

*На правах рукописи*



**Пиденко Павел Сергеевич**

**Молекулярный импринтинг с использованием  
белковых молекул: создание сорбентов  
и их применение в иммуноанализе**

1.4.2. Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Саратов-2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный доктор химических наук, доцент  
руководитель: Бурмистрова Наталия Анатольевна

Официальные **Зяблов Александр Николаевич,**  
оппоненты: доктор химических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», профессор кафедры аналитической химии

**Гендриксон Ольга Дмитриевна,**  
кандидат химических наук, Институт биохимии им. А.Н Баха  
Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии

Ведущая **ФГБОУ ВО «Московский государственный университет**  
организация: **имени М.В. Ломоносова**

Защита состоится «15» февраля 2024 г. в 16 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.2.392.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, СГУ, корп. 1, Институт химии СГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В. А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (410601, ул. Университетская, 42) и на сайте: <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-03/kandidatskaya-dissertaciya-pidenko-pavla-sergeevicha>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » декабря 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета 24.2.392.03,  
доктор химических наук, доцент

Русанова Т. Ю.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Одной из актуальных задач современной химии является разработка эффективных биомиметических систем молекулярного распознавания. На данный момент широко применяемой техникой получения искусственных рецепторных систем является молекулярный импринтинг. Полученные материалы – молекулярно импринтированные полимеры (МИП) – характеризуются наличием селективных сайтов связывания, специфичность которых определяется природой субстрата (молекулы шаблона), введенного при их получении. При этом одним из перспективных направлений является получение МИП, селективных к высокомолекулярным молекулам биологического происхождения – белкам (биоимпринтинг). Сложность белковой структуры и ее трансформация под действием различных физико-химических параметров (рН, температура и др.) накладывает определённые ограничения на условия проведения молекулярного биоимпринтинга. Актуальной задачей является разработка простого, быстрого и дешевого метода получения МИП, селективных к белкам.

В то же время уникальные свойства белковых молекул открывают возможность их применения и в качестве полимерной матрицы в молекулярном импринтинге. Такой тип молекулярного импринтинга (биоимпринтинг, импринтинг белковых молекул) широко применяется для получения импринтированных белков (ИБ), имитирующих каталитические свойства различных ферментов. В качестве рецепторных элементов при разработке аналитических систем ИБ впервые применены в 2016 году. Перспективным направлением является применение ИБ для разработки аналитических методов, позволяющих достигать аналитические характеристики, сопоставимые с коммерчески доступными иммунохимическими системами. При этом получение ИБ экономичнее иммунохимических реагентов и соответствует направлению «зеленой»

химии и этическим требованиям. В то же время число аналитических систем на основе ИБ ограничено. Получение ИБ, характеризующихся специфическим сродством к различным высоко- и низкомолекулярным молекулам шаблонам, и систематическое изучение влияния условий их получения на аналитические свойства, является практически значимой и актуальной задачей.

**Цель диссертационной работы** состояла в разработке методов получения МИП на основе синтетических и природных (белков) полимеров и их применении для определения низко- и высокомолекулярных соединений.

Для достижения поставленной цели решены следующие **задачи**:

- Получены МИП на основе полианилина (**ПАНИ**), специфичные к белковым молекулам, и разработать методику определения пероксидазы хрена (**ПХ**).
- Получены МИП, специфичные к белковым молекулам, на основе материалов из полиуретана **типа D4 (ПУ)** и поливинилпирролидона (**ПВП**), полученных методом электроспиннинга (**эпМИП**), разработать методику определения ПХ с использованием полученных МИП.
- Разработан подход для получения ИБ, специфичных к зеараленону (**ЗЕА**) и его структурным аналогам (4-гидроксикумарин – **4-ГК**, кумарин), разработать методику определения ЗЕА в конкурентном формате на микротитровальном планшете (**микропланшете**). Разработать методику получения сорбента специфичного к ЗЕА, на основе модификации наночастиц оксида кремния (**НЧ SiO<sub>2</sub>**) ИБ, оценить сорбционные характеристики сорбента.
- Разработан подход для получения ИБ, специфичных к альбумину яичного белка (**овальбумин**) и ПХ, разработать методику определения овальбумина в конкурентном формате на микропланшете.

**Научная новизна исследования** состоит в следующем:

- Разработан двухстадийный метод получения МИП, специфичных к ПХ, на основе полианилина (**ПАНИ МИП**), иммобилизованных на поверхности стеклянных мультикапилляров. Предложена методика определения ПХ в модельных растворах с использованием ПАНИ МИП.
- Предложен подход к получению молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга ПУ и ПВП, специфичных к ПХ.
- Разработан подход к молекулярному импринтингу альбуминов (бычий сывороточный альбумин (**БСА**), овальбумин) и ферментов (глюкозооксидаза – **ГО**), специфичных к низко- (ЗЕА, 4-ГК, кумарин) и высокомолекулярным (овальбумин, ПХ) соединениям.
- Предложен подход к получению сорбента на основе НЧ  $\text{SiO}_2$ , модифицированных импринтированной ГО, специфичного к ЗЕА, и показана возможность его применения для твердофазной экстракции аналита из модельных растворов.

**Практическая значимость работы:** Результаты работы вносят вклад в развитие аналитических методов разделения и концентрирования на основе молекулярно импринтированных полимеров.

- Разработана и апробирована на модельных растворах методика определения ПХ с использованием мультикапилляров, модифицированных ПАНИ МИП.
- Показана возможность применения молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга ПУ и ПВП, для концентрирования ПХ с последующим спектрофотометрическим определением.
- Разработаны методики получения ИБ, специфичных к низкомолекулярным молекулам шаблонам (ЗЕА, 4-ГК, кумарин), показана возможность

применения 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля удаления молекул шаблона из белковой матрицы.

- Разработаны методики получения ИБ, специфичных к ЗЕА, и их иммобилизации на поверхности микропланшета и мультикапилляров, апробированные для определения ЗЕА в экстрактах пшеницы.

- Разработаны методики получения ИБ, специфичных к высокомолекулярным соединениям (овальбумин, ПХ). Предложен двухэтапный подход может способ очистки ИБ от молекул шаблонов белковой природы, включающий диализ и эксклюзионную хроматографию. Показана возможность применения полученных ИБ для определения овальбумина в экстрактах кондитерской продукции.

- Продемонстрирована возможность создания сорбента на основе ИБ и коммерческих НЧ SiO<sub>2</sub>, оценены его сорбционные характеристики и показана возможность применения для твердофазной экстракции ЗЕА на примере модельных растворов.

**На защиту автор выносит:**

1. Методику получения ПАНИ МИП, специфичного к белковым молекулам, на поверхности стеклянных мультикапилляров, и их применение для определения ПХ в модельных растворах.
2. Подход к получению МИП, специфичных к белковым молекулам, на основе материалов, полученных электроспиннингом ПУ и ПВП, и применение полученных импринтированных материалов для определения ПХ в модельных растворах.
3. Подход к получению ИБ, специфичных к низкомолекулярным молекулам шаблонам (ЗЕА, 4-ГК, кумарин), и их применение для определения ЗЕА в экстрактах пшеницы. Применение 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля процесса удаления молекул шаблона из белковой матрицы.

