

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

**Влияние сульфаниловой кислоты на синтез молекулярно  
импринтированных полимеров на основе полианилина**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студента 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 — «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Бирюкова Ильнура Рушановича

фамилия, имя, отчество

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

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Н.А. Бурмистрова

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Саратов 2022

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы:** Молекулярно импринтированные полимеры (МИП) — являются синтетическими аналогами природных биологических систем типа антитело–антиген, и представляют собой искусственные элементы распознавания, синтезированные для соответствия молекуле шаблону. МИП обладают значительными преимуществами, заключающимися в простоте их приготовления, возможности повторного использования, низкой стоимости, устойчивости к нагреву, а также применимости в агрессивных химических средах. [1,2].

Применение стандартных 96-луночных МТП в качестве подложки для молекулярного импринтинга представляет определённый интерес ввиду возможности применения стандартных аналитических методик, широко распространённого в том числе и в медицинских организациях, аналитического оборудования. В настоящее время растёт количество публикаций, посвящённых синтезу МИП для определения макромолекулярных соединений и их применению для разработки сенсорных устройств и устройств разделения [3–5].

**Целью данной работы** является синтез МИП, легированных сульфосодержащими соединениями, для определения белков на поверхности лунок микротитровального планшета (МТП). Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Поиск оптимальных условий синтеза МИП на поверхности МТП;
2. Изучение влияния легирующей добавки при синтезе МИП на их аналитические свойства.

**Краткая характеристика материалов исследования.** Для решения поставленных в данной работе задач применяли комплекс физических методов исследования: ИК-спектроскопия, спектрофотометрия. Объектами исследования стали МИП, синтезированные на поверхности МТП.

**Описание структуры работы.** Данная работа состоит из введения, двух частей (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 49 страниц, включая 2 таблицы и 8 рисунков. Проанализировано 102 литературных источников.

**Научная значимость работы:**

- Синтезированы МИП на основе ПАНИ, модифицированного сульфаниловой кислотой для определения пероксидазы хрена (ПХ);
- Найдены аналитические характеристики синтезированных МИП;
- 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.

Наиболее значимым этапом 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 подложек проводящих полимеров выбрана из-за совместимости структур с биомолекулами. 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.

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 [7,8]. Варьирование условий полимеризации при синтезе ПАНИ, позволяет не только получать формы с различной формой окисления, но также влиять на физическую наноструктуру ПАНИ [9–13].

Самолегирование полимеров – процесс, при котором легирующую добавку не нужно удалять непосредственной после синтеза полимера. Такая добавка встраивается в структуру полимерных цепей и выполняет функции, как добавки, так и поверхностно-активного вещества [14]. В сравнении с обычным ПАНИ, самолегируемый ПАНИ обладает рядом отличительных свойств, что расширяет диапазон областей, в которых возможно его применение. Особый интерес вызывает ПАНИ с замещенным циклом сульфоновой кислоты (сПАНИ), который содержит сульфо-группу, присоединенную непосредственно к ароматическим кольцам основной цепи полимера [15].

Таким образом, по результатам анализа литературы был выбран и обоснован метод синтеза МИП проведением окислительной реакции полимеризации анилина, легируемого сульфокислотой, 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 модификации поверхности полистирольного 96-луночного МТП использовали стандартную методику синтеза ПАНИ методом химической окислительной полимеризации. Для проведения реакции полимеризации анилина свежеприготовленный раствор  $C_6H_8ClN$  ( $V = 100$  мкл,  $C = 10$  М) вносили в лунки микроплашета, затем свежеприготовленный раствор  $(NH_4)_2S_2O_8$  ( $V = 100$  мкл,  $C = 12,5$  М), соблюдая молярное соотношение  $C_6H_8ClN$  и  $(NH_4)_2S_2O_8 = 1,25$  приливали к раствору анилина в микропланшет. Модификацию проводили при температуре  $25$  °С, смесь выдерживали в лунках ( $t = 1,5$  мин) и удаляли, после этого образец промывали раствором БД ( $V = 200$  мкл). Для удаления непрореагировавшего  $(NH_4)_2S_2O_8$ , лунки промывали раствором аскорбиновой кислоты ( $C_6H_8O_6$ ), затем раствором БД до нейтральных значений рН и высушивали на атмосферном воздухе.

