

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

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

Кафедра общей и неорганической химии

**Оптимизация синтеза молекулярно импринтированного полианилина  
методами планирования эксперимента**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студента 4 курса 411 группы  
направления 04.03.01 «Химия»  
Института химии  
Горло Викторией Дмитриевны

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

\_\_\_\_\_

дата, подпись

С.П. Курчаткин

Заведующий кафедрой  
д.х.н., профессор

\_\_\_\_\_

дата, подпись

И. Ю. Горячева

Саратов 2024



## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Негативное влияние на здоровье сельскохозяйственных животных и человека микотоксинов, содержащихся в зерновых культурах и продуктах на их основе, обуславливает интерес к разработке и совершенствованию методов их определения. Среди известных представителей микотоксинов, афлатоксин В1 (**АФВ<sub>1</sub>**), продуцируемый некоторыми видами *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*.), обладает наиболее сильным канцерогенным эффектом [1]. Большой интерес представляет разработка сенсорных систем определения АФВ1 с использованием искусственных рецепторов, в частности молекулярно импринтированных полимеров (**МИП**), для извлечения и концентрирования целевых молекул из экстрактов зерновых культур. Несмотря на то, что МИП могут характеризоваться сорбционными характеристиками сопоставимыми с природными рецепторами их получение достаточно времязатратно и не всегда экономически целесообразно. В большинстве случаев это обусловлено необходимостью длительной процедурой подбора оптимальных параметров получения и очистки МИП. Перспективным представляется внедрение метода планирования эксперимента в процесс получения МИП. Метод позволяет определить параметры, оказывающие наибольшее влияние на свойства конечного продукта и значительно ускорить поиск оптимальных параметров.

**Целью данной работы является** применение методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий получения импринтированного полианилина (ПАНИ МИП), селективного к кверцетину - структурному аналогу АФВ1. Для достижения данной цели решены следующие **задачи**: 1. разработана схема синтеза МИП, характеризующегося наилучшими сорбционными свойствами; 2. выбраны параметры, оказывающие наибольшее влияние на импринтинг фактор (**ИФ**); 3. построен центральный композиционный план для определения оптимальных условий синтеза ПАНИ МИП; 4. изучены сорбционные свойства ПАНИ МИП, синтезированного с учетом результатов моделирования.

**Краткая характеристика методов исследования.** Спектрофотометрию использовали как основной метод исследования в данной работе. Математическую обработку данных и построение графиков поверхностей отклика проводили с помощью языка программирования Python. Объектом исследования стал ПАНИ МИП, синтезированный на поверхности полистирольного 96-лучночного микротитровального планшета (МТП) в присутствии низкомолекулярного шаблона — кверцетина.

**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 45 страниц, включающих 8 таблиц и 6 рисунков. Проанализирован 71 литературный источник.

**Научная значимость работы:**

- Проведён синтез ПАНИ МИП, специфичного к низкомолекулярному соединению — кверцетину;
- Показана возможность применения методов планирования эксперимента для оптимизации условий синтеза ПАНИ МИП;
- Выбраны параметры, оказывающее наибольшее влияние на ИФ;
- Изучены сорбционные характеристики ПАНИ 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 методы определения АФВ<sub>1</sub>, включая биосенсорные устройства, выделены их достоинства и недостатки. Показаны перспективы замены биологических рецепторов на искусственные, в том числе и молекулярные импринтированные полимеры (МИП), описаны существующие методики получения ПАНИ и влияние условий синтеза на морфологию; обоснован выбор ПАНИ в качестве матрицы МИП. Отдельное внимание

уделено статистическим методам планирования эксперимента, позволяющим ускорить поиск оптимальных параметров синтеза МИП.