4. Подход к получению импринтированной ГО, специфичной к высокомолекулярным молекулам шаблонам (овальбумин, ПХ), и ее применение для определения овальбумина в экстрактах кондитерской продукции. Методика двухстадийной очистки ИБ от молекул шаблонов белковой природы.

**Личный вклад соискателя** заключался в постановке задач, а также выполнении основных теоретических и экспериментальных исследований: разработке методик получения и очистки МИП и материалов на их основе, разработке методик определения низко- и высокомолекулярных соединений в модельных смесях и реальных объектах, анализе и обобщении литературных и экспериментальных данных, оценке результатов исследований и формулировании выводов, представлении полученных результатов на всероссийских и международных конференциях, написании научных публикаций.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ в изданиях, входящих в перечень ВАК, библиографические базы данных Web of Science и Scopus, патент РФ и ряд материалов конференций.

Степень **достоверности результатов исследований** подтверждается применением современных физико-химических и аналитических методов исследования, соответствием между полученными результатами, а также отсутствием противоречий с литературными данными, апробацией полученных данных на всероссийских и международных конференциях, публикацией основных положений диссертационного исследования в профильных высокорейтинговых реферируемых журналах.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационного исследования были доложены на всероссийских и международных конференциях: "IV Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии» (Россия, Туапсе, 2023 г.), XVIII, XIX Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные

материалы. Микитаевские чтения» (Россия, Нальчик 2022, 2023), IV Съезд Аналитиков России (Россия, Москва, 2022), XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Россия, Санкт-Петербург, 2019), II Всероссийская конференция «Химия биологически активных веществ» с международным участием «ХимБиоАктив-2019» (Россия, Саратов, 2019).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения (3 главы), выводов и списка цитируемой литературы. В тексте содержатся таблицы, схемы, диаграммы и графические иллюстрации. Работа представлена на 138 страницах, включает 42 рисунка и 7 таблиц.

**Финансовая поддержка работы** осуществлялась в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований «Искусственные системы молекулярного узнавания биополимеров на основе 2D синтетических рецепторов» (№ 18-29-08033), гранта Российского научного фонда «Высокоселективные сорбенты на основе молекулярно импринтированных полимеров для решения задач животноводства и растениеводства» (№ 22-16-00102), гранта Министерства образования и науки РФ № 4.1063.2017/4.6 и стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-1690.2022.4).

#### **Основное содержание работы:**

Во **Введении** обоснована актуальность проведенных исследований, сформулированы основные цели и задачи, описана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** представлен анализ литературных данных, описывающий актуальное состояние методов получения МИП на основе ПАНИ, с использованием материалов, полученных методом электроспиннинга, и импринтированных белковых молекул. Приведен анализ существующих

примеров применения МИП ПАНИ для выделения и определения белковых молекул. Рассмотрены примеры использования ИБ в качестве рецепторного элемента при анализе целевых молекул различной природы.

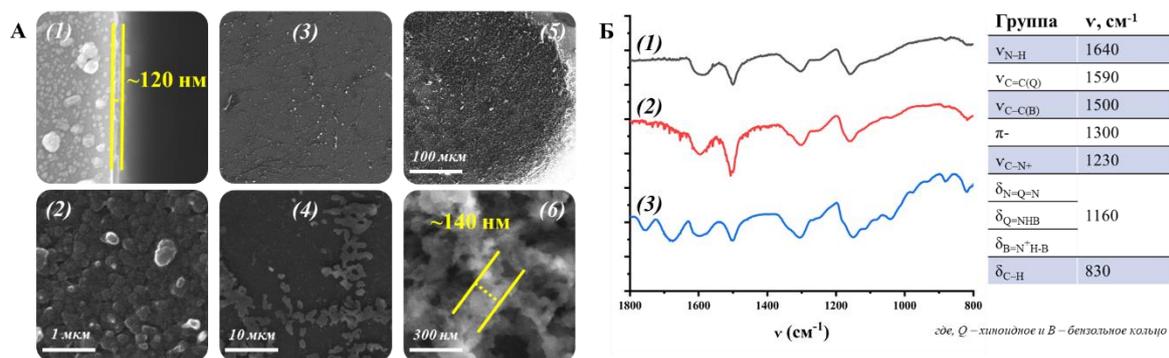
В **Главе 2** приведены сведения об использованных реагентах и материалах в **экспериментальной части** научного исследования. Подробно описаны методики получения ПАНИ МИП, эпМИП ПУ и ПВП; получения ИБ и метод конкурентного анализа на основе ИБ; методики синтеза сорбента на основе НЧ SiO<sub>2</sub>, модифицированных ИБ, и извлечения ЗЕА из модельных растворов на их основе.

**Глава 3** посвящена получению наноструктур ПАНИ МИП, специфичных к ПХ, на поверхности стеклянных носителей (мультикаппиляров и предметного стекла). Показана необходимость проведения предварительной модификации поверхности носителя удерживающим слоем ПАНИ в течение 90 сек при соотношении C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>=1:1,25 моль в 0,2 М HCl.

Определены оптимальные параметры получения ПАНИ МИП: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>ClN:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> =1:1,1 моль в 0,6 мМ HCl, 60 мин. Для одновременного удаления избытка непрореагировавших компонентов синтеза ПАНИ и молекул шаблона из сайтов связывания МИП предложено использование C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>. Морфология поверхности ПАНИ МИП на отдельных этапах получения и после иммобилизации ПХ изучена методом СЭМ (рис. 1А).

Установлено, что на предварительно модифицированной поверхности предметных стекол происходит образование нанопроволоки ПАНИ МИП (100–160 нм), что, вероятно, вызвано локальным буферным действием белковой молекулы, которое предотвращает образование микрофрагментов ПАНИ. При синтезе ПАНИ в отсутствие ПХ (неимпринтированный полимер, НИП) формирование наноструктур ПАНИ не наблюдалось. При получении ПАНИ МИП на поверхности

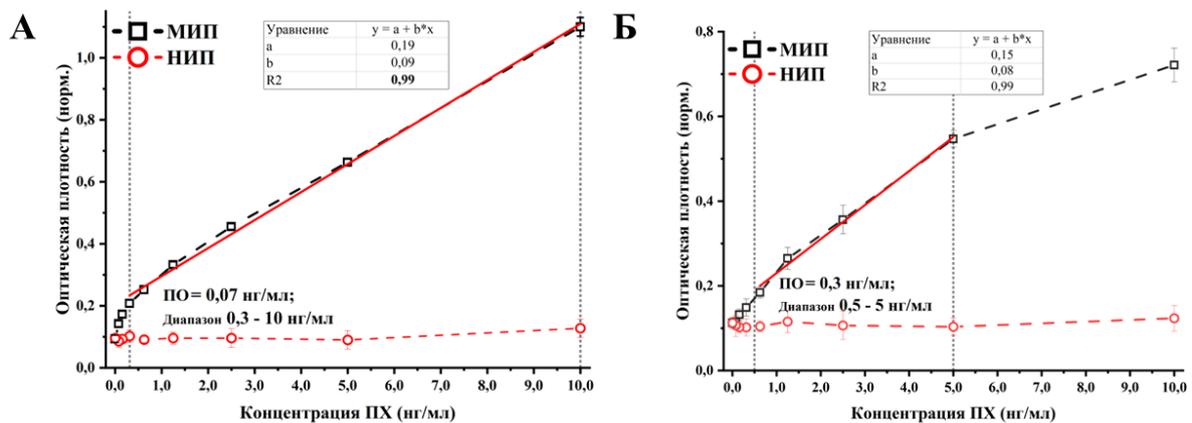
предварительно модифицированных образцов мультикапилляров наблюдали увеличение толщины слоя ПАНИ до 490 нм.



