

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии
наименование кафедры

Синтез молекулярно импринтированных полимеров
для детектирования оксидоредуктаз

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 — «Химия»
код и наименование направления

Института химии
наименование факультета

Преснякова Кирилла Юрьевича
фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
профессор, д.х.н., доцент
должность, уч. степень, уч. звание

15.06.21 
дата, подпись

Н.А. Бурмистрова
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:
д.х.н., доцент
должность, уч. степень, уч. звание

15.06.21 
дата, подпись

Д.Г. Черкасов
инициалы, фамилия

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы: Молекулярно импринтированные полимеры (МИП) — являются синтетическими аналогами природных биологических систем типа антитело–антиген, и представляют собой полимеры с высокой степенью сшивки, содержащие искусственно созданные полости, являющиеся молекулярными отпечатками молекул-шаблона. Молекулярные отпечатки способны к избирательному связыванию молекул-шаблона, подобно рецепторным системам биологического происхождения, при этом МИП характеризуются стабильностью при хранении, возможностью применения в широком диапазоне температур и кислотностей среды и низкой стоимостью получения [1–4].

Использование подложек с высокоразвитой поверхностью, в частности представителей поликапиллярных систем (ПКС) мультикапилляров (МК) и микроструктурных оптических волноводов с полый сердцевинной (МОВ), в сочетании с МИП позволяет повысить чувствительность, что наиболее актуально при определении макромолекулярных соединений в различных биоаналитических методах. В настоящее время растёт количество публикаций, посвящённых синтезу МИП для определения макромолекулярных соединений и их применению для разработки сенсорных устройств и устройств разделения [5–10].

Целью данной работы является синтез МИП для определения оксидоредуктаз на внутренней поверхности МК и МОВ. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Поиск оптимальных условий синтеза МИП для оксидоредуктаз;
2. Изучение возможности синтеза МИП внутри МК и МОВ;
3. Проверка работоспособности молекулярных отпечатков.

Краткая характеристика материалов исследования. Для решения поставленных в данной работе задач применяли комплекс физических методов исследования: ИК-спектроскопия, спектрофотометрия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Объектами исследования стали МИП, синтезированные на внутренней поверхности МК и МОВ.

Описание структуры работы. Данная работа состоит из введения, двух глав (литературного обзора и экспериментальной части), заключения, списка использованных источников, инструктажа по охране труда и технике безопасности. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 54 страницы, включая 4 таблицы и 14 рисунков. Проанализировано 85 литературных источников.

Научная значимость работы:

- Синтезированы МИП для определения пероксидазы хрена (ПХ), пероксидазы сои (ПС) и глюкооксидазы (ГО) на подложках: МОВ и МК;
- Найдены аналитические характеристики синтезированных МИП;
- Изучена селективность МИП при разделении смеси ПХ и ГО;
- Показана возможность повторного многократного использования синтезированных МИП.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В **первой главе** рассмотрены основные особенности и преимущества МИП, представлена история развития подходов к их получению, рассмотрены основные механизмы действия молекулярных отпечатков. Описаны основные подходы к синтезу МИП, включающие объёмный и поверхностный импринтинг. Объёмный импринтинг позволяет получать молекулярные отпечатки наиболее похожие на молекулу шаблона, но при этом в объёмном импринтинге невозможно использование больших по

размеру структур [11]. Кроме того, в работе описаны основные параметры, влияющие на методику синтеза МИП: молекулы шаблона, полимерные матрицы, подложки.

Наиболее значимым является выбор молекулы шаблона, поскольку в зависимости от соединения выбирают условия синтеза МИП: подбор реактивов, подложек, физические параметры полимеризации и условия применимости получаемых структур. Методика синтеза МИП, с использованием в качестве молекул-шаблона низкомолекулярных веществ ($M < 1500$ Да), например фармацевтических препаратов [12], сахаров [13], аминокислот [14] за последние несколько десятилетий отработана, хорошо изучена и считается почти рутинной. Отмечено, что в последнее время, использование МИП для распознавания малых молекул, отходит на второй план, уступая место биомакромолекулам, с целью дальнейшего их использования в клинической практике и биоанализе.