Технология получения МИП основана на формировании специфических сайтов связывания с сильно сшитой полимерной сеткой, выращенной в присутствии молекул шаблонов, которые впоследствии удаляются, оставляя после себя комплементарные полости, которые можно использовать для селективного связывания аналитов [2]. За последние десятилетия разработаны и описаны МИП, способные селективно распознавать АФВ<sub>1</sub>. Однако при их синтезе молекулой шаблоном выступает сам микотоксин, что является нежелательным из-за его высокой токсичности и стоимости [3]. Целесообразным является использование структурных аналогов АФВ<sub>1</sub>, которые являются более дешевыми, менее токсичными и безопасными для окружающей среды [4]. Для практических целей процедуры импринтинга не ограничиваются одним шаблоном. Для синтеза МИП с несколькими типами сайтов связывания в одном формате предложен мультишаблонный импринтинг [5]. Мультишаблонные МИП имеют ряд преимуществ, включая одновременную экстракцию аналита в одном процессе, более низкий расход растворителя, экономическую эффективность и короткое время анализа. Использование нескольких шаблонов снижает трудозатраты, необходимые для подготовки различных МИП для разных аналитов по отдельности

Преимущественно, для оптимизации синтеза МИП используется однофакторный подход, при котором изменяют только один из параметров, а остальные остаются неизменными. Такой подход оправдан, когда экспериментатор заведомо знает, что факторы не зависят друг от друга, что на практике происходит редко. Кроме этого, одномерная оптимизация требует больших затрат времени и реагентов. Более эффективным является применение методов планирования эксперимента, а в частности, моделирование поверхности отклика, поскольку в таком случае учитываются эффекты взаимодействия между исследуемыми параметрами и возможно более точное определение комбинации их значений, при которых наблюдается наилучший результат [6,7].

По результатам анализа литературы показана и обоснована необходимость применения методов планирования эксперимента для синтеза синтетического элемента распознавания с использованием техники молекулярного импринтинга.

Во **второй главе** проведена информация об используемых реагентах, материалах, оборудовании, методике синтеза ПАНИ МИП и установления сорбционных характеристик полученного полимерного материала элемента.

Для модификации поверхности полистирольного 96-луночного МТП использовали стандартную методику синтеза ПАНИ методом химической окислительной полимеризации [8]. Модификацию МТП слоем ПАНИ проводили смешиванием свежеприготовленных растворов  $C_6H_8ClN$  (1 М, 100 мкл) и  $(NH_4)_2S_2O_8$  (1.25 М, 100 мкл), которые переносили в лунки МТП и выдерживали 1,5 мин при  $25^\circ C$ . После этого МТП промывали раствором БД для остановки полимеризации. Для удаления непрореагировавшего  $(NH_4)_2S_2O_8$  лунки промывали раствором аскорбиновой кислоты, затем раствором БД до нейтральных значений рН и высушивали на атмосферном воздухе.

Для оптимизации экспериментальных параметров синтеза МИП изучено влияние следующих параметров синтеза МИП: концентрация кверцетина ( $3 \times 10^{-5}$  -  $3,3 \times 10^{-4}$  М), концентрации пероксидазы хрена (**ПХ**) ( $0-2 \times 10^{-7}$  М), время синтеза (60-120 мин). Оптимальные параметры оценивали с помощью моделирования поверхностей отклика, для которого получили полиномиальное уравнение второго порядка, описывающее процесс синтеза МИП. Синтез МИП в оптимальных условиях проводили на поверхности лунок полистирольного 96-луночного МТП с предварительной модификацией слоем ПАНИ. Для синтеза МИП раствор  $C_6H_8ClN$  ( $1.55 \times 10^{-2}$  М, 75 мкл) вносили в лунки МТП, затем приливали по 25 микролитров растворов кверцетина ( $3,3 \times 10^{-4}$  М) и ПХ ( $2 \times 10^{-7}$  М), после чего приливали в лунки МТП свежеприготовленный раствор  $(NH_4)_2S_2O_8$  ( $1.75 \times 10^{-2}$  М, 75 мкл). Реакцию полимеризации для МИП проводили в слабокислой среде (рН  $4.5 \pm 0.5$ ) в течение 120 минут при температуре  $25^\circ C$ . Для удаления непрореагировавшего  $(NH_4)_2S_2O_8$  лунки промывали раствором аскорбино-

вой кислоты, затем БД, для удаления молекулы-шаблона лунки промывали раствором этанола (70%). Синтез неимпринтированного полимера (**НИП**) проводили на поверхности лунок полистирольного 96-луночного МТП с предварительной модификацией слоем ПАНИ без добавления молекулы кверцетина и ПХ.

В **третьей главе** обсуждаются полученные результаты и приводятся сорбционные характеристики синтезированных ПАНИ МИП. Применение статистических методов планирования эксперимента значительно сократило число экспериментов, необходимых для оптимизации условий синтеза ПАНИ МИП, характеризующегося наибольшим значением ИФ.

