

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра общей и неорганической химии

**Получение селективных сорбентов модификацией молекулярно имприн-  
тированным полианилином**

**АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ**

студента 2 курса 251 группы  
направления 04.04.01 «Химия»  
Института химии  
Бирюкова Ильнура Рушановича

Научный руководитель:  
профессор, д.х.н., доцент

\_\_\_\_\_

дата, подпись

Н. А. Бурмистрова

Заведующий кафедрой  
д.х.н., проф.

\_\_\_\_\_

дата, подпись

И. Ю. Горячева

Саратов 2024



## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы.**

Выращивание, хранение и транспортировка зерна и его продуктов связаны с рядом сложностей, обусловленных, в частности нарушением условий хранения и развитием плесневых грибов в тёплой и влажной среде. Стандартными методами определения уровня содержания микотоксинов являются высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовыми и масс-спектрометрическими детекторами, различные варианты иммуноанализа, а также иммунохимические экспресс тест-методы [1]. На сегодня эти методики являются основными, но в них существуют большие недостатки, которые ограничивают их использование и которые необходимо устранить. Существуют примеры [2–5] успешного создания систем искусственного распознавания, например, синтетических антител, основной методикой получения которых является молекулярный импринтинг. Полученные импринтированные полимеры могут использоваться при проведении твердофазной экстракции в случае модификации наночастиц, например оксида кремния (IV) или иммуноанализа в случае микротитровального планшета, способствуя значительному снижению себестоимости анализа, а также появлению возможности проведения исследований в более экстремальных условиях.

**Целью данной работы является** разработка методик модификации поверхности наночастиц оксида кремния (IV) – НЧ SiO<sub>2</sub> и полистирольного микротитровального планшета – МТП с помощью ПАНИ-МИП, специфичных к ЗЕА. Выбор ЗЕА в качестве молекул шаблона обусловлен необходимостью контроля содержания загрязнителей не антропогенного происхождения в зерновых культурах. Для достижения данной цели поставлены следующие **задачи**:

1. Выбор структурных аналогов ЗЕА для применения в качестве молекулы-шаблона при получении МИП ПАНИ;
2. Изучение влияния различных факторов и выбор оптимальных условий модификации поверхности МТП с помощью МИП ПАНИ

3. Изучение влияния различных факторов и выбор оптимальных условий модификации поверхности НЧ SiO<sub>2</sub> с помощью МИП ПАНИ
4. Оптимизация методики удаления молекул шаблона после получения МИП на поверхности МТП и НЧ SiO<sub>2</sub>
5. Изучение сорбционных характеристик полученных МИП при экстракции соединений кумаринового ряда из модельных растворов и ЗЕА из искусственно загрязненного образца пшеницы.

**Краткая характеристика методов исследования.** Для решения задач, поставленных в данной работе, применяли комплекс физических методов исследования: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, динамическое рассеяние света. Объекты исследования - модифицированные импринтированным полимером частицы оксида кремния (IV) и микротитровальный планшет; МИП, полученные в присутствии низкомолекулярных шаблонов: ЗЕА и его структурных аналогов — 4-гидроксикумарина (4-ГК) и кумарина.

**Описание структуры работы.** Работа состоит из введения, трёх глав (литературного обзора, экспериментальной части и обсуждения результатов), заключения, списка использованных источников, инструктажа по охране труда и технике безопасности. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 51 страницу, включающих 2 таблицы и 14 рисунков. Проанализировано 77 литературных источника.

**Научная значимость работы:**

- Проведён синтез МИП, специфичных к низкомолекулярным соединениям — ЗЕА и 4-ГК;
- Оптимизирована методика очистки ПАНИ@МИП МТП и ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub>;
- Изучены оптимальные условия для получения импринтированных полимеров на основе ПАНИ;

— Проведено исследование групповой специфичности ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> к молекулам кумаринового ряда;

— Проведена экстракция аналита из реального образца с извлечением 57%.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы и определены основные цели и задачи.