**Рисунок 1.** А. СЭМ изображения торцевого среза мультикапилляра (1) и поверхности предметного стекла (2-6) после формирования удерживающего слоя ПАНИ (2), получения ПАНИ МИП (3) и НИП (4), иммобилизации ПХ на ПАНИ МИП (5,6); Б. ИК спектры пленок ПАНИ (1), ПАНИ МИП до (2) и после (3) иммобилизации ПХ, где Q – хиноидное и B – бензольное кольцо

Изучение плёнок ПАНИ и ПАМИ МИП методом ИК-Фурье спектроскопии показало, что образцы характеризуются близкими профилями и отличаются в основном по интенсивности спектральных полос. После иммобилизации ПХ в молекулярных отпечатках наблюдается незначительная трансформация спектров. Появление полосы  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , вероятно, соответствует  $\nu_{\text{N-H}}$ -колебаниям водородной связи, образованной между ПХ и ПАНИ МИП. Слабоинтенсивная полоса  $1230 \text{ cm}^{-1}$  может быть отнесена к полярной структуре  $\nu_{\text{C-N}^+}$ . Таким образом, формирование комплекса ПАНИ–белок происходит в результате присоединения молекулы шаблона к полимеру через водородные связи.

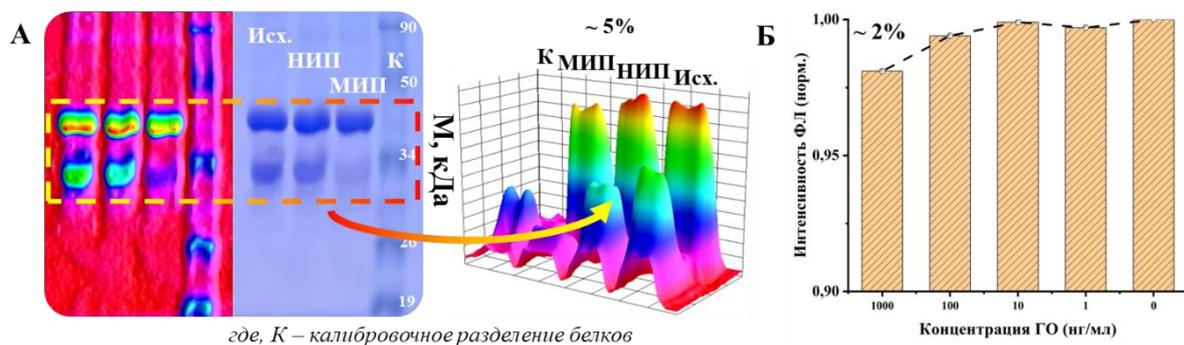
Показана возможность применения мультикапилляров и предметных стёкол, модифицированных ПАНИ МИП, для определения ПХ (рис 2). Степень извлечения ПХ ( $n = 5$ ) из модельных растворов на поверхность мультикапилляра модифицированную ПАНИ МИП, составила от 62,5 до 85% с высокой специфичностью (импринтинг фактор – **ИФ** > 10).



Носитель	ПО, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл
мультикапилляр	0,07	0,3–10
предметное стекло	0,3	0,5–5

**Рисунок 2.** Градуировочная зависимость и диапазон линейности градуировочной зависимости (линейный диапазон) определения ПХ на образце мультикапилляра (А), предметного стекла (Б), модифицированных ПАНИ МИП

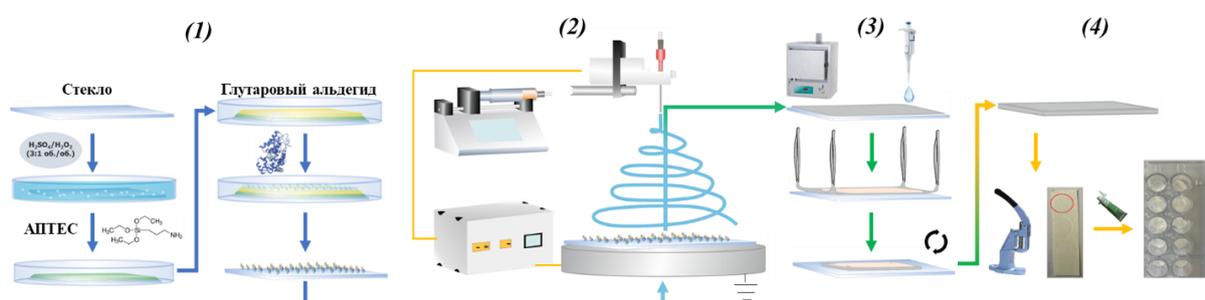
Полученные МИП характеризуются высокой селективностью к нецелевым белковым молекулам. В случае овальбумина с близкой ПХ молекулярной массой неспецифическая сорбция не превышает 5%, при соотношении овальбумин:ПХ = 2:1 моль; в случае ГО с большей молекулярной массой - 2% при ГО:ПХ = 43:1 моль (рис. 3).



**Рисунок 3.** Селективность ПАНИ МИП при извлечении ПХ из белковых смесей ПХ с овальбумином (А) и ГО (Б)

В Главе 4 предложен подход к получению эпМИП, специфичных к белковым молекулам, на основе материалов, полученных электроспиннингом ПУ и ПВП и представлены результаты применения эпМИП для определения ПХ в модельных растворах. Получение эпМИП проведено по методике твердофазного импринтинга (рис. 4).

Иммобилизацию белка на поверхности предметного стекла проводили с использованием 3-аминопропилтриметоксисилана (АПТЭС, 1 % об., C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН) и глутарового альдегида (1 % об.). Определены оптимальные параметры получения эпМИП ПУ методом твердофазного импринтинга на поверхности предметного стекла (табл. 1).