Использование в качестве подложек ПКС представляет особый интерес с точки зрения практического применения. ПКС — структуры, получаемые при объединении большого количества единичных капилляров, и обладающие различной геометрией. Одними из представителей ПКС являются МОВ и МК. МК представляют собой структуру, образованную из множества одинаковых капилляров, количество которых варьируется от 100 до 100 000 единиц. МОВ состоят из отдельных элементов, дающих уникальные волноводные свойства, например сдвиг спектральных полос в спектрах пропускания при изменении показателя преломления среды, заполняющей МОВ или при изменении толщины слоя модификатора.

Одним из наиболее широко используемых полимеров для синтеза МИП для биомолекул является ПАНИ, поскольку обладает большой удельной площадью поверхности, низкой стоимостью реагентов и простотой проведения процесса синтеза [15,16].

Таким образом, по результатам анализа литературы был выбран и обоснован метод синтеза МИП проведением окислительной реакции полимеризации анилина, проведена адаптация условий реакции под цель и задачи работы.

Во **второй главе** проведена информация об используемых реагентах, материалах, оборудовании и методике синтеза ПАНИ и ПАНИ-МИП и приведены характеристики получаемого продукта.

Для проведения стадии предварительной модификации внутренней поверхности образцов МОВ ($l = 7$ см) и МК ($l = 2$ см) перед синтезом ПАНИ очищали раствором бидистиллированной воды (БД) в ультразвуковой ванне и просушивали под потоком аргона. Образцы МК и МОВ ПС закрепляли в шприце через силиконовый переходник. Синтез ПАНИ осуществляли по методике [17]: для проведения реакции полимеризации анилина свежеприготовленные растворы гидрохлорида анилина (C_6H_8ClN , $C = 10$ мМ, $V = 100$ мкл) и пероксидисульфата аммония ($(NH_4)_2S_2O_8$, $C = 12,5$ мМ, $V = 100$ мкл) предварительно смешивали, соблюдая молярное соотношение C_6H_8ClN и $(NH_4)_2S_2O_8 = 1,25$ и вносили в образцы. Модификацию внутренней поверхности МК проводили при температуре 20 °С, смесь выдерживали внутри ПКС ($t = 1,5$ мин) и удаляли, после этого образцы промывали раствором БД ($V = 6$ мл). Раствор аскорбиновой кислоты ($C_6H_8O_6$, $C = 5,7$ мМ, $V = 6$ мл) использовали для удаления избытка $(NH_4)_2S_2O_8$, раствор прокачивали через МОВ и МК, затем промывали раствором БД до нейтральных значений рН и высушивали потоком атмосферного воздуха.

Предварительные исследования показали, что синтез МИП на поверхности стеклянных подложек без предварительной модификации характеризуется низкой воспроизводимостью и неравномерным расположением структур. Структуры МИП были неоднородными, а при промывании раствором БД происходило их разрушение и удаление с поверхности. Ещё одной причиной возникновения данной проблемы, помимо

низкой сорбционной ёмкости стекла является низкая концентрация реагентов и низкая кислотность раствора. Предварительная модификация ПАНИ позволяет создать плотную однородную плёнку толщиной ≈ 110 нм (Рисунок 1) на любом типе подложек.