В **первой главе** рассмотрены основные схемы проведения молекулярного импринтинга и искусственных систем распознавания, приведены их достоинства и недостатки. Описаны методы синтеза импринтированных полимеров и влияние условий синтеза на получаемые рецепторные элементы. Приведено обоснование выбора матричных молекул и молекул шаблона.

Одной из особенностей метода молекулярного импринтинга является возможность применения к широкому кругу аналитов, однако не все они могут участвовать в молекулярном импринтинге. Молекулярные структуры микотоксинов содержат различные полярные группы, которые могут участвовать в образовании водородных связей или ион-парных взаимодействий с функциональными мономерами, а также растворителями, сшивающими агентами и радикальными инициаторами [1]. Проблема использования микотоксинов в основном возникает из-за их высокой токсичности и риска долгосрочных эффектов. Количество вещества, необходимого для приготовления импринтированного полимера и последующей проверки твердофазной экстракции может превышать допустимую концентрацию. Эффективным подходом является замена шаблона на молекулы с похожей структурой. Имитирующая структура должна быть подобна целевому аналиту таким образом, чтобы получить импринтированные полости связывания с хорошей селективностью по отношению к последнему. Также молекулы аналога должна структурно отличаться, чтобы ее можно было четко отличить от целевой молекулы во время аналитического разделения, выполняемого после этапа экстракции.

По результатам анализа литературы показана и обоснована необходимость синтеза синтетических элементов распознавания с использованием подхода молекулярного импринтинга на подложках частиц диоксида кремния и микротитровального планшета. Намечены пути адаптации синтеза и условий получения МИП на основе 4-ГК под цель и задачи работы.

Во **второй главе** проведена информация об используемых реагентах, материалах, оборудовании, и методикам синтеза импринтированных полимеров и установления аналитических характеристик полученного рецепторного элемента.

ПАНИ МИП на поверхности микропланшета получали по двухстадийной методике [2], изменяя объём синтеза и вариант молекулы шаблона под цели эксперимента. Свежеприготовленный раствор гидрохлорида анилина  $C_6H_8ClN$  (1 М, 100 мкл) в 0,2 М HCl вносили в лунки микроплашета, затем свежеприготовленный раствор  $(NH_4)_2S_2O_8$  (1,25 М, 100 мкл), также растворённого в 0,2 М HCl, приливали для окисления мономеров анилина. Полученную смесь инкубировали (25 °С) в течение 90 с до образования слоя ПАНИ. На втором этапе проводили импринтинг структур ПАНИ в присутствии молекулы шаблона. Для этого в раствор гидрохлорида анилина (15,4 мМ, 6 мМ HCl) вносили 4-ГК (154 мкМ) и инкубировали (25°С) в течение 30 мин. После чего в лунки последовательно вносили раствор ассоциата (100 мкл/лунка) и пероксодисульфата аммония (17,5 мМ, 6 мМ HCl), инкубировали (25°С, 90 мин) и удаляли реакционную смесь из лунок. Модифицированную поверхность лунок промывали раствором аскорбиновой кислоты (5,7 мМ, БД, 300 мкл/лунка) и БД (3 повторения, 300 мкл/лунка) для удаления непрореагировавших остатков окислителя. После модификации лунки итеропланшета промывали раствором аскорбиновой кислоты (5,7 мМ в бидистиллированной воде, 200 мкл) (рис. 1). Для контроля полноты вымывания шаблона регистрировали спектры поглощения смеси после очистки. Процедуру повторяли до исчезновения характеристического пика молекулы шаблона (280 нм). После завершения очистки модифицированный МТП трижды промывали бидистиллированной водой.

