

УДК 543.552

# ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТА ХИТОЗАНА, ГРАФИТИРОВАННОЙ САЖИ И ПОЛИАРИЛЕНФТАЛИДА С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ОТПЕЧАТКАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛАРИТРОМИЦИНА

© 2024 г. Ю. А. Яркая<sup>a,\*</sup>, М. И. Назыров<sup>a</sup>, Д. А. Дымова<sup>a</sup>, В. Н. Майстренко<sup>a</sup><sup>a</sup>Уфимский университет науки и технологий, химический факультет

ул. Заки Валиди, 32, Уфа, 450076, Россия

\*E-mail: julijajarkaeva05@gmail.com

Поступила в редакцию 13.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Для селективного определения антибиотика кларитромицина разработан вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного композитом хитозана, графитированной сажи Carbolblack C и полиарилефталата, содержащего в основной цепи полимера дифенилентиио- и дифениленоксидные фрагменты в соотношении 1 : 2, с молекулярными отпечатками кларитромицина, полученными методом инверсии фаз. С использованием ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии изучены состав и морфология модифицирующего покрытия. Методами спектроскопии электрохимического импеданса, циклической и дифференциально-импульсной вольтамперометрии изучены электрохимические и аналитические характеристики сенсора. Подобраны оптимальные условия регистрации аналитического сигнала. С использованием  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  в качестве зонда линейный диапазон определяемых концентраций составил  $1 \times 10^{-7}$ – $5 \times 10^{-4}$  М с пределом обнаружения  $5.3 \times 10^{-8}$  М. Показано, что применение полимера с молекулярными отпечатками кларитромицина повышает чувствительность сенсора практически в 10 раз по сравнению с неимпринтированным полимером. Предложенный сенсор апробирован на образцах урины, плазмы крови, а также пищевых продуктов (мясо, молоко), степень извлечения составила 90–96, 80 и 92% соответственно, а относительное стандартное отклонение не превышало 10% во всех случаях.

**Ключевые слова:** полимеры с молекулярными отпечатками, полиарилефталат, инверсия фаз, вольтамперометрический сенсор, кларитромицин, графитированная сажа.

DOI: 10.31857/S0044450224060043, EDN: tumxjo

Полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), или молекулярно импринтированные полимеры, представляют собой синтетические аналоги природных биологических систем типа антитело–антиген и работают по принципу “ключ–замок”. При этом ПМО могут обладать специфичностью и селективностью на уровне биологических рецепторов, но с такими преимуществами как физическая прочность, надежность, устойчивость к повышенному давлению и температуре, инертность к различным химическим веществам, стабильность, а также длительность хранения в условиях окружающей среды и низкая стоимость [1, 2]. Природные рецепторы, как правило, требуют хранения при пониженной температуре, а ПМО мо-

гут храниться достаточно долго, не требуя особых условий хранения, применяться в гораздо более широком диапазоне температур и pH. Рост интереса к дизайну, разработке и применению ПМО в последние годы отражает важность этой области химической сенсорики. Сенсоры на основе ПМО используют для анализа пищевых продуктов, объектов окружающей среды и биологических образцов благодаря их высокой чувствительности, специфичности и стабильности [2].

При создании сенсоров на основе ПМО обычно используют классический метод, который заключается в полимеризации (химической, электрохимической, фотополимеризации) молекул мономера в присутствии темплата с его

последующим вымыванием из полимера с образованием полостей, комплементарных темплату по размеру, форме и молекулярным взаимодействиям [3–5]. Однако существуют и другие методы получения ПМО, такие как метод инверсии фаз (ИФ) (phase inversion) и метод мягкой литографии (soft lithography) [1, 6]. Последний заключается в создании штампа, состоящего из самоорганизующегося слоя темплата, который вдавливают в частично полимеризованную пленку и удерживают до полной полимеризации, после чего штамп удаляют вымыванием соответствующим растворителем. Обычно данный подход применяют для обнаружения больших молекул и структур, которые не могут распределиться во всем объеме полимера, например для обнаружения клеток *Escherichia coli* [7]. Метод ИФ заключается в применении готовых полимеров, которые осаждают на поверхность рабочего электрода из раствора в присутствии темплата путем добавления другого растворителя, который вызывает осаждение содержащего темплат полимера (wet phase inversion – мокрая инверсия фаз) [8, 9], либо испарением растворителя из полимера в процессе нагревания или центрифугирования (dry phase inversion – сухая инверсия фаз) [1]. Его главное преимущество – простота и быстрое изготовление ПМО-сенсора. Для растворения компонентов используют растворитель, совместимый как с основным полимером, так и с темплатом. Их смешивание позволяет формировать комплексы типа “гость–хозяин” в растворе. Метод сухой ИФ проще и удобнее, так как в отличие от метода мокрой ИФ не требует использования второго растворителя; обычно его реализуют при нагревании осажденного на поверхность электрода полимера. Кроме того, ПМО, полученные испарением растворителя, имеют плотную однородную структуру из-за постепенного увеличения концентрации полимера в формирующейся пленке вследствие испарения растворителя [10].