На образце покровного стекла проводили реакцию полимеризации анилина по методике аналогичной модификации поверхности лунок МТП. Свежеприготовленные растворы  $C_6H_8ClN$  ( $V = 200$  мкл,  $C = 10$  М) и  $(NH_4)_2S_2O_8$  ( $V = 200$  мкл,  $C = 12,5$  М), пипеткой-дозатором наносили на поверхность покровного стекла, до формирования капли. Модификацию проводили при н.у., смесь выдерживали на поверхности покровного стекла ( $t = 1,5$  мин) и удаляли, после этого образец промывали раствором БД ( $V = 2$  мл). Для удаления непрореагировавшего  $(NH_4)_2S_2O_8$  покровное стекло погружали в раствор  $C_6H_8O_6$ , затем промывали раствором БД до нейтральных значений рН и высушивали на атмосферном воздухе.

Синтез МИП и неипринтированных полимеров (НИП) проводили на поверхности лунок полистирольного 96-луночного МТП без предварительной модификации (МИП и НИП) и с предварительной модификацией слоем ПАНИ (ПАНИ@МИП и ПАНИ@НИП). Для формирования сшитой полимерной структуры проводили химическую окислительную сополимеризацию  $C_6H_8ClN$  и 4-аминобензолсульфоновой

кислоты ( $C_6H_7NO_3S$ ), варьируя молярное соотношение  $C_6H_7NO_3S$  и  $C_6H_8ClN$  при постоянной сумме молярных концентраций  $C = 1.55 \times 10^{-5}$  М.

Для синтеза МИП в раствор  $C_6H_8ClN$  вносили молекулы пероксидазы хрена (ПХ) ( $C = 0,675 ; 0,125 ; 1,25 ; \mu\text{г/мл}$ ) и смешивали с растворами  $C_6H_7NO_3S$  и  $(NH_4)_2S_2O_8$ , после чего приготовленные смеси вносили в лунки микропланшета. Молярное отношение  $C_6H_8ClN$  и  $C_6H_7NO_3S$  представлено в таблице 2. В случае НИП синтез проводили аналогично, но без добавления молекул ПХ. Реакцию полимеризации для МИП и НИП проводили в слабокислой среде ( $\text{pH } 4.5\text{--}5.0$ ) в течение 90 мин ( $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) с использованием в качестве окислителя  $(NH_4)_2S_2O_8$ . Удаление молекул-шаблонов из МИП осуществляли промывкой раствором  $C_6H_8O_6$  ( $1.8 \times 10^{-4}$  М,  $\text{pH } 2.5$ ). Процесс вымывания ПХ из МИП контролировали реакцией окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ).

Аналогичным образом проведен синтез МИП и НИП на поверхности покровного стекла, модифицированного первым слоем ПАНИ проводили синтез второго слоя с легирующей добавкой в виде сульфаниловой кислоты. Для в растворы  $C_6H_8ClN$  ( $V = 1$  мл,  $C = 1,55 \cdot 10^{-5}; 1,43 \cdot 10^{-5}; 1,32 \cdot 10^{-5}; 1,20 \cdot 10^{-5}; 1,09 \cdot 10^{-5}; 9,72 \cdot 10^{-6}; 7,41 \cdot 10^{-6}$  М) вносили растворы ПХ ( $V = 20$  мкл,  $C = 5 \mu\text{г/мл}$ ), после чего смешивали с раствором  $(NH_4)_2S_2O_8$  ( $V = 2$  мл,  $C = 1,75 \cdot 10^{-5}$  М). Реакцию полимеризации для МИП проводили в слабокислом растворе  $HCl$  ( $C = 0.6 \times 10^{-3}$  М) в течение 90 мин ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) варьируя молярное соотношение  $C_6H_7NO_3S$  и  $C_6H_8ClN$ .

В ходе выполнения исследования проведен успешный синтез МИП на поверхности двух подложек (покровного стекла, лунки МТП). При этом использование МТП позволило, провести синтез МИП без предварительной модификации поверхности слоем ПАНИ. Для покровного стекла проведен синтез в целом аналогичный [16]. Синтез МИП на поверхности МТП проведен по двум методикам. В первом случае проводилась предварительная модификация поверхности лунок МТП с использованием удерживающего

слоя ПАНИ (ПАНИ@МИП), во втором синтез проведен непосредственно на поверхность лунок МТП без предварительной модификации (МИП). Эффективность модификации поверхности МТП оценивали по изменению ИФ МИП, зависимость ИФ МИП от типа модификации представлена на рисунке 1.