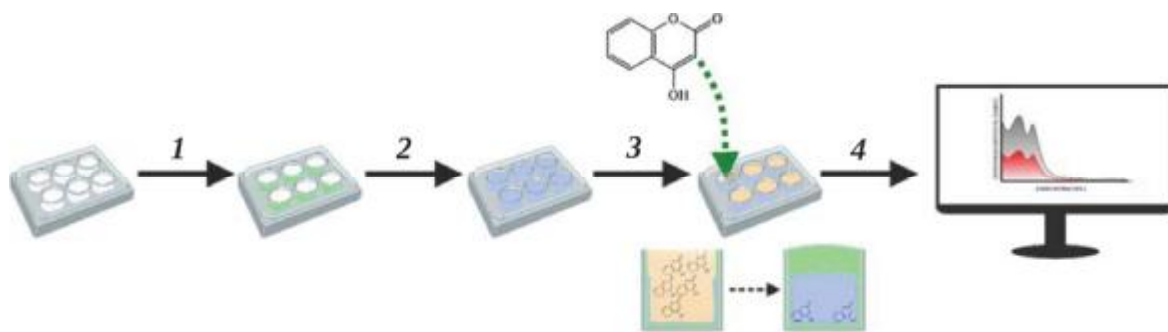


Рис. 1. Твердофазная экстракция на ПАНИ МИП: 1 – синтез удерживающего слоя ПАНИ; 2 – получение анти-4-ГК МИП на поверхности микропланшета; 3 – внесение модельного раствора 4-ГК (5 мкг/мл, БД) в модифицированные лунки, проведение твердофазной экстракции; 4 – регистрация спектров поглощения надосадочной жидкости

Получение неимпринтированных полимеров проводили на поверхности лунок полистирольного микропланшета с предварительной модификацией слоя ПАНИ по такой же методике, но без добавления молекулы шаблона

$\text{SiO}_2$ @ПАНИ МИП, селективного к 4-ГК на поверхности частиц Аэросила получали по модифицированной методике [3], методом химической окислительной полимеризации. К водному раствору гидрохлорида анилина (110 мМ), содержащему 4-ГК (20 мМ, 3,2 мг/мл) добавляли частицы Aerosil®200 (66,7 мг) и инкубировали (1 ч, 25 °С). После чего в смесь с помощью шприцевого насоса (0,5 мл/ч, 8ч, 25°С) вносили раствор пероксидисульфата аммония (55 мМ, БД) при перемешивании. (рис.). Модифицированные ПАНИ МИП частицы  $\text{SiO}_2$  фильтровали и высушивали в вакууме при нагревании (50°С) (рис. 2). Получение неимпринтированных структур ПАНИ на поверхности  $\text{SiO}_2$  проведено аналогично, без добавления молекулы шаблона.

Очистку полученных ПАНИ@МИП  $\text{SiO}_2$  от молекул шаблона проводили методами статической, динамической и циклической непрерывной экстракции. Статическую экстракцию проводили последовательным промыванием образцов смесью растворов  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$  (9:1),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  и бидистиллированной водой. Растворитель приливали к образцам и перемешивали в течение 30 мин. Для контроля полноты вымывания молекулы шаблона частицы осаждали цен-

трифугированием ( $6000\times g$ , 5 мин), отбирали надосадочную жидкость для регистрации спектров поглощения.

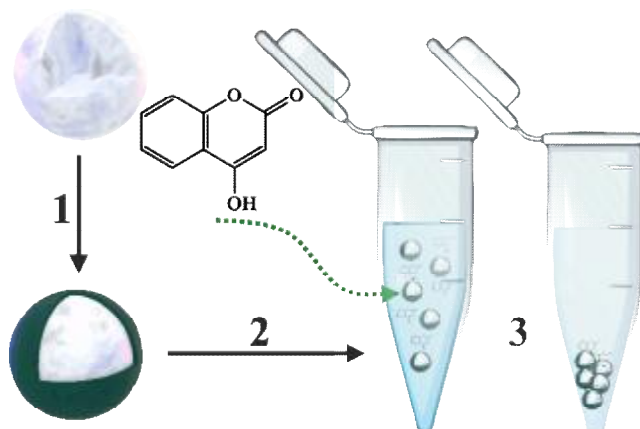


Рис. 2. Схема исследования: 1 — модификация поверхности SiO<sub>2</sub> ПАНИ МИП; 2 — внесение SiO<sub>2</sub>@ПАНИ МИП в водный раствор 4-ГК (5 мкг/мл); 3 — выделение 4-ГК из раствора

