

*Г.Б. ХАЛЕД, А.В. КУКОБА, канд. фіз.-мат. наук, О.М. БІЛАШ,
Ю.Т. ЖОЛУДОВ, канд. фіз.-мат. наук, Д.В. СНИЖКО, канд. техн. наук,
К.М. МУЗИКА, д-р техн. наук*

ЕЛЕКТРОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНА ПЛАТФОРМА ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СЛІДОВИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПОЛІЦИКЛІЧНИХ АРОМАТИЧНИХ ВУГЛЕВОДНІВ

1. Вступ

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) – це органічні сполуки, для яких характерна наявність в хімічній структурі двох і більше конденсованих бензольних кілець. ПАВ класифікуються як за кількістю бензольних кілець, так і за канцерогенною дією [1]. В цілому ПАВ є ліпофільними сполуками, що демонструють високу спорідненість до органічних речовин. Завдяки великій гідрофобності, а також низькій розчинності у воді, ПАВ часто присутні у водному середовищі у слідових концентраціях. Максимальний рівень забруднення для ПАВ у питній воді становить 0,2 мкг/л [2]. Як показано у огляді [3], визначення ПАВ у природних об'єктах відноситься до числа складних аналітичних задач. Для їх вирішення застосовуються сучасні методи аналізу: хромато-масспектрометрія (ГХ-МС), газова хроматографія (ГХ) і високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Основним недоліком даних методів є висока вартість.

Актуальною задачею, на вирішення якої спрямована робота, є розробка методу визначення слідових концентрацій ПАВ, значно дешевшого у практичній реалізації у порівнянні з переліченими вище методами.

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

У зарубіжжі з'являються роботи, де для детектування ПАВ використовуються сенсори, зокрема, електрохімічні електрохемілюмінесцентні (ЕХЛ). Такий підхід є значно дешевшим, ніж застосування ВЕРХ та ГХ-МС. Тим не менш, електрохімічні сенсори мають значно нижчу чутливість, яка недостатня для визначення слідових кількостей ПАВ у воді [4]. Підвищити чутливість електрохімічного сенсору вдалось у контексті біосенсорів. У роботі [5] розроблено сенсорну платформу на основі моношару молекул пірену. Електрохімічне розпізнавання базувалося на реєстрації зміни переносу електронів при формуванні π - π -сендвіч-комплексів між молекулами ПАВ та моношаром пірену. Така супрамолекулярна взаємодія між ароматичними молекулами забезпечила високу чутливість визначення пірену на рівні детектування частки на трильйони (ppt). Однак до недоліків такого підходу можна віднести високу ймовірність хибнопозитивних результатів. Це пояснюється тим, що численна кількість молекул може формувати π - π -сендвіч-комплекси з сенсорним шаром. У роботі [6] описано електрохімічний біосенсор для визначення одного з ПАВ – бензпірену (БП). Біологічним матеріалом сенсору служили молекули ДНК, іммобілізовані на поверхні електроду зі скловуглецю, модифікованого геміном і нафіон-графеном за технологією «layer-by-layer». Однак сенсори на основі біологічних матеріалів мають певні недоліки, пов'язані з високою вартістю та фізико-хімічною нестабільністю біологічного матеріалу. Для того щоб підвищити чутливість визначення ПАВ без застосування біологічних матеріалів, доцільно було б застосовувати ЕХЛ метод детектування, який серед електрохімічних та люмінесцентних методів має найнижчу межу виявлення [7].

У роботі [8] повідомлялось про застосування нанотрубок TiO_2 з наночастинками Ag у ЕХЛ виявленні ПАВ, а саме БП. Гідрофобний БП поглинався на поверхні нанотрубок і окислювався ними. Це призводило до зменшення інтенсивності ЕХЛ-сигналу. Так, за оптимальних умов аналізу лінійний діапазон концентрацій визначення БП становив від 3 пМ до 1 нМ. Сполуки, які не могли бути окисленими на TiO_2 нанотрубках, зокрема, бензол, нафталін, ан-

трацен, мало впливали на зміну ЕХЛ-сигналу. Тому запропонований метод детектування ПАВ розповсюджується тільки на ПАВ з хімічною структурою, що містить більше, ніж чотири бензольних кільця.