Метод ИФ разработан Кобаяши и коллегами в 1996 г. [11]. С тех пор ПМО, полученные инверсией фаз, применяли в энантиомерном разделении [12], твердофазной экстракции [13] и при обнаружении различных соединений в пищевых продуктах и водной среде [14, 15]. В ПМО, полученных с помощью ИФ, обычно отсутствует процесс сшивания, что в отдельных случаях может приводить к коллапсу полостей в процессе удаления темплата, однако этот метод обеспечивает самый простой способ получения тонкопленочных ПМО, необходимых при создании вольтамперометрических сенсоров. В литературе представлено лишь небольшое количество работ по созданию электрохимических сенсоров с ПМО, полученных методом ИФ [9, 16–18].

Обычно ИФ применяют при создании ПМО на основе таких полимеров, как полисахариды

(декстран, хитозан, целлюлоза) [17, 19], полиамиды (нейлон) [18], акриловые сополимеры [9, 16, 20], сополимеры полиэтилена [21], ароматические полисульфоны [22] и т.д. Для изготовления ПМО-сенсоров интерес представляют также полиарилефталиды (ПАФ) [23–26], тонкие пленки которых являются электропроводящими, химически устойчивыми к нагреванию и воздействию агрессивных сред. Полиарилефталиды ранее изучали и применяли для изготовления сенсоров на основе композитных материалов [27]. Нанесение полимера на поверхность электрода зачастую приводит к уменьшению токов из-за увеличения сопротивления, поэтому в сенсорный слой необходимо добавлять компоненты, повышающие электропроводность. В последнее время для этих целей применяют наноматериалы, такие как наночастицы Au и Pt, одностенные и многостенные углеродные нанотрубки, восстановленный оксид графена [5, 26, 28] и др.

Основной характеристикой ПМО-сенсоров является селективность связывания с определяемой молекулой – молекулой темплата. Как правило, селективность (также называемая коэффициентом селективности или фактором импринтинга  $F_{\text{imp}}$ ) оценивается как отношение эффективностей связывания темплата с ПМО и неимпринтированным полимером (НИП), полученное из аналитических сигналов (чаще из чувствительностей):  $F_{\text{imp}} = S_{\text{ПМО}}/S_{\text{НИП}}$ .

Стоит отметить, что еще одним преимуществом ПМО является универсальность, которая заключается в том, что темплатом может быть любое вещество с некоторыми специфическими функциональными группами, от сравнительно небольших молекул аминокислот до более крупных молекул антибиотиков, белков и даже предклеточных форм (фаги и вирусы) и клеток. Наиболее часто ПМО-сенсоры используют для определения энантиомеров биологически активных соединений, а также антибиотиков [1, 2]. При этом определение антибиотиков является одной из важных практических задач аналитической химии в связи с их широким применением и, как следствие, широкой распространенностью в окружающей среде и пищевых продуктах. Среди них макролиды представляют собой группу антибиотиков, широко используемых в медицине для лечения ряда заболеваний, но наиболее важным их применением является лечение респираторных инфекций, в том числе лечение пациентов с COVID-19. Они также используются в ветеринарии. Широко используемые макролиды, такие как эритромицин, азитромицин и кларитромицин (Клр), часто обнаруживают в окружающей среде и пищевых продуктах, что приводит к развитию устойчивости живых организмов к антибиотикам. Ранее для определения макролидов разработаны электроаналитические методики, основанные

на использовании различных электрохимических (био)сенсоров [29].