Динамическую экстракцию проводили последовательным промыванием образцов раствором C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН:СН<sub>3</sub>СООН (9:1). Растворитель пропускали через колонку с сорбентом в течение нескольких дней при постоянной скорости элюирования.

Непрерывную циклическую экстракцию проводили в аппарате Сокслета. Внутрь экстрактора помещали образец SiO<sub>2</sub>@МИП ПАНИ в бумажном патроне. Раствор C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН:СН<sub>3</sub>СООН (9:1) нагревали до кипения, после заполнения камеры экстракции сливали растворитель и регистрировали его спектр поглощения. Очистку проводили до исчезновения характерного пика для молекулы-шаблона (280 нм) на спектрах поглощения растворителя.

Для извлечения 4-ГК из модельного раствора к сорбенту (1 мг) добавляли модельный раствор 4-ГК (2 мл, 5 мкг/мл), проводили перемешивание (1 ч) и осаждение центрифугированием ( $8000\times g$ , 5 мин). Для определения концентрации 4-ГК в надосадочной жидкости регистрировали спектры поглощения (200–500 нм).

К сорбенту, очищенному по методике статической или динамической экстракции, вносили раствор 4-ГК (50,7  $\mu$ М, 2 мл), подкисленный НСl до необходимой кислотности (1, 2, 3, 4, 5, 6 рН) или подщелоченный NaOH (8, 9 рН) и



проводили перемешивание, далее осаждали центрифугированием (12000 об/мин, 10 мин). Для определения концентрации 4-ГК в надосадочной жидкости регистрировали спектры поглощения (200–500 нм).

Навеску молотого зерна пшеницы (1 г) экстрагировали в 5 мл смеси ацетонитрил/вода (70:30) в течение 15 мин на горизонтальном шейкере (25°C). Полученный раствор центрифугировали (6000×g, 20 мин), надосадочную жидкость разводили в четыре раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (конечное разведение составляло 1/20). Для определения концентрации 4-ГК в надосадочной жидкости регистрировали спектры поглощения (200–500 нм)

В третьей главе обсуждаются полученные результаты и приводятся аналитические характеристики синтезированных ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> и ПАНИ@МИП МТП. Применение стандартных 96-луночных МТП в качестве подложки для молекулярного импринтинга представляет определённый интерес ввиду возможности применения стандартных методик, широко распространенных в области медицины и аналитической химии. Однако ввиду ограниченной площади поверхности лунок при поверхностном импринтинге достигается предел сорбционной ёмкости МИП. Чтобы преодолеть этот недостаток предложена методика модификации поверхности аморфных частиц диоксида кремния импринтированным ПАНИ. Использование частиц НЧ SiO<sub>2</sub> обусловлено простотой их получения, высокой площадью поверхности и химической инертностью.

Исследование поверхности МИП ПАНИ и ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> проводилось методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис.3). В отличие от лунок микропланшета цельный слой у частиц SiO<sub>2</sub> не был сформирован и границы отдельных частиц чётко определены. Диаметр частиц составлял от 60 до 100 нм, что говорит об агломерации в процессе импринтинга. Удерживающий слой ПАНИ на поверхности МТП сформирован частицами диаметром 30 нм с редкими включениями.