На предварительной стадии эксперимента на основании априорных знаний о процессе синтеза МИП выбрали семь факторов для дальнейшего изучения (Таблица 1).

Таблица 1 — Кодированные значения и соответствующие физические величины для построения экспериментального плана

Кодированные значения	Параметр	-1	1
$C_6H_8ClN$ , М	X1	$1,6 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-2}$
$C_6H_8ClN:(NH_4)_2S_2O_8$	X2	1:1,25	4:1
Время синтеза, мин	X3	60	120
Кверцетин, М	X4	$3,0 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-4}$
Температура, °С	X5	4	25
HCl, М	X6	$0,6 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-2}$
ПХ, М	X7	0	$2,0 \times 10^{-7}$

Отсеивающий эксперимент является первым шагом для эффективной оценки выбранных параметров – на его основе делается вывод о наиболее значимых для синтеза факторах [9,10]. В связи с большим количеством параметров на первом этапе использовали метод Плакетта-Бермана. При наличии нескольких факторов этот метод является более эффективным, чем метод полного или дробного факторного эксперимента, благодаря своим возможностям выбора нужного количества экспериментов.

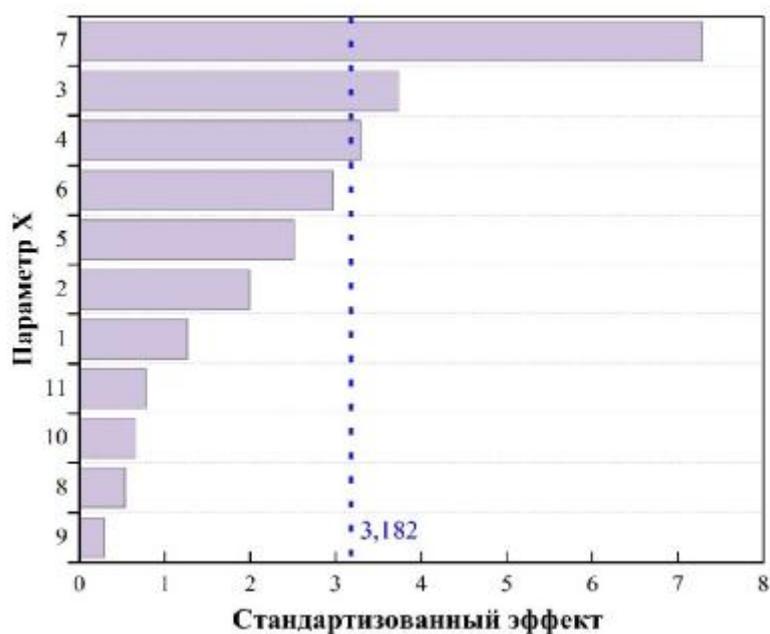


Рисунок 1 — Диаграмма Парето для определения значимости параметров

Результаты отсеивающего эксперимента показали, что наиболее значимыми параметрами синтеза ПАНИ МИП является концентрация ПХ, время синтеза и концентрация кварцетина (Рисунок 1). Наибольшее влияние на синтез МИП оказывает концентрация ПХ. Наличие высокомолекулярного соединения в системе может поддерживать постоянство рН в процессе синтеза, что положительно сказывается на ПАНИ МИП, способствуя формированию структур типа нанопроволок.

Для исследования влияния концентрации молекулы шаблона, времени синтеза и концентрации ПХ на синтез МИП использовали моделирование поверхностей отклика, в основу которого лежал центральный композиционный план. Проведенный эксперимент позволил описать изучаемый процесс с помощью полиномиального уравнения второй степени, которое учитывает влияние на систему параметров и их взаимодействий друг с другом:

,

где  $x$  – концентрация кварцетина,  $y$  – время синтеза,  $z$  – концентрация ПХ.

Полученное регрессионное уравнение позволило построить трехмерные графики поверхностей отклика (Рисунок 2), представляющих собой математи-

ческое описание системы, которое отражает взаимосвязь между переменными и откликом и обеспечивает прогнозирование поведения системы при изменении параметров.