Враховуючи, що більшість ПАВ є генотоксичними, з'явилися методи їх детектування, засновані на використанні ДНК у чутливому шарі сенсора та реєстрацією ДНК-аддуктів після взаємодії з ПАВ. Так, у роботі [9] продемонстровано ЕХЛ мікропоточний чип для визначення БП. В якості ЕХЛ-біореактора даного чипу застосовувалось поєднання ДНК, ферментів та металлополімеру рутенію. Формування аддуктів ДНК визначалось ЕХЛ-методом. Концентрація БП оцінювалась шляхом порівняння інтенсивності ЕХЛ з контрольним зразком. Подібна дослідження проводилась у роботі [10], у якій мікрофлюїдний паперовий ЕХЛ-мікропристрій застосовувався для швидкого вимірювання наявності БП. Аналітичний відгук реєструвався за зміною ЕХЛ-сигналу, яка відбувалась при формуванні ДНК аддуктів з БП. Варто зауважити, що обидва приклади вимагають використання ДНК, який є досить дорогим і нестабільним біоматеріалом. У роботі [11] описано методику ЕХЛ-визначення БП за рахунок використання квантових точок з CdTe, функціоналізованих β -циклодекстрином. Специфічна взаємодія між β -циклодекстрином та бензпіреном за типом «гість-господар» призводила до зниження інтенсивності ЕХЛ квантових точок. Таким чином, було досягнуто визначення БП у лінійному діапазоні концентрацій від 87 пМ до 10 нМ. Слабким місцем запропонованої методики на основі ефекту затухання ЕХЛ є висока можливість отримання хибно-позитивних результатів. Це пояснюється тим, що на гасіння інтенсивності ЕХЛ може впливати багато неконтрольованих факторів.

Враховуючи аналіз вказаних робіт, можна відзначити, що для ефективного чутливого визначення ПАВ ЕХЛ методом доцільно розробити таку методику, яка б:

- не потребувала використання біоматеріалів у складі сенсорної поверхні електроду;
- не потребувала додаткового застосування наноматеріалів (зокрема, нанотрубок чи квантових точок), оскільки це ускладнює технологію створення сенсорного пристрою і саму процедуру аналізу;
- ґрунтувалась на посиленні ЕХЛ-сигналу за наявності ПАВ у системі, а не на гасінні сигналу, яке є менш специфічним.

Зауважимо, що чутливість методу ЕХЛ значно посилюються у 2D-форматі проведення дослідження. Це пояснюється тим, що процеси переносу електрону та генерування квантів ЕХЛ відбуваються на поверхні електроду, а не в об'ємі розчину. Переведення ЕХЛ-аналізу у 2D-формат можливе за рахунок іммобілізації молекул-аналітів (які є люмінофорами) на поверхні електроду. Такий підхід дозволяє підвищити поверхневу концентрацію речовин, що визначаються в ході ЕХЛ-аналізу і, тим самим, знизити межу визначення. Створення впорядкованих нанорозмірних плівок з іммобілізованими аналітами можливе за допомогою використання технології Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ) [12]. Технологія ЛБ дозволяє отримати моно- і мультишарові високоорганізовані плівки з контрольованою товщиною, орієнтацією і високою поверхневою щільністю люмінесцентних центрів [13]. Оскільки ПАВ є ефективними електрохемілюмінофорами, тому їх інкорпорування у моно- чи мультишарові плівки ЛБ можна покласти в основу методики твердофазного ЕХЛ-визначення ПАВ з низькою межею виявлення.