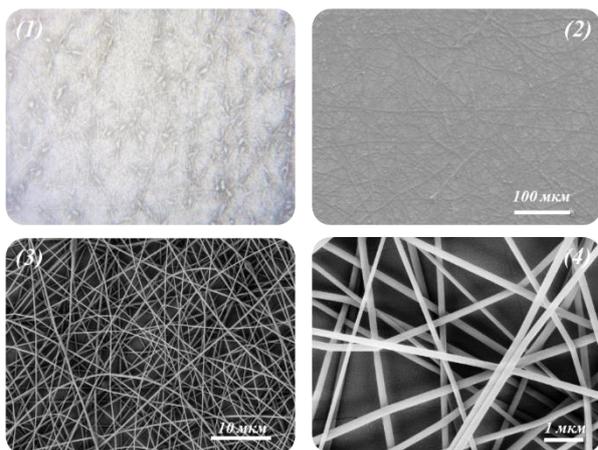


**Рисунок 4.** Схема получения эпМИП методом твердофазного импринтинга: иммобилизация молекулы шаблона на поверхности предметного стекла (1), получение материала эпМИП методом электроспиннинга (2), отделение материала эпМИП (3), приготовление фрагментов материала и фиксирование в микропланшете (4)

**Таблица 1.** Варьируемые и оптимальные параметры получения эпМИП ПУ

	Параметр	Варьируемый показатель	Оптимальный параметр
1	Функционализация, мин	15, 30, 45, 60, 90	60
2	Термическая обработка, мин	15, 30, 45, 60, 90	45
3	Иммобилизация ПХ, мин	30, 60, 120, 720	720
4	Иммобилизация ПХ, °С	4, 37	4

На рисунке 5 представлены изображения микроволокон ПУ и ПВП, полученных при проведении твердофазного импринтинга. Установлено, что волокна ПВП характеризуются меньшим диаметром (~200 нм) по сравнению с ПУ (~600 нм) и, как следствие, большей плотностью покрытия. Использование материала на основе волокон ПВП позволяет снизить уровень фонового сигнала, неспецифическую сорбцию и потенциально использовать различные аналитические платформы, в том числе микропланшеты.

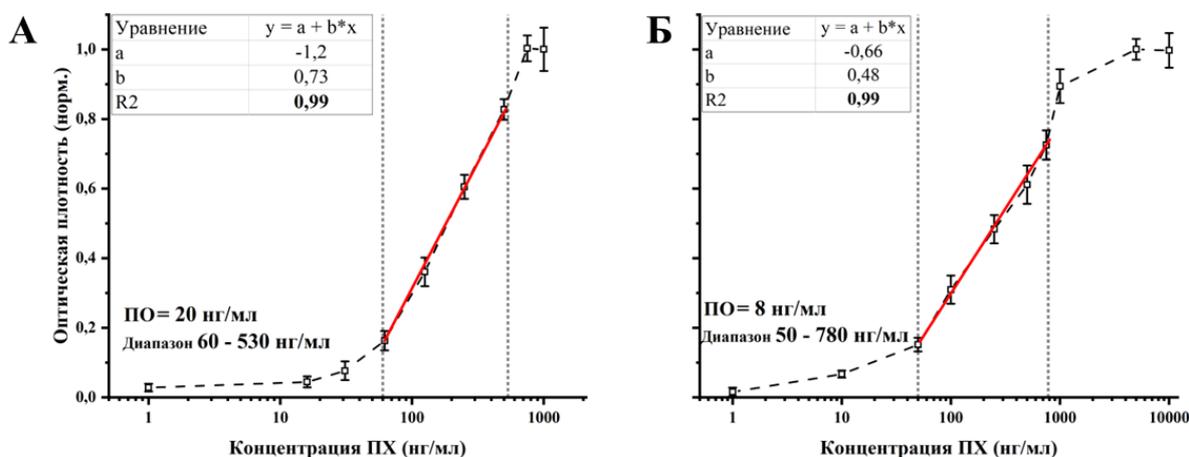


**Рисунок 5.** Фотография (1) и СЭМ изображение (2) внешней стороны волокон ПУ и ПВДФ (3,4) после электроспиннинга на предметном стекле

Определено влияние условий иммобилизации и определения ПХ на сорбционные свойства синтезированных эпМИП (табл. 2). Показана возможность применения образцов эпМИП ПУ/ПВДФ для определения ПХ (рис. 6).

**Таблица 2.** Варьируемые и оптимальные параметры определения ПХ

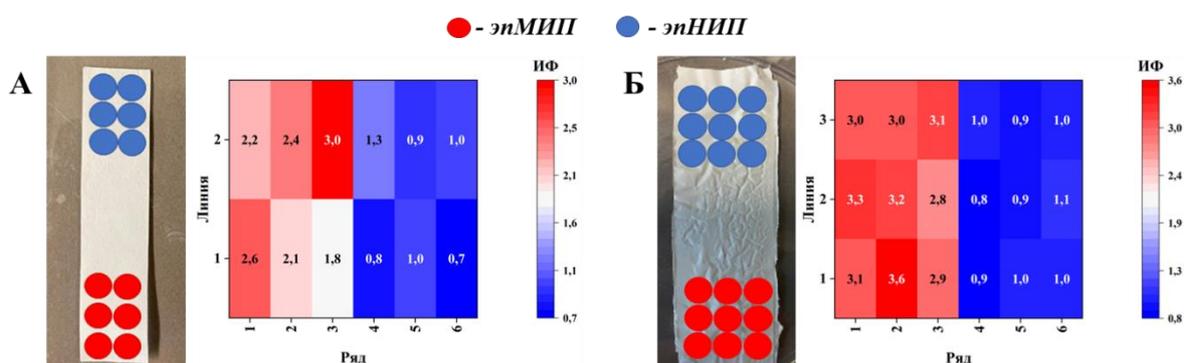
	Параметр	Варьируемый показатель	Оптимальный параметр
1	Предварительная очистка	2 x ФСБ+0.05% Твин 20 3 x ФСБ+0.05% Твин 20 ФСБ без очистки	3 x ФСБ+0.05% Твин 20
2	Блокирующий буфер, БСА % масс.	0,25; 0,5; 1; 2; нет	1
3	Иммобилизация ПХ, мин	60; 90; 120; 180; 720	60
4	Иммобилизация ПХ, °С	4; 37	37



эпМИП	ПО, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	ИФ
ПУ	20	60–530	2,5
ПВДФ	8	50–780	3,2

**Рисунок 6.** Градуировочная зависимость определения ПХ на фрагментах эпМИП ПУ (А) и ПВДФ (Б)

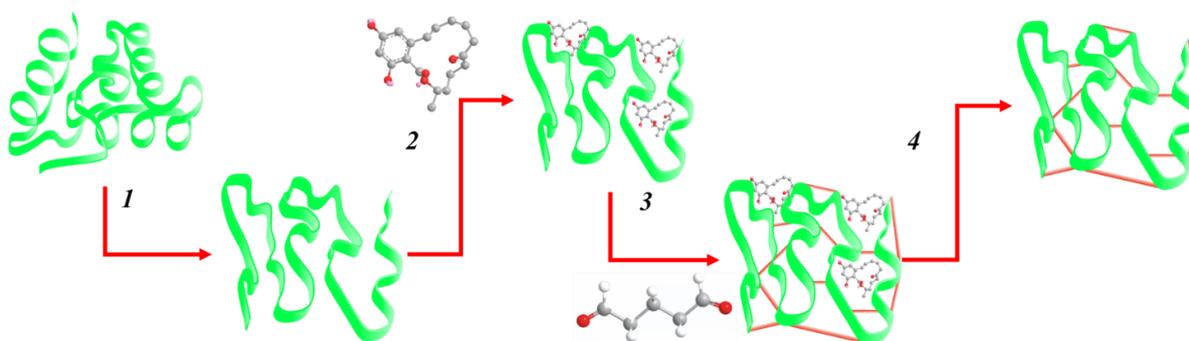
Материал эПМИП ПВП характеризуется высокой селективностью к нецелевым белковым молекулам. При извлечении ПХ из смесей овальбумин:ПХ= 87:1 моль величина неспецифической сорбции составила 7 %, а в случае смесей БСА:ПХ=62:1 моль – 10 %.