ИК-спектроскопия проводилась при длинах волн 500-3000 см<sup>-1</sup> для выявления импринтированного полимера на поверхностях подложек. В обоих спектрах присутствуют полосы 1600 и 1493 см<sup>-1</sup>, которые соответствуют колебани-

ям хиноидного (N=Q=N) и бензольного (N-B-N) колец, полоса  $1306\text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям связи C-N, а полоса поглощения  $1155\text{ см}^{-1}$  в спектре, по-видимому, связана с колебаниями фрагмента B-NH+-Q. Интенсивность бензольной компоненты немного больше, чем у хиноидной (рис. 4). Наличие обеих полос указывает на частично окисленное состояние полианилина во всех образцах, что соответствует эмералдиновой форме ПАНИ.

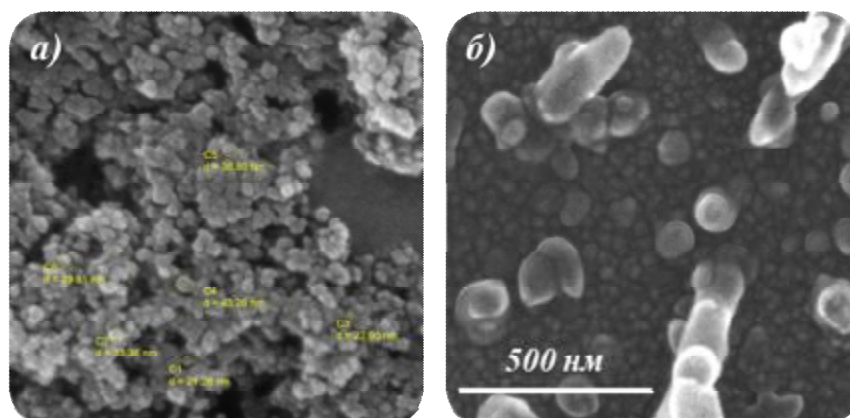


Рисунок 3 □ СЭМ-изображение модифицированных анти-4ГК МИП ПАНИ частиц SiO<sub>2</sub> (а) и поверхности микропланшета (б)

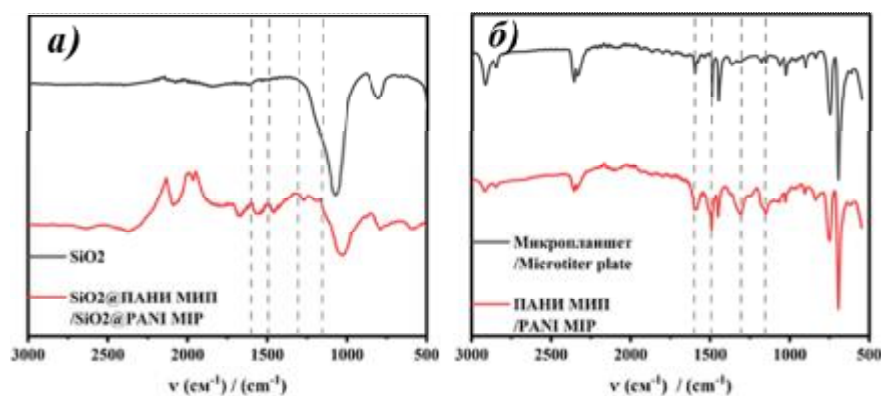


Рисунок 4 □ ИК-Фурье спектроскопия модифицированных анти-4ГК МИП ПАНИ частиц SiO<sub>2</sub> (а) и поверхности микропланшета (б)

Проведено сравнительное изучение методов очистки МИП ПАНИ от молекул шаблонов. Результаты представлены проекциями спектров поглощения надосадочных жидкостей и фракций после проведения экстракции 4-ГК из МИП ПАНИ (рис. 5).