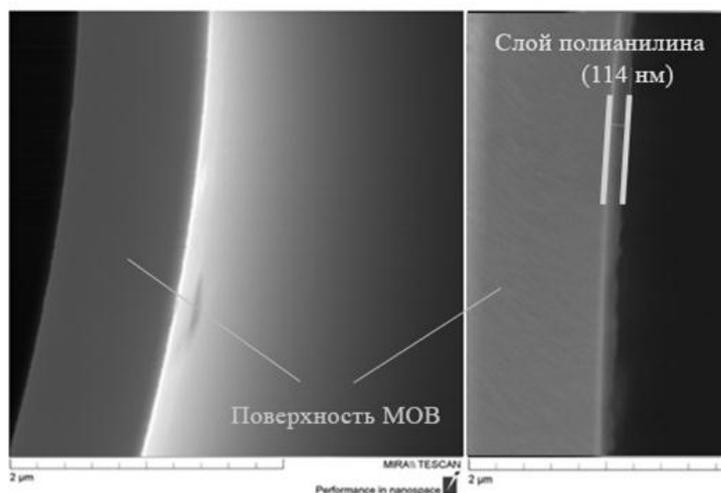


Рисунок 1 — СЭМ-изображение МОВ до (слева) и после (справа) предварительной модификации

Синтез МИП проводили смешиванием растворов C_6H_8ClN ($C = 1,55 \times 10^{-2}$ мМ, $V = 100$ мкл), с внесённым в него раствором молекул ПХ и $(NH_4)_2S_2O_8$ ($C = 1,75 \times 10^{-2}$ мМ, $V = 100$ мкл). Образец ПКС присоединяли к шприцу, заполняли приготовленной смесью, выдерживали внутри образца ($t = 30$ мин) и удаляли. После этого образец промывали раствором БД, раствор $C_6H_8O_6$ (6 мл) прокачивали через образец ПКС для удаления белковых молекул из синтезированных молекулярных отпечатков. Затем образцы промывали раствором БД до нейтральных значений рН и высушивали потоком атмосферного воздуха. Повторяли методику, добавляя вместо раствора ПХ растворы ПС и ГО.

Для изучения морфологии поверхности ПАНИ-МИП и влияния на её структуру концентрации используемых реагентов, проводили синтез при различных концентрациях исходных реагентов. По результатам СЭМ

(Рисунок 2) увеличение концентрации C_6H_8ClN от 155 до 195 мкМ и $(NH_4)_2S_2O_8$ от 175 до 210 мкМ позволило сформировать нанопроволоки ПАНИ-МИП с диаметром до 500 нм, однако увеличение диаметра нанопроволок усложнило извлечение молекул ПХ. Наиболее воспроизводимые структуры со средним размером нанопроволок 100–160 нм получались при синтезе с концентрациями $C_6H_8ClN = 155$ мкМ и $(NH_4)_2S_2O_8 = 175$ мкМ — образец 3.

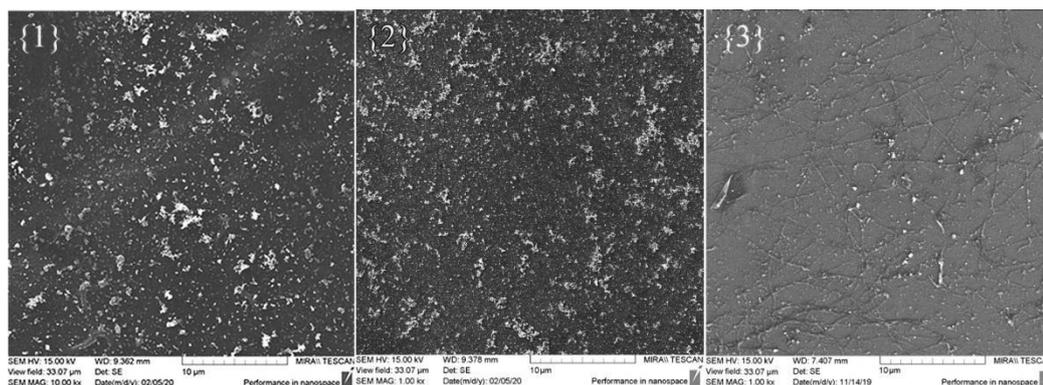


Рисунок 2 — СЭМ изображения поверхности образцов ПАНИ-МИП 1–3 с различной концентрацией реагентов

Важным этапом в синтезе МИП является удаление молекул шаблона из полимерной матрицы, использование в качестве промывочного раствора $C_6H_8O_6$ позволило одновременно удалять избыток окислителя $(NH_4)_2S_2O_8$ и молекулы шаблона. Такой подход позволяет эффективно удалять ПХ, ПС и ГО, отсутствие пероксидаз в молекулярных отпечатках подтверждалось при внесении в образцы раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и последующим изменением его окрашивания.