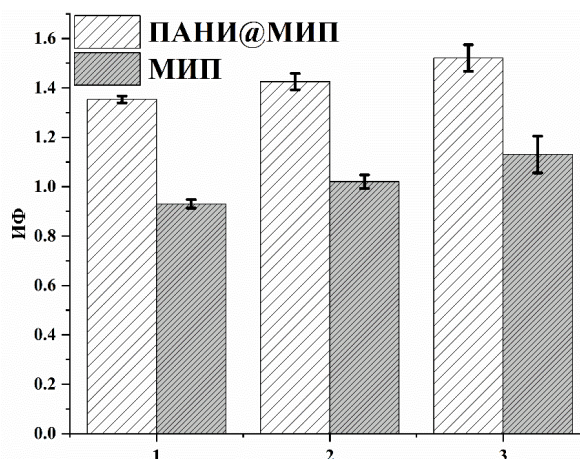


Рисунок 1 — Зависимость ИФ МИП, синтезированных на чистой (МИП) и предварительно модифицированной ПАНИ (ПАНИ@МИП) поверхности лунок МТП (n=3)

Результаты показывают, что для образцов молекулярно импринтированных полимеров, синтезированных без удерживающего слоя ПАНИ, значения ИФ  $\leq 1$ . Это свидетельствует об отсутствии селективной сорбции молекул шаблонов, получение молекулярно импринтированных полимеров таким путем оказалось невозможным. При проведении синтеза на слое ПАНИ, ИФ для всех образцов находится в диапазоне от 1.3 до 1.5, что свидетельствует о наличии специфической сорбции молекул ПХ и как следствие успешного синтеза МИП. Во всех дальнейших экспериментах использовали структуру ПАНИ@МИП.

Модификацию МИП, проводили с использованием  $C_6H_7NO_3S$ . Стоит обратить внимание что окислитель  $(NH_4)_2S_2O_8$ , всегда находился в избытке относительно мономера. Проведено варьирование количества добавки в широком диапазоне молярных отношений  $C_6H_8ClN / C_6H_7NO_3S$  от 12.4 до 0.9.

Такой диапазон позволил получить данные для расчета ИФ, как при значительном избытке  $C_6H_8ClN$  реакционной смеси, так и при сопоставимом количестве молекул  $C_6H_8ClN$  и  $C_6H_7NO_3S$  в растворе. Оптическая плотность ( $\lambda = 450$  нм) и значения ИФ для ПАНИ@МИП синтезированных при использовании рабочих растворов с различными молярными отношений  $C_6H_8ClN / C_6H_7NO_3S$  представлены на рисунке 4 (а) и (б), соответственно.

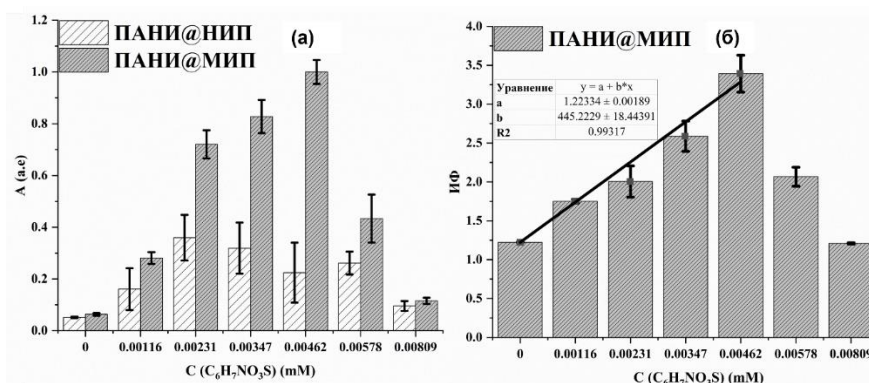


Рисунок 4 — Зависимость оптической плотности ТМБ субстрата после добавления в модифицированные ПАНИ@МИП лунки МТП (а) и ИФ синтезированных ПАНИ@МИП (б) ( $n=3$ )

Рассчитанные значения ИФ, демонстрируют эффективность предложенного метода модификации матричной структуры МИП с использованием сульфаниловой кислоты. Максимальные значения ИФ, получены при добавлении в смесь добавки в концентрации 4,6 мкмоль/л .