В настоящей работе представлен вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода (СУЭ), модифицированного композитом хитозана (ХТЗ) и графитированной сажи Carbolblack С (СВ) и ПАФ с молекулярными отпечатками, полученными методом ИФ, для селективного определения Клр. Используемый ПАФ содержит в основной цепи полимера дифенилентио- и дифениленоксидные фрагменты в соотношении 1 : 2 [27]. Морфологию поверхности изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), состав модифицирующего покрытия исследовали методом ИК-спектроскопии. Методами спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ), циклической (ЦВ) и дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВ) изучали электрохимические и аналитические характеристики сенсора. Подбирали оптимальные условия для определения Клр с помощью предложенного сенсора. Для определения Клр использовали раствор  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  в качестве зонда. Предложенный сенсор апробировали на реальных образцах биологических жидкостей (моча и плазма крови) и пищевых продуктов (мясо, молоко). Изучали воспроизводимость, стабильность, а также селективность сенсора.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты и оборудование.** Кларитромицин ( $\geq 99.5\%$ ), азитромицин ( $\geq 99.5\%$ ), линкомицин ( $\geq 99.5\%$ ),  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  ( $\geq 99.0\%$ ) и  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  ( $\geq 99.0\%$ ) приобретали у Sigma-Aldrich (США), порошок графитированной сажи Carbolblack С приобретали у Restek (США). Образцы полимера ПАФ ( $\geq 99\%$ ) предоставлены лабораторией синтеза функциональных полимеров Уфимского института химии РАН (Уфа, Россия). В качестве фонового электролита для Клр использовали фосфатный буферный раствор (ФБР,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 М, рН 6.86), для  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  — 0.1 М раствор КСl. 5 мМ раствор  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  использовали в качестве зонда при определении Клр.

Все электрохимические измерения проводили на потенциостате-гальваностате Autolab PGSTAT 204 с модулем импеданса FRA32M (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды) с программным обеспечением NOVA. Стандартная трехэлектродная ячейка состояла из модифицированного СУЭ (Metrohm Autolab Ins., Нидерланды) диаметром 3 мм в качестве рабочего электрода, платиновой пластины в качестве вспомогательного электрода и хлоридсеребряного электрода с 3.5 М раствором КСl в качестве электрода сравнения. Измерение рН растворов проводили с помощью рН-метра Seven Compact рН/Ion S220 (Mettler-Toledo AG,

Швейцария). Растворы перемешивали с помощью магнитной мешалки MR Hei-Tec (Heidolph, Германия). ИК-спектры регистрировали в диапазоне  $450\text{--}3500\text{ см}^{-1}$  на спектрометре FTIR-8400S (Shimadzu, Япония) при комнатной температуре (разрешение  $8\text{ см}^{-1}$ , число сканов 30) с программным обеспечением IR solution. СЭМ-снимки получали на сканирующем электронном микроскопе Tescan Mira (Tescan, Чехия).

**Модифицирование электрода.** Для модифицирования СУЭ к 1 мл ХТЗ добавляли 2 мг СВ, после чего выдерживали смесь в ультразвуковой ванне в течение 40 мин до получения однородной дисперсии. Выбор раствора ХТЗ для получения дисперсии СВ обусловлен образованием наиболее устойчивой и однородной дисперсии по сравнению с другими растворителями (диметилформамид (ДМФА), хлороформ, ацетон, этанол). Водный раствор ХТЗ получали растворением навески 0.0100 г в 5 мл деионизованной воды. Для полировки электродной поверхности использовали деагломерированную суспензию на основе  $0.3\text{ мкм Al}_2\text{O}_3$  и специальный полировальный материал (Allied High Tech Products, США). Для модифицирования поверхности электрода 3 мкл дисперсии СВ наносили капельным методом и сушили под ИК-лампой до полного высыхания.

Для приготовления смеси полимера с темплатом в 1 мл ДМФА растворяли 10 мг полимера и 4 мг Клр. Соотношение полимер—темплат устанавливали экспериментально как оптимальное согласно значениям  $I_p$  и  $s_p$ . Для получения ПМО на поверхность СВ-ХТЗ/СУЭ наносили капельным методом 1 мкл полученного раствора полимера с темплатом, сушили под ИК-лампой в течение 3 мин и удаляли темплат обработкой 1 М раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в течение 90 с при перемешивании. 1 М раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$  для вымывания темплата выбрали как оптимальный согласно значениям  $I_p$  и  $s_p$ . Сенсор с неимпринтированным ПАФ (ни-ПАФ) получали по аналогичной методике, но без добавления темплата.