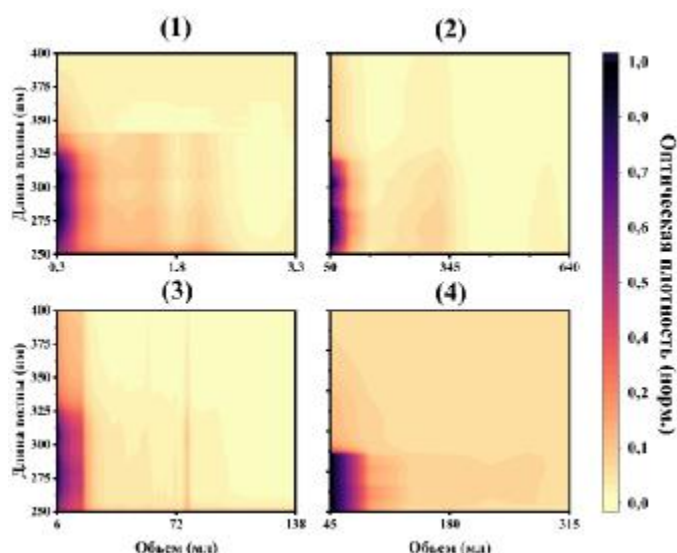


Рисунок 5 □ Влияние объёма элюента на проекции спектров поглощения фракций полученных при очистке сайтов связывания МИП на поверхности микропланшета (1) и частиц SiO<sub>2</sub> (2,3,4). Удаление молекул шаблона статической (1,2), динамической (3) и непрерывной циклической экстракцией (4)

Полученная матрица данных визуализирована с помощью тепловых карт и результаты показывают уменьшение сигнала оптической плотности в зависимости от объёма элюента. Для удаления молекулы шаблона из слоя ИП на поверхности планшета доступен только метод статической экстракции.

Протонирование среды в процессе сорбции может оказать значительное воздействие на сродство полостей связывания к молекуле шаблону. Наноразмерные слои полианилина в форме эмеральдиновой соли придают поверхности гидрофильные и анионообменные свойства, а также характеризуются высокой чувствительностью и обратимостью к изменению pH-среды. Для доказательства был проведён эксперимент с сорбцией аналита в водных растворах кислоты или щёлочи.

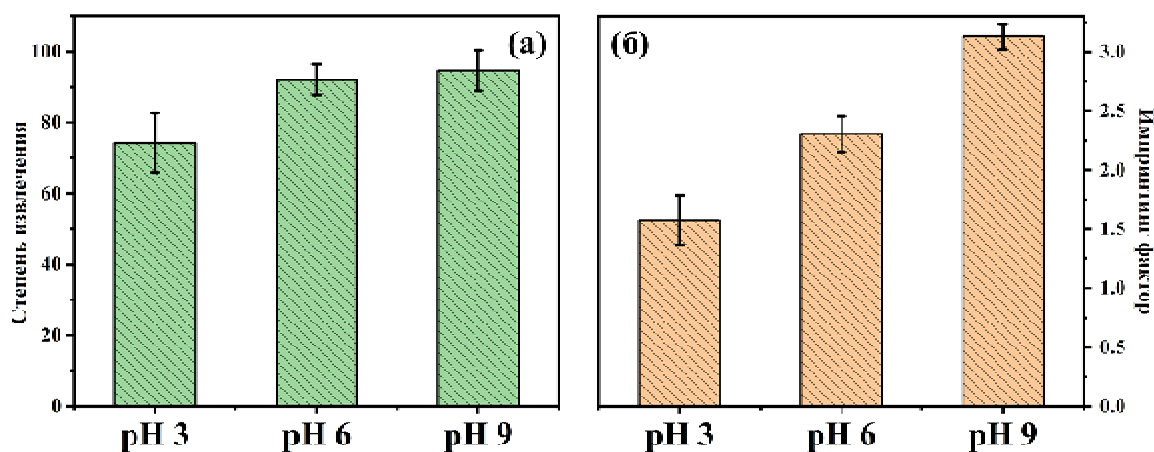


Рис. 6. Степень извлечения образцов SiO<sub>2</sub>@ПАНИ МИП, очищенных статической экстракцией при разных рН

Показано, что кислотность среды (рис. 6) значительно влияет на степень извлечения 4-ГК из модельного раствора (15 мкг). Степень извлечения увеличивается с возрастанием рН, достигая максимума при рН ~ 5 (92%). В то же время максимальная специфичность сорбции достигнута при рН ~ 9 (ИФ = 3,1). Данный эффект может быть объяснён нейтрализацией частично положительно заряженной поверхности ПАНИ отрицательно заряженными гидроксил ионами, что снижает неспецифическую электростатическую сорбцию.