Реалізація даного підходу стримується проблемою, пов'язаною зі складністю формування плівок ЛБ з неленгмюрогенними речовинами, до яких належать ПАВ. ПАВ, зокрема рубрен, не є амфіфільними і не здатні самостійно утворювати однорідні і стабільні ЛБ-моношари на поверхні водної субфазі і, таким чином, ЛБ-плівки.

3. Ціль та задачі дослідження

Метою даного дослідження є розробка ЕХЛ-платформи для твердофазного визначення слідових концентрацій ПАВ.

Для досягнення мети роботи необхідно вирішити низку задач:

- а) розробити методику екстракції модельних ПАВ з водних зразків;
- б) розробити технологію створення твердофазної ЕХЛ-платформи;
- в) протестувати розроблену ЕХЛ-платформу щодо визначення ПАВ у водних модельних зразках.

4. Матеріали і методи розробки ЕХЛ-платформи з сенсорними ЛБ-шарами для визначення ПАВ у водних розчинах

4.1. Методика екстракції модельних ПАВ

Як вже зазначалося, ПАВи є вкрай гідрофобними речовинами, що зазвичай виникають в процесах спалювання органічного палива. Тобто вони потрапляють в повітря, де існують у вигляді наночасток. З повітря ці наночастки вимиваються дощовими опадами до природних вод, де не розчиняються, а продовжують існувати у вигляді наночасток. Для достовірного моделювання процесу екстракції ПАВ з природних вод необхідно отримати зразки водних розчинів, в яких відома кількість модельних ПАВ введена саме у вигляді наночасток. Для отримання таких модельних розчинів була застосована методика осадження наночасток рубрену та ДФА, що була досліджена А. Бардом зі співробітником [14].

У рамках цієї методики ПАВи розчинялись в органічних розчинниках, які в будь-якій кількості повністю розчинялись у воді. Невеликий об'єм концентрованого розчину ПАВ в органічному розчиннику при інтенсивному перемішуванні інjektувався у великий обсяг дистильованої води. Органічний розчинник розчинявся у воді, а ПАВи висаджувались з нього у вигляді різноманітних за формами і розмірами наночасток [13]. У якості розчинника модельних ПАВ було застосовано диметилформамід (ДМФА), який змішується з водою у будь-яких пропорціях. Для екстракції модельних ПАВ було вирішено застосувати толуол. Попередні досліди, проведені з толуолом, довели, що 10 мл толуолу під дією ультразвукового диспергатору створюють стійку емульсію з 500 мл води. Через добу приблизно 9 мл толуолу збирається в вузькій частині мірної колби, звідкіля його дуже просто можна відібрати за допомогою дозатору. На підставі цих даних було вирішено для відпрацювання технології екстракції ПАВ застосувати 5 мл толуолу на 500 мл водної проби. Така кількість екстрагента пов'язана з необхідністю отримання не менше 3 мл готового екстракту для вимірювання його спектру поглинання за допомогою спектрофотометру «OceanOptics QE65000» з його стандартною кварцовою кюветою з внутрішніми розмірами 10x10x40 мм³.

Загальний вміст (концентрація) ПАВ розраховувався таким чином, щоб в результаті процесу екстракції отримати кількість модельних ПАВів, необхідну для створення моношарової ЛБ-плівки з поверхневою концентрацією ПАВів біля 50 % на робочій поверхні ЛБ-ванни LT-101 ($S=305 \text{ см}^2$).

Процедура екстракції модельних ПАВів відбувалась в наступній послідовності операцій.

Підготовка зразків водних розчинів ПАВів. В 20 мл ДМФА було розчинено 7 мкмоль ДФА (концентрація ДФА 0,35 мМ). В інших 20 мл ДМФА було розчинено 7 мкмоль рубрену (концентрація рубрену, як модельного ПАВ, становила 0,35 мМ). Далі 1 мл кожного з цих розчинів було додано, відповідно, в дві пробірки з 5 мл чистого толуолу в кожній. Таким чином, було отримано два зразкових толуольних розчина з концентрацією рубрену та ДФА в 58,3 мкМ, для яких були досліджені спектри поглинання (рис. 1 та 2, криві 1) та виміряна екстинкція.