**Методика эксперимента.** Дифференциально-импульсные вольтамперограммы  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  регистрировали в диапазоне потенциалов от 0 до 0.6 В с амплитудой импульса 0.025 В, шириной импульса 0.05 с, интервалом времени 0.25 с и скоростью развертки 25 мВ/с. Спектры электрохимического импеданса регистрировали в диапазоне частот от 100 кГц до 0.1 Гц с амплитудой 5 мВ. Циклические вольтамперограммы  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  регистрировали в диапазоне потенциалов от -0.1 до 0.6 В со скоростью развертки потенциала 0.1 В/с. Перед регистрацией ДИВ сенсор выдерживали в растворе аналита в течении 40 с для накопления Клр. Все измерения проводили при  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .

**Приготовление растворов.** Раствор 0.5 мМ Клр готовили растворением точной навески реагента

в 25 мл ФБР. Растворы более низких концентраций готовили последовательным разбавлением. Образцы урины получены от здорового донора, плазма крови приобретена в Уфимской Республиканской станции переливания крови. Образцы урины и плазмы крови объемом 2.5 мл центрифугировали в течение 5 мин и разбавляли в 10 раз ФБР с рН 6.86. В полученные растворы добавляли известные количества Клр для получения растворов с концентрацией 5.0 и 0.6 мкМ соответственно.

Образец пробы говяжьего фарша получали из навески 10 г, перемешивали с 10 мл ФБР с известной концентрацией Клр 0.1 мкМ с дальнейшей экстракцией в термостате при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 90 мин, затем пробу выдерживали при  $65 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, после чего центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин [30].

В качестве молочного продукта использовали молоко (жирность 2.5%) объемом 10 мл, которое разбавляли 10 мл ФБР с добавлением Клр в концентрации 0.5 мкМ [30].

Для приготовления всех растворов использовали сверхчистую деионизованную воду с удельной электропроводностью 0.1 мкСм/см.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологию поверхности электродов на каждом этапе модифицирования исследовали методом СЭМ. Рис. 1а показывает, что при нанесении на поверхность СУЭ композита ХТЗ с СВ образуется неоднородный слой, состоящий из частично агломерированных частиц СВ размером до 10 мкм. При увеличении разрешения (рис. 1б) наблюдаются отдельные частицы СВ сферической формы размером от 0.2 до 0.5 мкм. При нанесении ПАФ на модифицированную СВ-ХТЗ поверхность электрода с последующей сушкой под ИК-лампой образуется плотная и равномерная пленка с небольшими неровностями (рис. 1с).

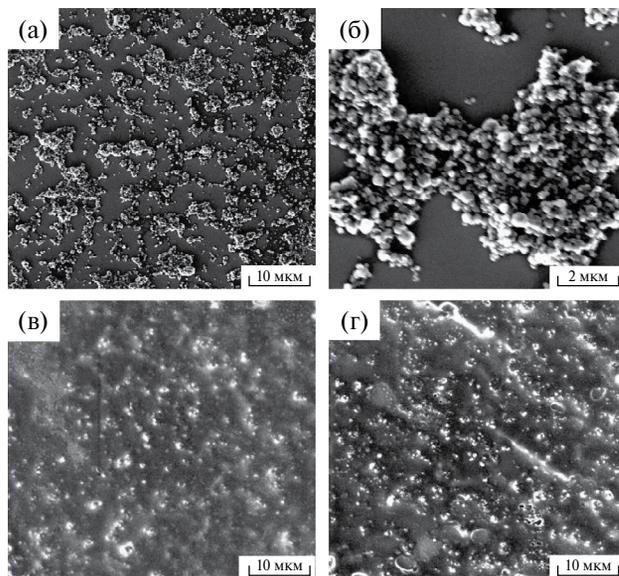


Рис. 1. СЭМ-снимки (а), (б) СВ-ХТЗ/СУЭ, (в) ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ и (г) миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ.

Это подтверждает тот факт, что ПМО, полученные испарением растворителя, имеют плотную однородную структуру из-за постепенного увеличения концентрации полимера в формирующейся пленке. После вымывания темплата из полимера и получения молекулярно импринтированного ПАФ (миПАФ) шероховатость поверхности увеличивается за счет образования пор.