На 5 мг высушенного порошка SiO<sub>2</sub>@МИП ПАНИ и НИП добавлялся 10 мкг/мл 4-ГК. 10 мин ультразвук, 1 час перемешивание. Центрифугирование 6000 об/мин. Проводилась съёмка поглощения надосадочной жидкости в диапазоне 200–500 нм.

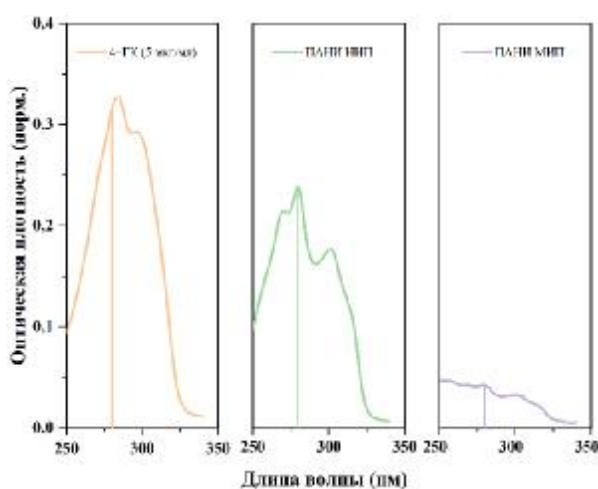


Рис.7 . Спектры поглощения 4-ГК - исходного раствора, после выделения с помощью ПАНИ НИП и ПАНИ МИП

Степень извлечения 4-ГК (15 мкг, БД) на модифицированную МИП ПА-НИ поверхность лунок микропланшета составила 28,0% (ИФ = 1,3). SiO<sub>2</sub>@МИП ПАНИ показывает степень сорбции в 2,9 раза выше, 81%, при этом ИФ достигает значения 6,2, что показывает специфичность сайтов связывания (рис. 7). Низкие значения степени и специфичности извлечения у микропланшета обусловлены отсутствием структур типа нанопроволок при получении ПАНИ МИП, приводящим к образованию меньшего количества сайтов связывания.

Для оценки специфичности полученного ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> к ЗЕА проводили экстракцию микотоксина из искусственно загрязнённого экстракта пшеницы и извлечение структурно близких аналогов (рис. 8).