У дві круглі плоскодонні мірні колби було залито по 500 мл дистильованої води. Далі ці розчини було перелито в трикутні широкогорлі плоскодонні колби об'ємом по 750 мл для проведення ультразвукової диспергації. Середню частину відповідної колби було під'єднано до ультразвукового диспергатору. Туди інjektувалось по 1 мл диметилформамідних розчинів модельних ПАВ для продукування наночасток на їх основі. Під дією ультразвуку проби перебували близько трьох хвилин. Таким чином, було отримано дві модельні водні проби, які мали в своєму складі 0,35 мкмоль наночасток ДФА та рубрену відповідно.

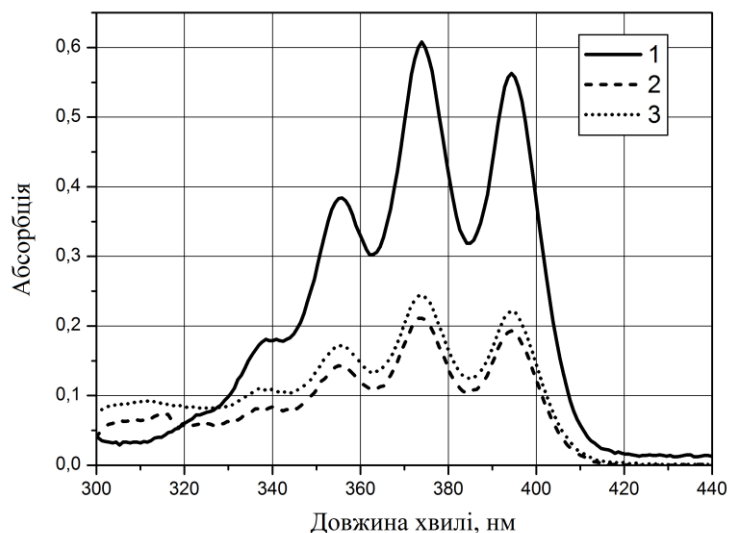


Рис. 1. Спектри поглинання: зразкового толуольного розчину з концентрацією ДФА в 58,3 мкМ (крива 1); толуольного екстракту, отриманого через добу (крива 2); толуольного екстракту, отриманого через 12 діб (крива 3)

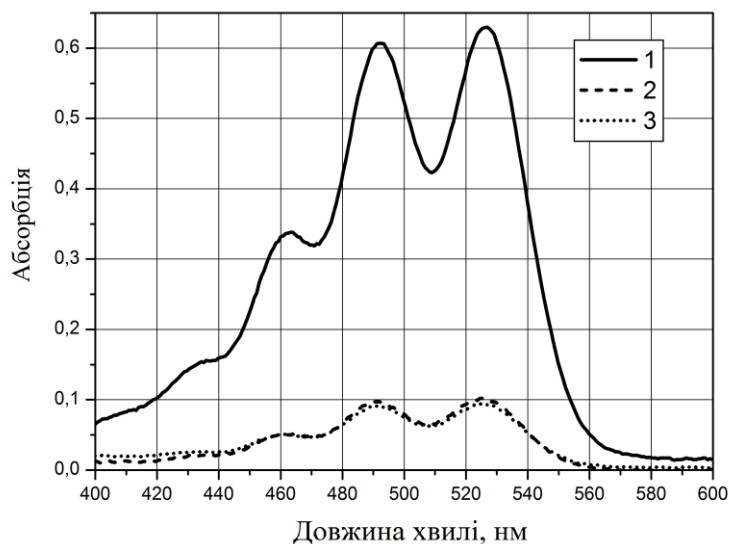


Рис. 2. Спектри поглинання: зразкового толуольного розчину з концентрацією рубрену в 58,3 мкМ (крива 1); толуольного екстракту, отриманого через добу (крива 2); толуольного екстракту, отриманого через 12 діб (крива 3)

Екстракція модельних ПАВ з водних зразків.

