

СУЛЬФАНІЛАМІД, БІОСЕНСОР, МОЛЕКУЛЯРНО ІМПРИНТОВАНИЙ ПОЛІМЕР, МЕМБРАНА, СЕЛЕКТИВНІСТЬ.

Публікації

1.Сергєєва Т.А. Сенсорна система для визначення сульфаметоксазолу на основі молекулярно імпринтованих полімерних мембран / Т.А.Сергєєва, О.В.Пілецька, Л.А.Горбач, А.В. Іванова, О.О.Бровко, Г.В. Єльська. // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2015.- в друці.

2.Сергєєва Т.А. Сенсорні системи для визначення сульфаніламідних препаратів на основі наноструктурованих полімерних мембран. / Т.А.Сергєєва, А.В.Іванова, О.В. Пілецька. // Наноструктуровані біосумісні/біоактивні матеріали: Тези доповідей Всеукраїнської конференції з міжнародною участю, присвяченій 85-річчю з дня народження академіка НАН України О.О.Чуйка. – К.- Україна: 2015. – С. 183.