ИК-спектры подтверждают наличие Клр в пленке ПАФ. На рис. 2. представлены ИК-спектры СВ, композита СВ-ХТЗ, ПАФ, Клр и ПАФ до вымывания Клр. В спектре СВ практически нет полос поглощения, кроме небольших валентных колебаний при  $1640\text{ см}^{-1}$ , соответствующих связям С=C [28]. В спектре композита СВ-ХТЗ характерные пики при 1647 и  $1618\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям С=О из —NHCO— и деформационным колебаниям N—H

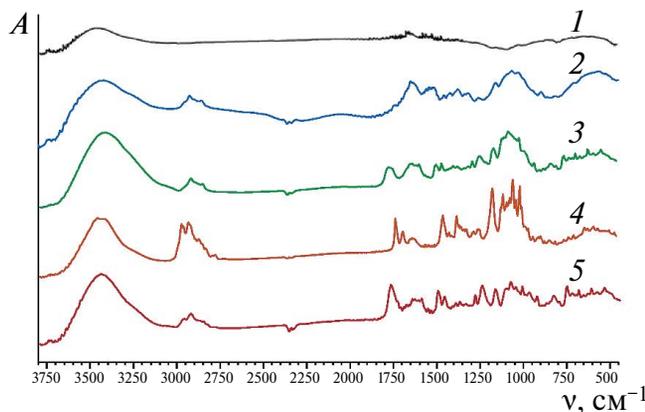
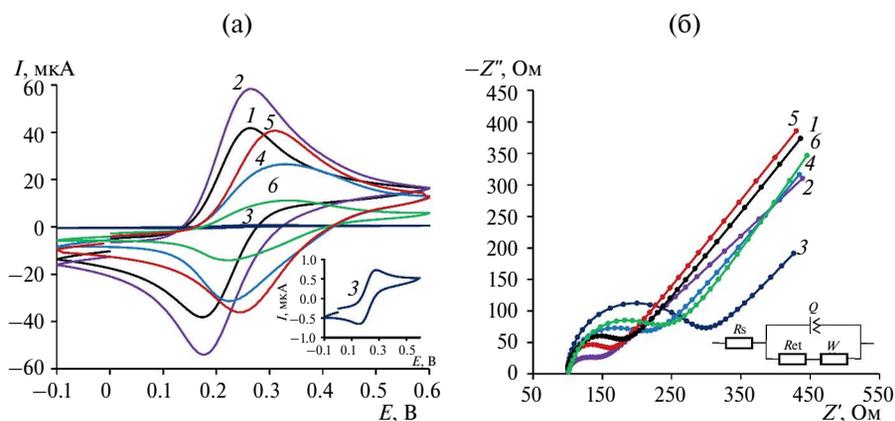


Рис. 2. ИК-спектры графитированной сажи Carboblack C (1), композита графитированная сажа Carboblack C-хитозан (2), полиакрилонитрида (3), кларитромицина (4), комплекса полиакрилонитрида-кларитромицин (5).

группы  $-\text{NH}_2$ . Полосы валентных колебаний  $\text{C}-\text{H}$  и  $\text{C}-\text{N}$  расположены при  $2921\text{ см}^{-1}$ , колебаний  $\text{N}-\text{H}$  в плоскости  $-\text{NHCO}-$  — при  $1377\text{ см}^{-1}$  и полосы  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  — при  $1070\text{ см}^{-1}$  [31]. Характеристическими полосами в спектре ПАФ являются  $1767\text{ см}^{-1}$ , соответствующая фталидной группе,  $727\text{ см}^{-1}$  — группе  $\text{Ar}-\text{S}-\text{Ar}$ ,  $1244\text{ см}^{-1}$  — группе  $\text{Ar}-\text{O}-\text{Ar}$ . Характеристической полосой в спектре Клр является  $1732\text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебанию карбонильной группы лактона, и  $1170\text{ см}^{-1}$ , соответствующая колебанию  $\text{C}-\text{O}$  в лактоне. Данные полосы проявляются в спектрах пленки ПАФ с темплатом, подтверждая наличие Клр.