Зразки водних розчинів модельних ПАВ (по 500 мл кожного) в трикутних широкогорлих плоскодонних колбах об'ємом по 750 мл по чергово розміщувались на робочому столі ультразвукового диспергатора. Під час дії ультразвуку в середню частину розчину інжектувалося по 5 мл толуолу. За рахунок кавітації толуол формував стійку емульсію. Після інжекції толуолу розчин оброблявся ультразвуком протягом трьох хвилин. Після цих процедур емульговані розчини переливались в мірні колби, які герметично укупуорювались. Для виключення можливих фотохімічних реакцій за участю ПАВів розшарування емульсії відбувалось у темряві. Через добу було отримано біля 4,14 мл кожного з толуольних екстрактів. З цих екстрактів було відібрано по 3 мл для дослідження спектрів поглинання. Розрахунки показали, що в результаті екстракції було отримано 24,8 % введеного в модельний водний розчин ДФА і 11,8 % введеного рубрену, що є досить задовільним результатом. Аналіз форми спектру поглинання вказує на відсутність помітних хімічних перетворень ПАВів в процесі екстракції.

Для додаткового контролю відібрані зразки толуольних екстрактів були повернуті назад у мірні колби з відповідними водними розчинами для подальшого розстоювання. Через дванадцять діб витримки в темряві зразки екстрактів, об'єм яких практично не змінився, були повторно досліджені. Як видно з наведених даних (рис. 1 та 2, криві 3), спектри поглинання екстрактів суттєво не змінилися, що вказує на практичне завершення процедури екстракції навіть за одну добу.

4.2. Технологія створення твердофазної аналітичної ЕХЛ-платформи

Технологія створення твердофазної аналітичної платформи базувалась на технології ЛБ. При цьому, для формування моношарів на поверхні робочого електроду ЕХЛ-платформи використовувалася ЛБ-ванна типу LT-102 виробництва фірми "Microtestmachines Co" (Республіка Беларусь). Поверхнева структура отриманих моношарів контролювалася на нанорівні атомно-силовим мікроскопом NT-206 тієї ж фірми. Аналітичні дослідження проводилися методом циклічної вольтамперометрії з одночасною реєстрацією інтенсивності ЕХЛ.

Головна вимога до речовин, що мають бути впорядковані у ЛБ-шари, – здатність утворювати фазово-однорідну систему. З урахуванням останнього, в якості ленгмюрогенних матриць в роботі використані відомі ленгмюрогенні як мономерні, так і полімерні сполуки – стеаринова кислота, октадециловий спирт, поліметилметакрилат (ПММА), поліамідокислота і суміш поліамідокислоти і октадецилового спирту. Для усіх цих речовин були досліджені умови формування і перенесення моношарів на струмопровідні підкладки з скловуглецю.

Під час розробки технологія ЕХЛ-платформи досліджено криві стиснення ($\pi - A$ ізотерми) бінарної системи стеаринова кислота / рубрен та ПММА / рубрен. Наявність характерного злому відповідних $\pi - A$ ізотерм вказувала на те, що в усі відібрані матриці вдавалося інкорпорувати до 50 молярних відсотків модельних ПАВ без порушення впорядкованості моношарів. З урахуванням того, що максимальна чутливість аналізу досягається при одному ЛБ-моношарі, а ефективність електрохімічного окислення рубрену при подальшому збільшенні кількості моношарів може змінюватись (зменшуватись), розроблена ЕХЛ-платформа містила тільки один шар для проведення твердофазного аналізу.