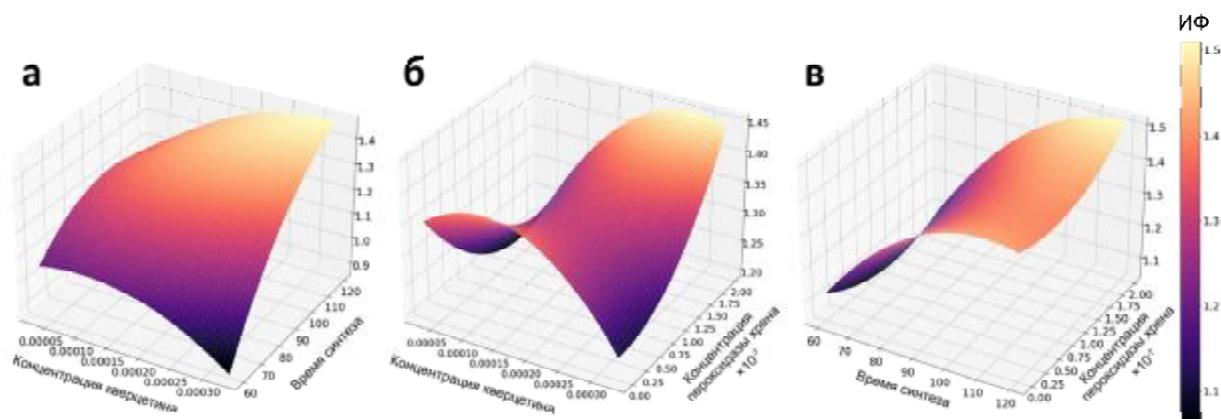


Рисунок 2 - Поверхность отклика для рассчитанного значения ИФ как функции:

- (а) концентрации кверцетина и времени синтеза, (б) концентрации кверцетина и концентрации ПХ, (в) времени синтеза и концентрации ПХ

Результаты моделирования показали, что ни на одном графике не наблюдается явного максимума функции, что говорит о неверно выбранной экспериментальной области и необходимости проведения эксперимента при увеличенных значениях параметров.

Для подтверждения результатов моделирования синтез ПАНИ МИП был проведен при максимальных значениях параметров изучаемого диапазона и проведена оценка сорбционных свойств полученного материала. Сорбцию кверцетина из водных модельных растворов ( $2,0 \times 10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-5}$ ,  $5,0 \times 10^{-5}$  М) проводили, в течение 30 мин, после чего рассчитывали степень извлечения и ИФ. Также дополнительно синтезировали образец МИП ПХ, при синтезе которого в полимеризационный раствор добавляли только ПХ ( $2,0 \times 10^{-7}$  М).

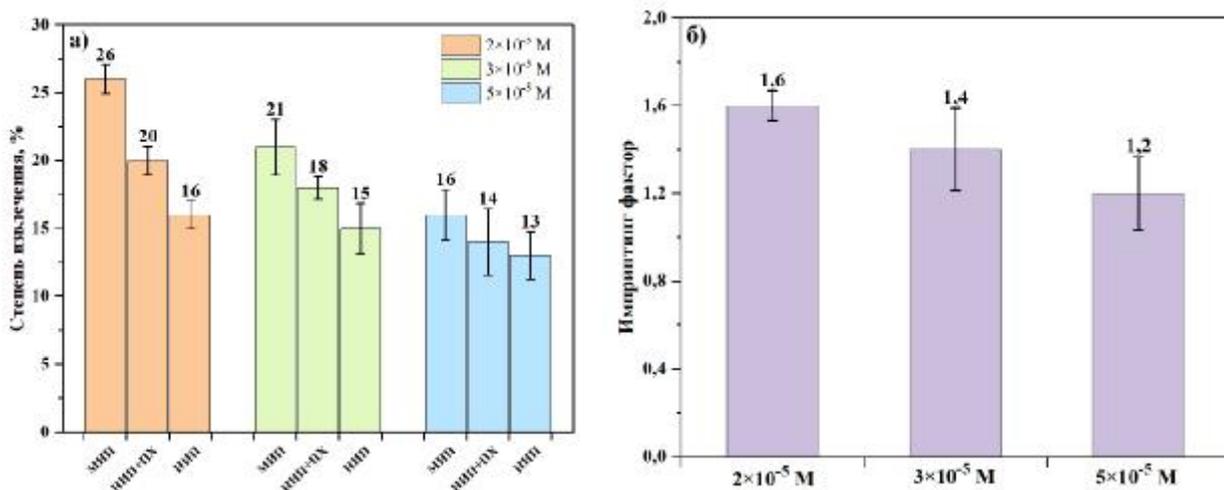


Рисунок 3 – Степень извлечения кверцетина из модельных растворов для ПАНИ МИП, МИП ПХ, НИП (а) и ИФ ПАНИ МИП (б)