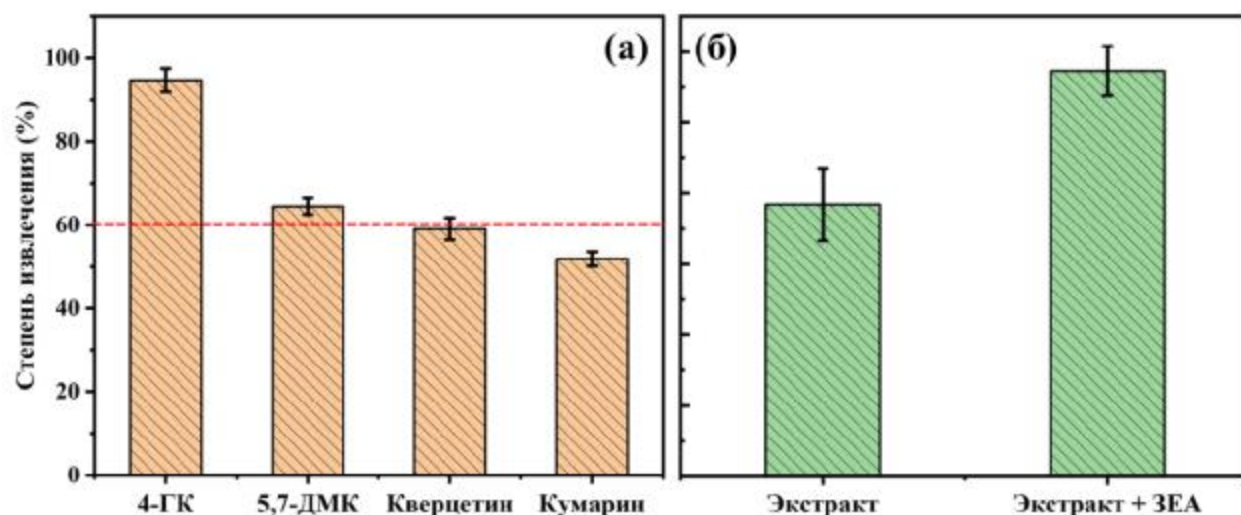


Рис. 8. Степень извлечения структурно близких соединений из модельных растворов (а) и ЗЕА из экстракта пшеницы (б) до и после внесения ЗЕА (10 мкг/мл) с использованием SiO<sub>2</sub>@МИП ПАНИ (10 мг)

В выбранных условиях (рН 9) степень извлечения 5,7-диметоксикумарина составила 65,0%, кверцетина 55,0%, кумарина 51,2% соответственно. Уменьшение эффективности извлечения может быть объяснено различиями в строении молекул. Изучение сорбции ЗЕА из образца экстракта пшеницы и экстракта пшеницы, искусственно загрязнённого ЗЕА (10 мкг/мл), демонстрирует степень извлечения 38 и 57% соответственно. Данный эффект связан со значительным

содержанием в экстракте соединений кумаринового ряда, которые снижают специфическую сорбцию ЗЕА.

**Заключение:** Разработана методика синтеза МИП с использованием в качестве молекул-шаблонов структурных аналогов ЗЕА на поверхности несорбирующего полистирольного планшета и коммерчески доступных частиц оксида кремния (IV). Изучены оптимальные условия для получения импринтированных полимеров на основе ПАНИ. Показано, что сорбционные свойства ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> выше, чем для ПАНИ@МИП МТП. Селективность и степень извлечения увеличиваются при повышении pH среды с максимумом при pH = 9. Определены аналитические характеристики синтезированных ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> для определения 4-ГК (Сорбционная ёмкость = 4,4 мкг/г; импринтинг фактор = 6,2). Проведено исследование групповой специфичности ПАНИ@МИП SiO<sub>2</sub> к молекулам кумаринового ряда.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Moreno-Bondi M.C. et al. Immuno-Like Assays and Biomimetic Microchips // *Molecular Imprinting* / ed. Haupt K. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. P. 111–164.
2. Mosbach K. Molecular imprinting // *Trends in Biochemical Sciences*. 1994. Vol. 19, № 1. P. 9–14.
3. Belbruno J.J. Molecularly Imprinted Polymers: review-article // *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 2019. Vol. 119, № 1. P. 94–119.
4. Ansari S., Masoum S. Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: Current progress and future implications // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 114. P. 29–47.
5. Gutiérrez-Climente R. et al. Sol-gel process: The inorganic approach in protein imprinting // *Journal of Materials Chemistry B*. 2021. Vol. 9, № 9. P. 2155–2178.

6. Appell M., Mueller A. Mycotoxin analysis using imprinted materials technology: Recent developments // Journal of AOAC International. AOAC International, 2016. Vol. 99, № 4. P. 861–864.
7. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // Anal Bioanal Chem. Springer, 2020.
8. Mehdinia A. et al. Selective adsorption of 2,4-dinitrophenol on molecularly imprinted nanocomposites of mesoporous silica SBA-15/polyaniline // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 137, № 18. P. 4368–4374.