**Рисунок 7.** Оценка гомогенности материалов эПМИП ПУ (А) и ПВП (Б) при извлечении ПХ

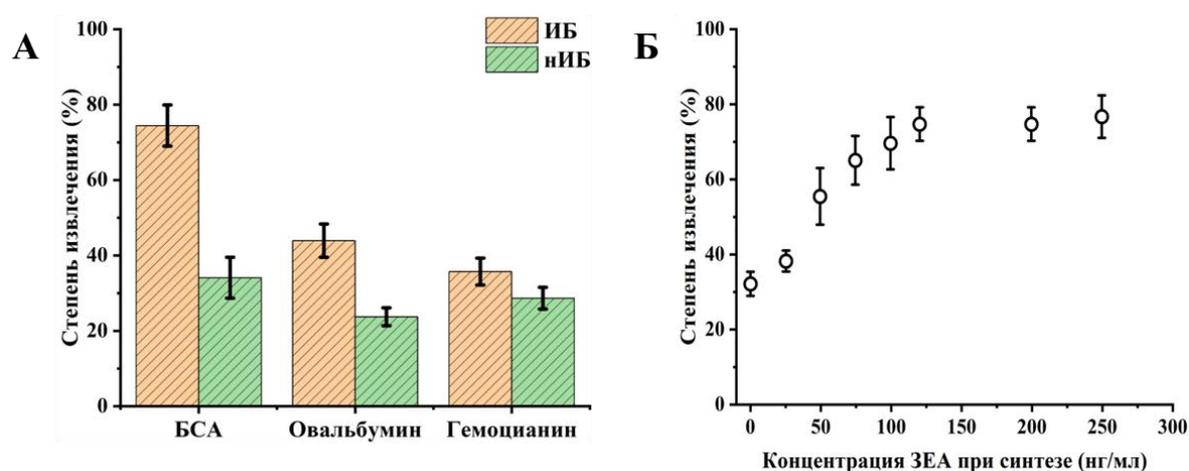
В то же время материал эПМИП ПВП, сохранивший нановолоконную структуру, характеризуется высокой гомогенностью и, как следствие, хорошей воспроизводимостью сорбционных свойств, что делает его перспективным для использования в качестве рецепторного элемента при разработке сенсорных систем для определения белковых молекул (рис. 7).

**Глава 5** описывает получение ИБ, специфичных к низко- (ЗЕА, 4-ГК, кумарин) и высокомолекулярным соединениям (ПХ, овальбумин). Получение ИБ проведено согласно схеме (рис. 8).



**Рисунок 8.** Схема получения ИБ: протонирование аминокислотных остатков (1), образование комплекса матричная молекула-молекула шаблон (2), стабилизация конформации (3), очистка сайтов связывания (4)

Изучено влияние природы матричной белковой молекулы (БСА, овальбумин, гемоцианин из лимфы *Megathura crenulata*) и концентрации молекулы шаблона при получении ИБ на степень извлечения ЗЕА из раствора. Степень извлечения ЗЕА определена методом ЖХ-МС/МС. Установлено, что максимальная специфичность (ИФ = 2,2) и степень извлечения ( $74 \pm 5$  %) ЗЕА достигается при использовании БСА и концентрации ЗЕА 120 мг/мл при получении ИБ.



**Рисунок 9.** Степень извлечения ЗЕА (50 мкг/мл, ФСБ), в зависимости от матричной молекулы (А) и концентрации (25–250 мкг/мл) молекулы шаблона (Б) при синтезе

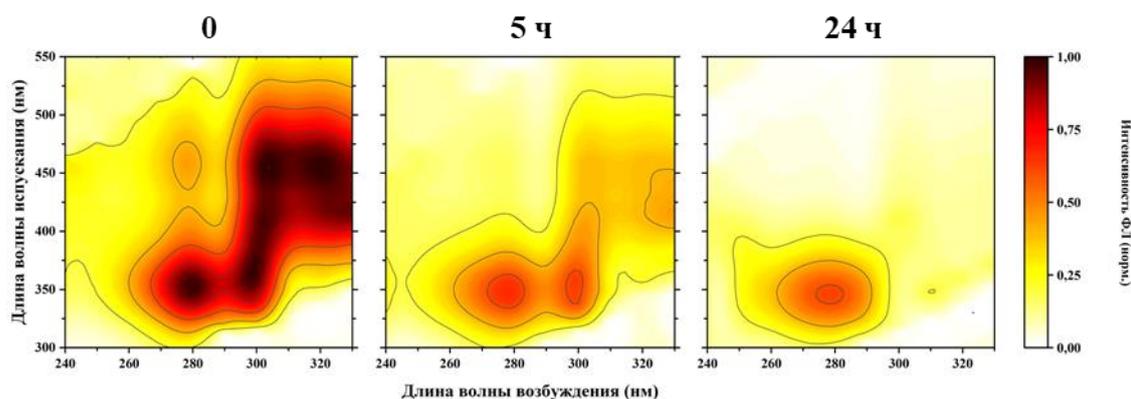
Проведен выбор белковой молекулы (БСА, ГО) для получения ИБ, специфичного к ПХ и овальбумину, на основе оценки размера белковых молекул методом динамического светорассеяния и данных рентгеноструктурного анализа из Protein Data Bank (табл. 3). Наибольшая разница в размерах белковых молекул наблюдается для пары ГО:овальбумин  $\sim 2,2$  раза, а по площади поверхности для пар ГО:ПХ  $\sim 3,2$  раза и ГО:овальбумин  $\sim 2,7$  раза. ГО использовали для получения ИБ, специфичных к ПХ и овальбумину. Изучено влияние концентрации ПХ (5–200 мг/мл) при импринтинге ГО на сорбционные свойства ИБ. Установлено, что максимальная специфичность извлечения (ИФ=4,7) ПХ

из модельного раствора (500 нг/мл) получена при использовании ПХ 100 мг/мл.