Установлено, что ИФ при сорбции кверцетина из водного модельного раствора ( $2,0 \times 10^{-5}$  М) составляет 1,6, что согласуется с результатами моделирования (Рисунок 3). Увеличение концентрации кверцетина в модельных растворах приводит к снижению значений степени извлечения и ИФ. Помимо этого, значения степени извлечения уменьшаются в ряду МИП, МИП ПХ, НИП, что говорит об образовании сайтов связывания в присутствии молекул кверцетина при полимеризации анилина.

Дополнительный эксперимент проводили при условиях синтеза с увеличенными значениями параметров: кверцетин -  $3,0 \times 10^{-3}$  М, ПХ -  $2,0 \times 10^{-6}$  М, время синтеза 240 мин. Изучение сорбции кверцетина ( $2,0 \times 10^{-5}$  М) на поверхности МТП с поверхностью модифицированной ПАНИ МИП показало степень извлечения 27% (для ПАНИ НИП 25%) и ИФ 1,1. Увеличение значений параметров приводит к уменьшению значений ИФ, относительно конечной экспериментальной точки моделирования поверхностей отклика.

**Заключение:** Показана возможность применения методов планирования эксперимента с использованием моделирования поверхности отклика для синтеза ПАНИ МИП на поверхности МТП. Изучено влияние условий на процесс синтеза ПАНИ МИП, специфичных к кверцетину, в результате чего выбраны

параметры, оказывающее наибольшее влияние на систему: концентрация кварцетина, концентрация ПХ и время синтеза.

В проведенной работе не удалось достичь оптимальных условий, однако в результате моделирования поверхности отклика установлен диапазон, в котором находятся оптимальные значения параметров синтеза ПАНИ МИП с наилучшими сорбционными характеристиками (концентрация кварцетина  $3,0 \times 10^{-5}$  –  $3,0 \times 10^{-3}$  М, время синтеза 120 – 240 мин, концентрация ПХ  $2,0 \times 10^{-7}$  –  $2,0 \times 10^{-6}$  М.).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Saini S. S., Kaur A. Aflatoxin B1: Toxicity, characteristics and analysis: Mini review // *Glo. Adv. Res. J. Chem. Mat. Sci.* – 2012. – Т. 1. – №. 4. – С. 063-70.
2. Abbasy L. et al. Development of a reliable bioanalytical method based on prostate specific antigen trapping on the cavity of molecular imprinted polymer towards sensing of PSA using binding affinity of PSA-MIP receptor: A novel biosensor // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. Vol. 188. P. 113447.
3. Guo P. et al. Rapid detection of aflatoxin B1 by dummy template molecularly imprinted polymer capped CdTe quantum dots // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. Vol. 411, № 12. P. 2607–2617.
4. Liang Y. et al. An amino-functionalized zirconium-based metal-organic framework of type UiO-66-NH<sub>2</sub> covered with a molecularly imprinted polymer as a sorbent for the extraction of aflatoxins AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> from grain // *Microchim Acta.* 2020. Vol. 187, № 1. P. 32.
5. Murdaya N. et al. A Review: Using Multiple Templates for Molecular Imprinted Polymer: Is It Good? // *Polymers.* 2022. Vol. 14, № 20. P. 4441.
6. Hibbert D.B. Experimental design in chromatography: A tutorial review // *J J. Chromatogr. B.* 2012. Vol. 910. P. 2–13.
7. Bezerra M.A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry // *Talanta.* 2008. Vol. 76, № 5. P. 965–977.
8. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 412, № 24. P. 6509–6517.
9. Dearagao N. et al. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *Talanta.* 2005. Vol. 67, № 5. P. 1007–1013.
10. Stafiej A. et al. Screening and optimization of derivatization in heating block for the determination of aliphatic aldehydes by HPLC // *J. Biochem. Bioph. Methods.* 2006. Vol. 69, № 1–2. P. 15–24.