При этом изменение ИФ в зависимости от количества введённого модификатора описывается линейной зависимостью до достижения максимального ИФ = 3,4. Благодаря введению модификатору ИФ увеличился в более чем 2 раза. В дальнейшем все результаты были получены на ПАНИ@МИП с добавлением данной концентрации.

Для изучения влияния концентрации молекулы шаблона на значения ИФ и сорбционные характеристики синтезированных структур нами проведено варьирование концентрации иммобилизируемой ПХ ( $C = 0-2,5$   $\mu\text{г/мл}$ ) на поверхности ПАНИ@МИП и поверхности ПАНИ@НИП.



Иммобилизация раствора, не содержащего ПХ ( $C = 0 \text{ }\mu\text{г/мл}$ ) позволяет проверить наличие оставшихся молекул шаблона в полимерной матрице. После проведения иммобилизации в растворы ПХ ( $V = 150 \text{ мкл}$ ) вносили раствор ТМБ ( $V = 50 \text{ мкл}$ ), фиксирование окрашивания осуществляли добавлением 2-% раствора серной кислоты ( $V = 100 \text{ мкл}$ ). Значения оптической плотности и ИФ представлены на рисунке 5 (а) и (б), соответственно.

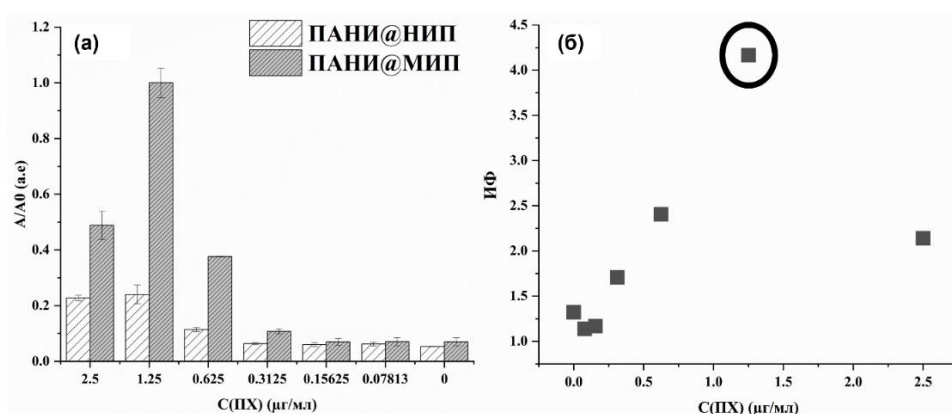


Рисунок 5 — Зависимость оптической плотности ТМБ-субстрата после добавления в модифицированные ПАНИ@МИП лунки МТП (а) и ИФ синтезированных ПАНИ@МИП (б) ( $n=3$ ) ИФ от концентрации ПХ

Установлено, что при концентрации  $1.25 \text{ }\mu\text{г/мл}$  достигается максимум оптической плотности и максимальные значения ИФ. Появление окрашивания растворов без молекул ПХ может свидетельствовать о незначительном вымывании молекул шаблона из полимерной матрицы в процессе иммобилизации.

Для изучения аналитических свойств образцов ПАНИ@МИП, проводилась повторная иммобилизация. В лунки МТП вносили растворы ПХ различной концентрации из предыдущей методики ( $V = 200 \text{ мкл}$ ). Калибровочные зависимости построены при длине волны  $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ нм}$  и показаны на рисунке 6.