**Таблица 3.** Параметры белковых молекул

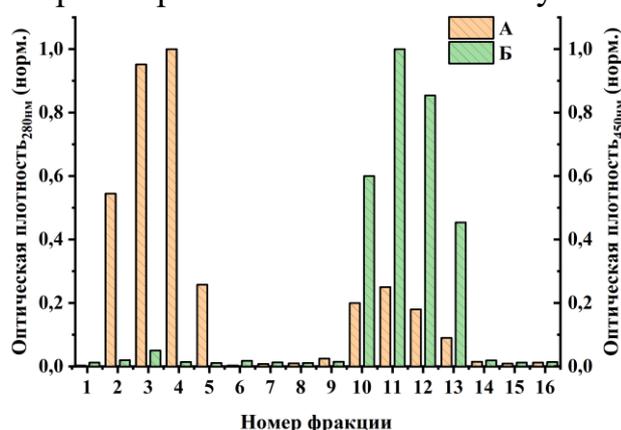
	Белок	$M_r$ , кДа	Размер, нм	Площадь поверхности, $\text{k}\text{\AA}^2$
1	ГО	160	$12,9 \pm 0,1$	32,4
2	БСА	69	$7,8 \pm 0,2$	24,3
3	ПХ	44	$7,1 \pm 0,2$	10,3
4	Овальбумин	45	$5,9 \pm 0,2$	13,1

Предложен подход контроля процесса удаления низкомолекулярных молекул шаблона (ЗЕА) из белковой матрицы на основе 3D флуоресцентной спектроскопии (рис. 10).



**Рисунок 10.** Влияние времени диализа на проекции 3D флуоресцентных спектров растворов ИБ, специфичных к ЗЕА

Разработана двухстадийная комбинированная методика очистки импринтированной ГО от молекул ПХ и овальбумина, включающая

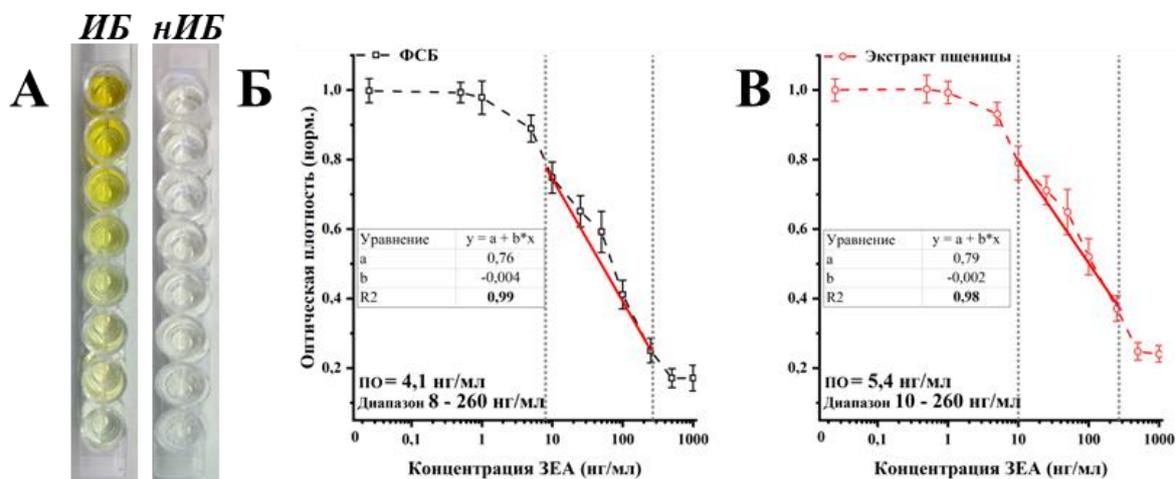


**Рисунок 11.** Хроматографический профиль, разделения на Sephadex™ G-75 раствора ИБ при 280 нм до (А) и 450 нм после (Б) реакции с хромогенным субстратом для ИФА на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ)

последовательные диализ (ФСБ, рН 6,5, 400/ч, ~5 ч) и эксклюзионную хроматографию (1x70 см, Sephadex™ G-75). Хроматографический профиль разделения до и после добавления ТМБ представлен на рис. 11. Две группы фракций 2–5 и 10–13 содержали белковые молекулы. После добавления ТМБ характерный максимум наблюдали для фракций 10–13,

содержащих молекулы шаблона. Данные показывают, что очищенный ИБ, содержался во фракциях 2–5.

ИБ использованы для замены антител для иммунохимического определения ЗЕА (**конкурентный анализ**) в модельных растворах (0–1000 нг/мл, ФСБ) и экстракте пшеницы (рис. 12.)



Раствор	ПО, нг/мл	ПО, мкг/кг	Линейный диапазон, нг/мл
ФСБ	4,1	82	8–260
Экстракт пшеницы	5,4	108	10–260

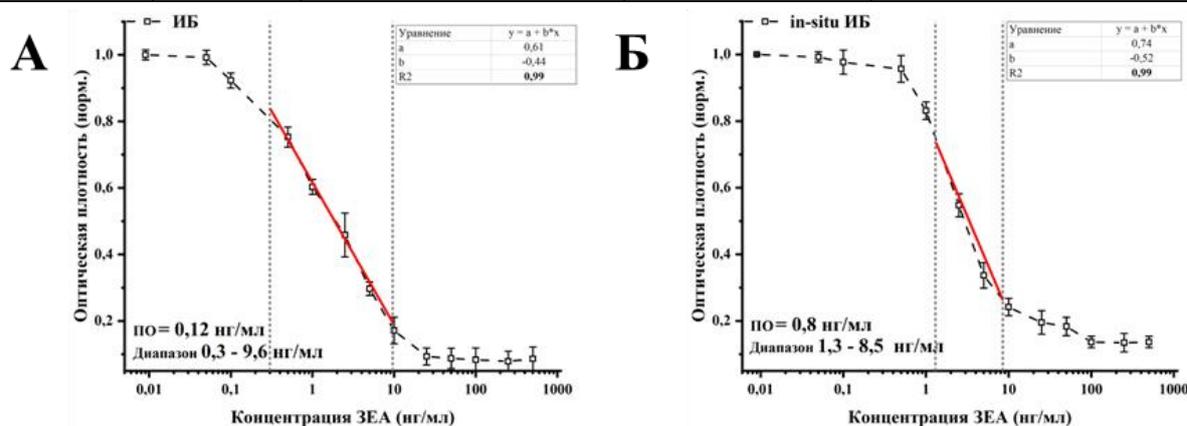
**Рисунок 12.** Общий вид лунок микропланшета после проведения определения ЗЕА (А), градуировочные зависимости определения ЗЕА в модельных растворах (Б) и экстракте пшеницы (В)

Установлено, что сайты связывания ИБ характеризовались низким сродством (<10%) к отличным по строению (охратоксин А, афлатоксин В1 и фумонизин) микотоксинам и высоким (81–115%) по отношению к молекулам близким ( $\alpha$ -зеараленол,  $\beta$ -зеараленол и зеараланон) по строению к ЗЕА. Конкурентный анализ на основе ИБ апробировали для определения ЗЕА в 12 естественно загрязненных образцах злаковых культур (табл. 4).

Изучено влияние метода получения ИБ в растворе («в пробирке») и на поверхности мультикапилляра (*in situ*) на эффективность определения ЗЕА в модельных растворах (0–1000 нг/мл, ФСБ) конкурентным методом. Установлено, что ИБ, полученные «в пробирке», позволили снизить ПО определения ЗЕА в 10 раз, что соответствует уровню коммерчески доступных иммунохимических тест-систем (0,2 нг/мл; Serpham Life Sciences, Inc, США). В то же время *in-situ* ИБ представляют интерес в плане более быстрого проведения анализа.