ИК-Фурье спектроскопией в диапазоне $1800-800$ cm^{-1} проводили контроль качества получаемых плёнок, синтезированных на образцах селенида цинка (Рисунок 3). ИК-спектры плёнок ПАНИ и МИП схожи, основные различия заключались в интенсивности спектральных полос. Полосы при 1590 и 1500 cm^{-1} могут быть отнесены к валентному колебанию

в хиноновом ($\nu_{C=C(Q)}$) и бензольном ($\nu_{C-C(B)}$) кольцах соответственно. Полоса при 1160 см^{-1} может быть описана как объединение $\delta_{N=Q=N}$ колебаний с $\delta_{Q=NHB}$ и $\delta_{B=N^+H-B}$, проявляющихся при протонировании. Полоса при 830 см^{-1} соответствует δ_{C-H} , находящимся как в плоскости, так и не в плоскости ароматических колец, пик на 1300 см^{-1} соответствует делокализованным π -электронам [18].

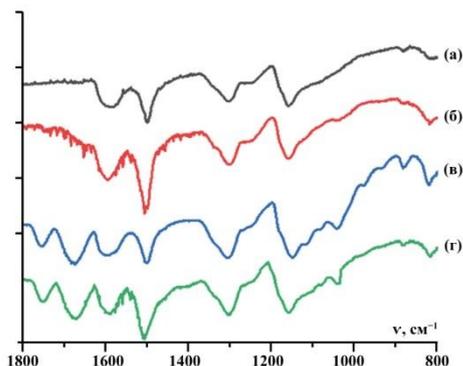


Рисунок 3 — ИК-спектр плёнок ПАНИ (а), МИП после экстракции ПХ (б), МИП после иммобилизации ПХ (в), МИП до экстракции ПХ (г)

Для синтеза неинпринтированных полимеров (НИП) образец ПКС, с предварительно модифицированной поверхностью присоединяли к шприцу и заполняли образец предварительно смешанными растворами C_6H_8ClN ($C = 1,55 \times 10^{-2}\text{ мМ}$, $V = 100\text{ мкл}$) и $(NH_4)_2S_2O_8$ ($C = 1,75 \times 10^{-2}\text{ мМ}$, $V = 100\text{ мкл}$), смесь выдерживали внутри образца ($t = 30\text{ мин}$) и удаляли, после этого промывали раствором БД и раствором $C_6H_8O_6$ и высушивали потоком атмосферного воздуха.

Сравнение аналитических свойств ПАНИ-МИП, синтезированных с применением ПХ и ПС в качестве молекул шаблона проводили их повторной иммобилизацией с различной концентрацией ($C = 0,1\text{--}100\text{ нг/мл}$) на подложках МК. Иммобилизацию проводили в течение $t = 15\text{ мин}$, после чего

удаляли неспецифически связанные молекулы ПХ раствором ФСБТ. Затем образцы подложек просушивали под потоком аргона. Для определения наличия связанных молекул ПХ на поверхности образцов вносили ТМБ-субстрат ($t = 10$ мин), субстрат отбирали в микропланшет, с внесенной заранее 0,5 % H_2SO_4 ($V = 50$ мкл). Калибровочные зависимости окисленной формы ТМБ субстрата построены по значению оптической плотности при $\lambda_{max} = 450$ нм (Рисунок 4). Образцы МИП, селективные к ПХ и ПС показали одинаковую чувствительность с пределом обнаружения 5 нг/мл и 9 нг/мл соответственно.