Дослідження інтенсивності флуоресценції модифікованих ЛБ-шарами електродів-сенсорів однозначно вказують, що найкращі результати були досягнуті за використання матриці з ПММА. Надалі усі дослідження проводилися тільки для матриць з ПММА. При цьому поверхневий тиск при нанесенні моношарів був у діапазоні $14 \div 16$ мН/м. Матеріал прозорого електрода-сенсора, на який наносились ЛБ-плівки, – ІТО.

5. Обговорення результатів тестування електроду з ЛБ-наношарами при визначенні модельних ПАВ

Для тестування розробленої ЕХЛ-платформи було створено робочі електроди, модифіковані одним ЛБ-моношаром ПММА з інкорпорованими в різній поверхневій концентрації модельними ПАВми. Ці робочі електроди розміщувались у триелектродній ЕХЛ-платформі. На робочий електрод подавалася циклічна напруга, що змінювалася лінійно зі швидкістю в 100 мВ/с. На рис. 3 наведено калібрувальний графік для розробленого сенсору ПАВ.

Графік було отримано для максимальних значень інтенсивності ЕХЛ відповідних сенсорів. Як видно з рис. 3, калібрувальний графік є достатньо лінійним в дослідженому інтервалі зміни поверхневої концентрації модельних ПАВ. У якості співреагента для молекул рубрену використовувався трипропіламін з концентрацією 10 мМ. Лінійний діапазон концентрацій ПАВ становив $10^{-10} - 10^{-13}$ моль.

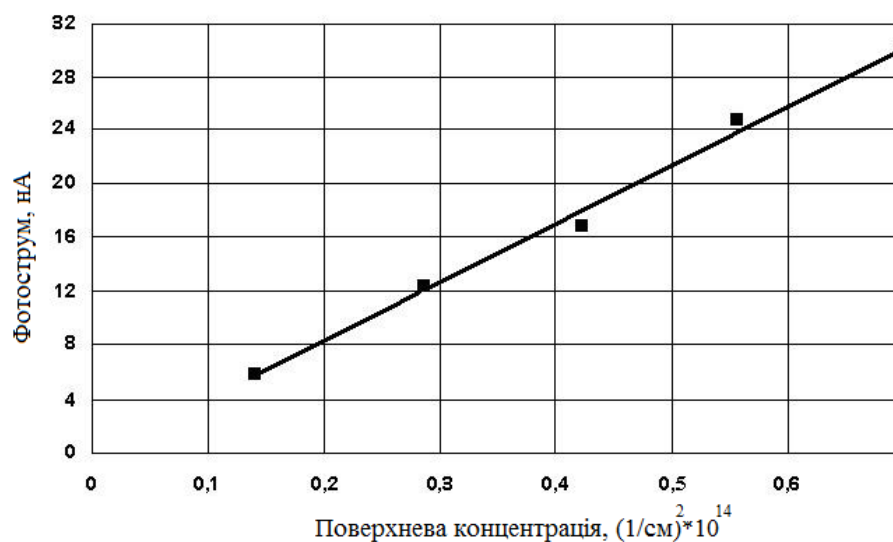


Рис. 3. Залежність інтенсивності ЕХЛ (фотострум) розробленого сенсора від поверхневої концентрації модельного ПАВ. Поверхнева структура електроду-сенсора – один ЛБ-моношар ПММА/рубрен; активна площа робочого електроду 0,75см²; розчинник – вода; фоновий електроліт – 0,1М NaClO₄; співреагент – 10мМ трипропіламін

7. Висновки

1. Розроблено методику екстракції модельних ПАВ з водних зразків.
2. Визначено умови формування впорядкованого ЛБ-моношару з модельним ПАВ (рубреном). Показано, що рубрен може утворювати однорідні і стабільні ЛБ-моношари на поверхні водної субфази і, таким чином, ЛБ-плівки на основі ПММА. Матеріал прозорого електроду-сенсора, на який наносились ЛБ-плівки – ІТО.
3. Визначено оптимальну кількість ЛБ-моношарів на робочому електроді ЕХЛ-сенсорного пристрою, яка становила 1. При цьому поверхневий тиск при нанесенні моношарів був у діапазоні 14 – 16 мН/м.
4. Електроди з іммобілізованими ЛБ-наношарами було протестовано ЕХЛ-методом у водному середовищі при визначенні рубрену. При цьому у якості співреагента для молекул рубрену використовувався трипропіламін з концентрацією 10 мМ. Лінійний діапазон концентрацій ПАВ становив 10⁻¹⁰–10⁻¹³ моль.