**Таблица 4.** Результаты определения содержания ЗЕА в образцах пшеницы (n=3)

Образец	Конкурентный анализ на ИБ, мкг/кг			ЖХ-МС/МС, мкг/кг
	Найдено	Найдено после добавления 100 мкг/кг	Степень извлечения, %	Найдено
1	<ПО	135	111	21
2	125	236	108	118
3	150	213	109	95
4	<ПО	154	110	39
5	<ПО	147	96	52
6	122	245	102	138
7	<ПО	131	103	26
8	<ПО	144	109	31



ИБ	ПО, мг/мл	ПО, мкг/кг	Линейный диапазон, мг/мл
в «пробирке»	0,12	2,4	0,3–9,6
<i>in-situ</i>	0,8	16	1,3–8,5

**Рисунок 13.** Градуировочные зависимости определения ЗЕА с использованием мультикапилляров модифицированных ИБ, полученных в «пробирке» (А) и *in-situ* (Б)

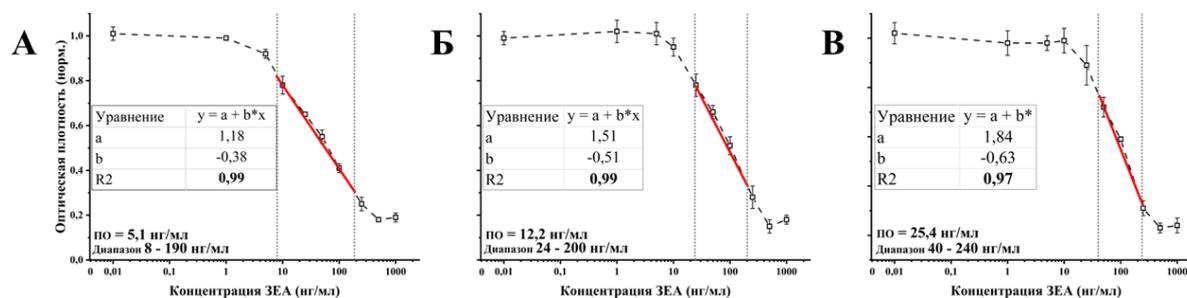
Конкурентный анализ на основе мультикапилляров модифицированных ИБ использовали для определения ЗЕА в искусственно загрязненных образцах пшеницы методом «введено-найдено» (табл. 5).

**Таблица 5.** Результаты определения содержания ЗЕА в образцах пшеницы (n=3)

Образец	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	Степень извлечения, %	S <sub>r</sub> , %
1	100	112	112	8,5
2	125	111	88	9,6
3	150	161	107	9,4

В целях снижения рисков возникновения опасности при получении ИБ, изучена возможность замены ЗЕА на структурные аналоги (4-ГК,

кумарин) при получении ИБ и показана эффективность их использования при определении ЗЕА (рис. 14).

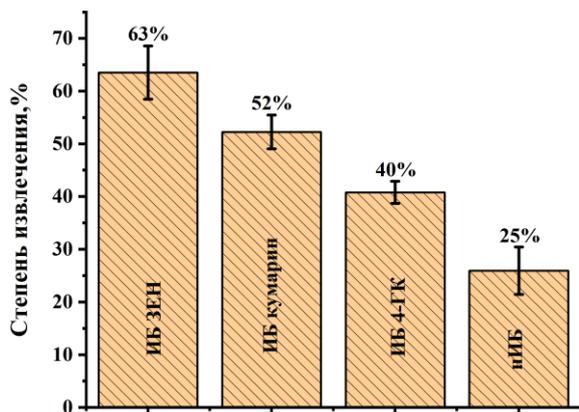


Молекула шаблона	ПО, мг/мл	ПО, мкг/кг	Линейный диапазон, мг/мл
ЗЕА	5,1	102	8-190
4-ГК	12,2	244	24-200
Зеараленон	25,4	508	54-240

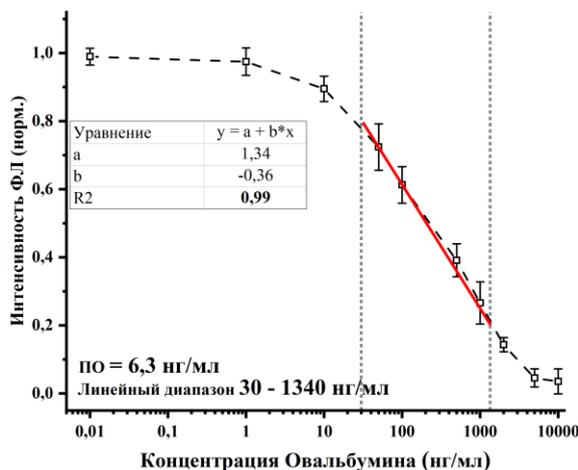
**Рисунок 14.** Градуировочные зависимости определения ЗЕА с использованием ИБ, полученных в присутствии ЗЕА (А), 4-ГК (Б), кумарина (В)

Изучена возможность получения сорбента на основе коммерческих НЧ SiO<sub>2</sub>, модифицированных ИБ. Для повышения адсорбции ИБ поверхность НЧ модифицировали ПАНИ (ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub>). Степень извлечения ЗЕА из модельного раствора (50 мкг/мл, ФСБ) с использованием сорбента оценена методом ВЭЖХ УФ (рис. 15).

Оценены аналитические характеристики ИБ при конкурентном определении овальбумина в модельных растворах (0–10 мкг/мл, ФСБ) и экстракте пшеницы в микропланшете (рис. 13). Линейный диапазон определения овальбумина составил 30–1340 нг/мл с ПО 6,3 нг/мл. Конкурентный анализ на основе ИБ использовали для определения овальбумина методом введено-найдено в искусственно загрязнённых экстрактах кондитерских изделий (табл.6).



**Рисунок 15.** Степень извлечения ЗЕА из модельных растворов с использованием сорбентов на основе ПАНИ@НЧ SiO<sub>2</sub> (б), модифицированных ИБ



**Рисунок 16.** Градуировочная зависимость определения овальбумина в модельных растворах

**Таблица 6.** Результаты определения овальбумина в кондитерском изделии (n=3)

Образец	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Степень извлечения, %	S <sub>r</sub> , %
1	100	95	95	6,3
2	200	245	120	4,5
3	500	480	96	5,1