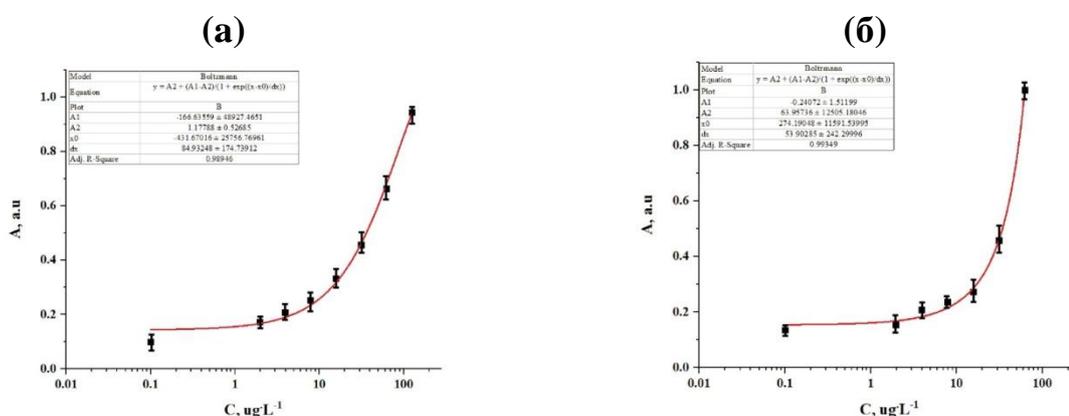


Рисунок 4 — Калибровочные зависимости поглощения ТМБ-субстрата в зависимости от концентрации ПХ (а) и ПС (б)

Изучение аналитических свойств образцов, синтезированных с использованием ГО в качестве молекулы шаблона, проводили повторной иммобилизацией ГО с различной концентрацией ($C = 0,1-100$ нг/мл) на поверхности МИП внутри МК. Для удаления неспецифически связанных молекул ГО образцы МК промывали ФСБТ ($V = 5$ мл). Определение наличия ГО в молекулярных отпечатках проводили внесением в образцы ($t = 10$ мин) коллоидного раствора гидрофилизированных КТ ($\lambda_{em} = 600$ нм, $C = 10^{-8}$ М), синтезированных по технологии «ядро–оболочка» и стабилизированных дигидролипоевой кислотой. В качестве жидкой среды в коллоидном растворе КТ использовалась глюкоза ($C = 1000$ мкг/мл). После выдержки растворы КТ

отбирали в микропланшет и регистрировали интенсивность флуоресценции раствора. Калибровочные кривые (Рисунок 5) построены при $\lambda_{em} = 600$ нм.

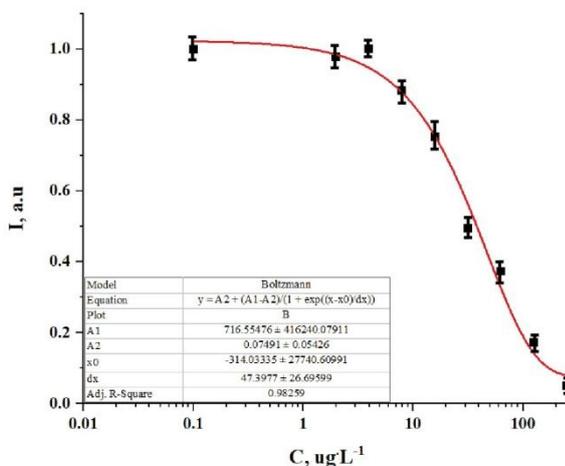


Рисунок 5 — Калибровочная кривая флуоресценции раствора КТ в зависимости от концентрации ГО

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выбраны оптимальные условия синтеза ПАНИ-МИП для ПХ, ПС и ГО на различных подложках (планарное стекло, МОВ и МК), изучена морфология поверхности синтезированных структур ПАНИ и ПАНИ-МИП.