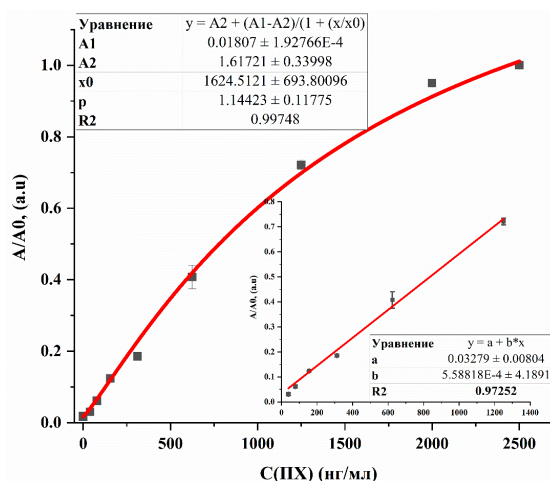


Рисунок 6 — Градуировочная зависимость поглощения ТМБ субстрата в зависимости от концентрации ПХ и линейный определяемый диапазон

Для определения молекулы-шаблона ПХ образцов ПАНИ@МИП показан предел обнаружения в 4,6 нг/мл и линейный определяемый диапазон равный 30-1200 нг/мл.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено влияние условий синтеза молекулярно-импринтированных полимеров на основе полианилина, модифицированного сульфаниловой кислотой, для определения пероксидазы хрена на поверхности микротитровальных планшетов, выбраны оптимальные условия синтеза ПАНИ@МИП.

2. Показана необходимость предварительной модификации поверхности МПТ слоем ПАНИ, синтезированной методом окислительной химической полимеризации в кислой среде.

3. Изучено влияние концентрация молекул-шаблонов ПХ на значение импринтинг-фактора ПАНИ@МИП и выбрана их оптимальная концентрация для синтеза МИП.

4. Определены аналитические характеристики синтезированных ПАНИ@МИП для определения ПХ ( $PrO_{ПХ} = 4,6$  нг/мл, линейный определяемый диапазон = 30-1200 нг/мл)

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Belbruno J.J. Molecularly Imprinted Polymers: review-article // *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 2019. Vol. 119, № 1. P. 94–119.
2. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020.
3. Ertürk G., Mattiasson B. Molecular imprinting techniques used for the preparation of biosensors // *Sensors (Switzerland)*. 2017. Vol. 17, № 2. P. 1–17.
4. Saylan Y. et al. Molecular imprinting of macromolecules for sensor applications // *Sensors (Switzerland)*. 2017. Vol. 17, № 4.
5. 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.
6. Silvestri D. et al. Polymeric devices containing imprinted nanospheres: A novel approach to improve recognition in water for clinical uses // *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 2005. Vol. 542, № 1 SPEC. ISS. P. 3–13.
7. Huang W.S., MacDiarmid A.G. Optical properties of polyaniline // *Polymer (Guildf)*. 1993. Vol. 34, № 9. P. 1833–1845.
8. Chinn D. et al. Comparison of Chemically and Electrochemically Prepared Polyaniline Films. 2. Optical Properties // *Chemistry of Materials*. 1995. Vol. 7, № 8. P. 1510–1518.
9. Sapurina I., Stejskal J. Ternary composites of multi-wall carbon nanotubes, polyaniline, and noble-metal nanoparticles for potential applications in electrocatalysis // *Chemical Papers*. 2009. Vol. 63, № 5. P. 579–585.
10. Wang Y., Tran H.D., Kaner R.B. Template-free growth of aligned bundles of conducting polymer nanowires // *Journal of Physical Chemistry C*. 2009. Vol. 113, № 24. P. 10346–10349.

11. Pan L. et al. Synthesis of polyaniline nanotubes with a reactive template of manganese oxide // *Advanced Materials*. 2007. Vol. 19, № 3. P. 461–464.
12. Dallas P. et al. Characterization, magnetic and transport properties of polyaniline synthesized through interfacial polymerization // *Polymer (Guildf)*. Elsevier BV, 2007. Vol. 48, № 11. P. 3162–3169.
13. Chen J. et al. An overview of stretchable strain sensors from conductive polymer nanocomposites // *Journal of Materials Chemistry C*. Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 7, № 38. P. 11710–11730.
14. Yang C.H. et al. Nanofibers of self-doped polyaniline // *Polymer (Guildf)*. Elsevier BV, 2005. Vol. 46, № 24. P. 10688–10698.
15. Liao Y. et al. Sulfonated polyaniline nanostructures synthesized via rapid initiated copolymerization with controllable morphology, size, and electrical properties // *Macromolecules*. 2012. Vol. 45, № 3. P. 1570–1579.
16. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer, 2020.