Таким образом, разработана методика получения ПАНИ МИП, специфичного к ПХ на поверхности стеклянных мультикапилляров. Представлен подход к получению эпМИП, специфичных к ПХ на основе материалов ПУ и ПВП. Продемонстрирован подход к получению ИБ, специфичных к низко- (ЗЕА, 4-ГК, кумарин) и высокомолекулярным молекулам шаблонам (овальбумин, ПХ) молекулам шаблонам и их применение для конкурентного определения ЗЕА и овальбумина в экстрактах пшеницы и кондитерских изделий. Предложено применение 3D флуоресцентной спектроскопии для контроля процесса удаления молекул шаблона из белковой матрицы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны методы получения МИП на основе синтетических (полианилин, полиуретан, поливинилпирролидон) полимеров и белковых молекул (бычий сывороточный альбумин, овальбумин, глюкозооксидаза) и показана возможность их аналитического применения.
2. Разработана методика получения МИП на основе полианилина, специфичного к пероксидазе хрена, на поверхности стеклянных микрокапиллярных структур, использованная для определения ПХ в модельных растворах (ПО 0,07 нг/мл).
3. Продемонстрирована возможность применения молекулярно импринтированных материалов, полученных методом электроспиннинга полиуретана и поливинилпирролидона, для определения ПХ в модельных растворах (ПУ: ПО 20 нг/мл; ПВП: ПО=8 нг/мл).
4. Предложен подход молекулярного импринтинга альбуминов (БСА, овальбумин) и ГО, специфичных к низко- (зеараленон, 4-гидроксикумарин, кумарин) и высокомолекулярным (овальбумин и ПХ) соединениям. Показана возможность замены ЗЕА при синтезе ИБ на его структурные аналоги. Предложен способ визуализации процесса очистки ИБ от молекул шаблонов методом диализа с применением 3D флуоресцентной спектроскопии.
5. Разработана методика определения ЗЕА на основе ИБ (ПО 5,4 нг/мл), проверенная в реальных объектах (пшеница, степень извлечения 96÷111%). Разработана методика определения овальбумина на основе импринтированной ГО (ПО 6,3 нг/мл) и проведена апробация методики на примере определения овальбумина в экстрактах кондитерских изделий (степень извлечения 95÷120%).
6. Продемонстрирована возможность создания бионеорганического сорбента на основе ИБ и коммерческих НЧ SiO<sub>2</sub>, оценена возможность его

использования для твердофазной экстракции ЗЕА на примере модельных растворов (степень извлечения ~60%).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы Web of Science и Scopus*

1. **Pidenko P. S.**, Pidenko S. A., Skibina Y. S., Zacharevich A. M., Drozd D. D., Goryacheva I. Y., Burmistrova N. A. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 412. P. 6509 – 6517
2. **Pidenko P.**, Zhang H., Lenain P., Goryacheva I., De Saeger S., Beloglazova, N. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // *Anal. Chim. Acta.* 2018. Vol. 1040. P. 99 – 104.
3. Burmistrova N. A., **Pidenko P. S.**, Pidenko S. A., Zacharevich A. M., Skibina Y. S., Beloglazova N. V., Goryacheva, I. Y. Soft glass multi-channel capillaries as a platform for bioimprinting. // *Talanta.* 2020. Vol. 208. P.120445
4. **Pidenko P.**, Presnyakov K., Beloglazova N., Burmistrova, N. Imprinted proteins for determination of ovalbumin. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 414. P. 5609–5616.
5. **Пиденко П. С.**, Пресняков К. Ю., Дрозд Д. Д., Бурмистрова Н. А. Селективные сорбенты на основе импринтированной глюкозооксидазы. // *Ж. аналит. химии.* 2023. Т. 78. № 9. С. 807–812. [**Pidenko P. S.**, Presnyakov K. Y., Drozd D. D., Burmistrova N. A. (). Selective Adsorbents Based on Imprinted Glucose Oxidase. // *J. Anal. Chem.* 2023. Vol. 78. No. 9. P. 1146-1151.]
6. **Пиденко П. С.**, Пресняков К. Ю., Бурмистрова Н. А. Белковые молекулы: шаблоны и матрицы в молекулярном импринтинге. // *Ж. аналит. химии.* 2023. Т. 78. № 8. С. 675–689. [**Pidenko P. S.**, Presnyakov K. Y., Burmistrova N. A. Proteins: Templates and Matrices in Molecular Imprinting.// *J. Anal. Chem.* 2023. Vol. 78. No 8. 953-964.]
7. Бурмистрова, Н. А., **Пиденко, П. С.**, Пресняков, К. Ю., Дрозд, Д. Д., Скибина, Ю. С., Пиденко, С. А., Горячева, И. Ю. Поликапиллярные системы в аналитической химии. // *Ж. аналит. химии.* 2021. Т. 76. № 7. С. 579–592 [Burmistrova N. A., **Pidenko P. S.**, Presnyakov K. Y., Drozd D. D., Skibina Y. S., Pidenko S. A., Goryacheva, I. Y. (). Multicapillary Systems in Analytical Chemistry. // *J. Anal. Chem.* 2021. Vol. 76. P. 785-796.]
8. Presnyakov K. Y., **Pidenko P. S.**, Pidenko S. A., Biryukov I.R., Burmistrova N.A. Molecularly imprinted polyaniline: Synthesis, properties, application. A review // *Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology.* 2022. Vol. 22, No. 2. P. 142–149.

### Патент:

9. Патент РФ № 2753850 С1 от 30.09.2020, Пиденко С. А., Бурмистрова Н. А., **Пиденко П. С.**, Пресняков К. Ю., И. Ю. Горячева. Способ получения молекулярно-импринтированного полимера.

### *Статьи в сборниках и тезисы докладов*

1. **Пиденко П. С.**, Дрозд Д. Д., Яковенко Ю. А., Скибина Ю.С., Бурмистрова Н. А., Горячева И. Ю. Биоимпринтинговые полимеры в микроструктурных оптических системах // XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Тезисы докладов. Санкт-Петербург, 2019. Т. 4. С. 298.
2. **Пиденко П. С.**, Пиденко С. А., Шувалов А. А., Бурмистрова Н. А. Синтез молекулярно импринтированных полимеров селективных к пероксидазе хрена. // Химия биологически активных веществ: Межвузовский сборник научных трудов II Всероссийской конференции с международным участием. Саратов., 2019. С. 299–301.
3. **Пиденко П.С.**, Пресняков К. Ю., Бурмистрова Н. А. Импринтированные белки для обнаружения овальбумина. // IV Съезд аналитиков России., Тезисы докладов. Москва., 2022. С. 237.
4. Пресняков К. Ю., **Пиденко П.С.**, Пиденко С.А., Бурмистрова Н. А. Молекулярно импринтированный полианилин: синтез, применение, свойства // XVIII международная научно-практическая конференция Новые полимерные композиционные материалы Микитаевские чтения., Нальчик., 2022. С. 287.
5. Пресняков К. Ю., **Пиденко П.С.**, Пиденко С.А., Бурмистрова Н. А. Бионерганический композитный сорбент для извлечения экотоксикантов // XIX международная научно-практическая конференция Новые полимерные композиционные материалы Микитаевские чтения., Нальчик., 2023. С. 336.

## БЛАГОДАРНОСТИ

*Автор выражает благодарность: к.х.н. Белоглазовой Н.В. за помощь в выполнении работы и интерпретации результатов исследований; к.ф.-м.н. Скибиной Ю.С. за предоставленные образцы поликапиллярных систем и помощь при получении и интерпретации спектральных данных; сотрудникам Института Аналитической Химии, Хемо- и Биосенсоров университета г. Регенсбург (руководитель. проф. Antje J. Vaitner и наставник проф. Axel Dürkop) за методические советы и проведение экспериментов в лаборатории; Дрозду Д.Д. за предоставленные образцы квантовых точек; Преснякову К.Ю за помощь в выполнении экспериментов; коллегам и соавторам за ценные советы и плодотворное сотрудничество.*