Таким чином, розроблено ЕХЛ-платформу твердофазного визначення слідових концентрацій ПАВ. Досягти низької межі виявлення вдалось за рахунок реалізації ЕХЛ-визначення ПАВів у твердофазному форматі.

Список літератури:

1. Sousa J.C.G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines // Journal of Hazardous Materials. 2018. Vol. 344. P. 146-162.
2. Bruzzoniti M. C., Fungi, M., & Sarzanini, C. Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC // Analytical Methods. 2010. Vol.2(6). P. 739-745.
3. Dat N. & Chang M. B. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies // Science of the Total Environment. 2017. Vol. 609. P. 682-693.
4. Kumar S., Negi S. & Maiti, P. Biological and analytical techniques used for detection of polyaromatic hydrocarbons // Environmental Science and Pollution Research. 2017. Vol.24(33). P. 25810-25827.
5. Muñoz J., Crivillers N., Mas-Torrent M. Carbon-Rich Monolayers on ITO as Highly Sensitive Platforms for Detecting Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water: The Case of Pyrene // Chemistry - A European Journal. 2017. Vol.23(61). P. 15289-15293.
6. Ni Y., Wang P., Song H., Lin X., Kokot S. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-grapheme biosensor // Anal Chim Acta. 2014. Vol. 821. P. 34-40.
7. Muzyka K., Saqib M., Liu Z., Zhang W., & Xu G. Progress and challenges in electrochemiluminescent aptasensors // Biosensors and Bioelectronics. 2017. Vol. 92. P. 241-258.
8. Li J., Yang L., Luo S., Chen B., Li J., Lin H., Cai Q., Yao S. Polycyclic aromatic hydrocarbon detection by

electrochemiluminescence generating Ag/TiO₂ nanotubes // Anal Chem. 2010. Vol. 82(17). P. 7357-7361.

9. Wasalathanthri D. P., Malla S., Bist I., Tang C. K., Faria R. C., & Rusling J.F. High-throughput metabolic genotoxicity screening with a fluidic microwell chip and electrochemiluminescence // Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology. 2013. Vol. 13(23). P. 4554-4562.

10. Mani V., Kadimisetty K., Malla S., Joshi A. A. & Rusling J. F. Paper-based electrochemiluminescent screening for genotoxic activity in the environment // Environmental Science and Technology. 2013. Vol. 47(4). P. 1937-1944.

11. Yang M., Wang Y., & Wang H. β -Cyclodextrin functionalized CdTe quantum dots for electrochemiluminescent detection of benzo[a]pyrene // Electrochimica Acta. 2015. Vol. 169. P. 7-12.

12. Kausar A. Survey on Langmuir-Blodgett films of polymer and polymeric composite // Polymer - Plastics Technology and Engineering. 2017. Vol. 56(9). P.932-945.

13. Huang J., Yang K., Liu S. & Jiang, H. High-brightness organic double-quantum-well electroluminescent devices // Applied Physics Letters. 2000. Vol. 77(12). P. 1750-1752.

14. Omer K. M. & Bard A. J. Electrogenerated chemiluminescence of Aromatic Hydrocarbon Nanoparticles in an Aqueous Solution // J. Phys. Chem. C. 2009. Vol. 113(27). P. 11575-11578.

*Харківський національний
університет радіоелектроніки*

Надійшла до редколегії 12.02.2018