2. Найдены аналитические характеристики ПАНИ-МИП, для определения пероксидаз использована хромогенная реакция с ТМБ (Предел обнаружения (ПрО) ПХ — 5 нг/мл, ПС — 9 нг/мл), для определения ГО — реакция тушения флуоресценции раствора КТ (ПрО ГО — 8 нг/мл).

3. Изучена селективность ПАНИ-МИП, на примере молекулярных отпечатков, селективных к ПХ доказано отсутствие связывания с молекулами ГО и одновременно происходящее связывание молекул ПХ (10 мкг/мл).

4. Показана возможность многократного использования ($n = 10$) синтезированных МИП без ухудшения аналитических характеристик.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Belbruno J.J. Molecularly Imprinted Polymers: review-article // Chem. Rev. American Chemical Society, 2019. Vol. 119, № 1. P. 94–119.
2. Włoch M., Datta J. Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers // Compr. Anal. Chem. 2019. Vol. 86. P. 17–40.
3. Ahmad O.S. et al. Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors // Trends Biotechnol. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 37, № 3. P. 294–309.
4. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020.
5. Ertürk G., Mattiasson B. Molecular imprinting techniques used for the preparation of biosensors // Sensors (Switzerland). 2017. Vol. 17, № 2. P. 1–17.
6. Saylan Y. et al. Molecular imprinting of macromolecules for sensor applications // Sensors (Switzerland). 2017. Vol. 17, № 4.
7. Crapnell R.D. et al. Recent advances in electrosynthesized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection // Sensors (Switzerland). 2019. Vol. 19, № 5.
8. Stevenson D., El-Sharif H.F., Reddy S.M. Selective extraction of proteins and other macromolecules from biological samples using molecular imprinted polymers // Bioanalysis. 2016. Vol. 8, № 21. P. 2255–2263.
9. Jahanban-Esfahlan A. et al. Latest developments in the detection and separation of bovine serum albumin using molecularly imprinted polymers // Talanta. Elsevier B.V., 2020. Vol. 207, № September 2019. P. 120317.
10. Lv Y., Tan T., Svec F. Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules // Biotechnol. Adv. Elsevier Inc., 2013. Vol. 31, № 8. P. 1172–1186.

11. Whitcombe M.J. et al. The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection // Chem. Soc. Rev. 2011. Vol. 40, № 3. P. 1547–1571.

12. Gutierrez-Climente R. et al. Molecularly imprinted nanoparticles grafted to porous silica as chiral selectors in liquid chromatography // J. Chromatogr. A. Elsevier B.V., 2017. Vol. 1508. P. 53–64.

13. Barbani N. et al. Molecularly imprinted polymers by phase inversion technique for the selective recognition of saccharides of biomedical interest in aqueous solutions // Polym. Int. 2017. Vol. 66, № 6. P. 900–907.

14. Chen S. et al. Highly selective recognition of L- phenylalanine with molecularly imprinted polymers based on imidazolyl amino acid chiral ionic liquid // Chirality. 2019. Vol. 31, № 10. P. 824–834.

15. Huang W.S., MacDiarmid A.G. Optical properties of polyaniline // Polymer (Guildf). 1993. Vol. 34, № 9. P. 1833–1845.

16. Chinn D. et al. Comparison of Chemically and Electrochemically Prepared Polyaniline Films. 2. Optical Properties // Chem. Mater. 1995. Vol. 7, № 8. P. 1510–1518.

17. Trchová M., Stejskal J. Polyaniline: The infrared spectroscopy of conducting polymer nanotubes (IUPAC Technical report) // Pure Appl. Chem. 2011. Vol. 83, № 10. P. 1803–1817.

18. Trchová M., Šeděnková I., Stejskal J. In-situ polymerized polyaniline films 6. FTIR spectroscopic study of aniline polymerisation // Synth. Met. 2005. Vol. 154, № 1–3. P. 1–4.

15.06.2021 