Электрохимические характеристики на каждом этапе модифицирования электродов изучали методами ЦВ (рис. 3а) и СЭИ (рис. 3б) с использованием стандартной редокс-системы  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Циклические вольтамперограммы 5 мМ растворов  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  на всех электродах описывают типичный обратимый окислительно-восстановительный процесс, характерный для  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Количественные характеристики спектров электрохимического импеданса определяли с использованием эквивалентной схемы Рэндлса (рис. 3б, вставка). Полученные значения представлены в табл. 1, где  $R_s$  и  $R_{ct}$  — сопротивление раствора и переноса электрона соответственно,  $Q$  — элемент постоянной фазы,

$W$  — импеданс Варбурга,  $N$  — шероховатость электродной поверхности [32]. Наибольшие значения токов и, соответственно, наименьшее значение  $R_{ct}$  наблюдали на СВ-ХТЗ/СУЭ (рис. 3, кривая 2) по сравнению с СУЭ (кривая 1). Кроме того, наименьшее значение  $N$  для СВ-ХТЗ/СУЭ свидетельствует, что поверхность данного электрода наиболее шероховатая, что согласуется с СЭМ-снимками. Наименьшие токи и наибольшее  $R_{ct}$  наблюдаются на ПАФ/СУЭ (кривая 3), что подтверждает необходимость использования СВ-ХТЗ. При нанесении на СВ-ХТЗ/СУЭ полимерной пленки ПАФ  $R_{ct}$  увеличивается, а токи уменьшаются (кривая 4) по сравнению с СУЭ, что свидетельствует о замедлении скорости переноса электрона для редокс-пары  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Однако после вымывания Клр из полимера и получения конечного сенсорного слоя (кривая 5)  $R_{ct}$  уменьшается, а токи достигают значений, соответствующих СУЭ, и скорость переноса электрона увеличивается за счет образования в полимере пор, через которые ионы  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  проникают к поверхности электрода. При этом уменьшение  $N$  свидетельствует о том, что поверхность электрода становится более шероховатой. После накопления Клр из раствора с концентрацией 0.3 мМ (кривая 6) токи пика на ЦВ уменьшаются, а  $R_{ct}$  возрастает, подтверждая встраивание Клр.



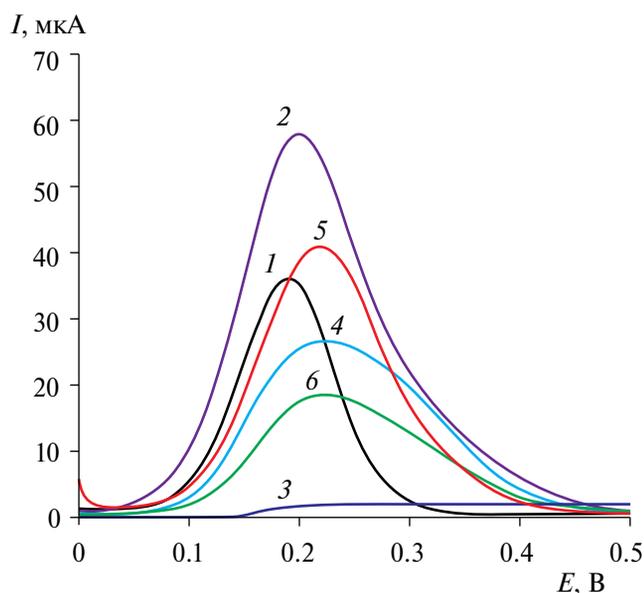
**Рис. 3.** (а) Циклические вольтамперограммы 5 мМ  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  на СУЭ (1), СВ-ХТЗ/СУЭ (2), ПАФ/СУЭ (3), ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (4), миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (5) и миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ после накопления кларитромицина из раствора с концентрацией 0.3 мМ (6); вставка: циклические вольтамперограммы на ПАФ/СУЭ; (б) диаграммы Найквиста соответствующих электродов.

**Таблица 1.** Параметры спектров электрохимического импеданса для разных этапов модифицирования электрода в 5 мМ растворе  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (0.1 М КСл,  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

Электрод	$R_s$ , Ом	$Q$ , мкСм	$N$	$R_{ct}$ , Ом	$W$ , мкСм
СУЭ	$107.7 \pm 2.1$	$13.1 \pm 0.7$	$0.96 \pm 0.01$	$93.0 \pm 3.8$	$427 \pm 8$
СВ-ХТЗ/СУЭ	$102.3 \pm 3.3$	$16.5 \pm 1.0$	$0.76 \pm 0.01$	$53.5 \pm 3.6$	$367 \pm 7$
ПАФ/СУЭ	$105.2 \pm 5.6$	$10.2 \pm 0.8$	$0.92 \pm 0.03$	$208.3 \pm 8.5$	$282 \pm 9$
ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ	$101.6 \pm 6.1$	$12.2 \pm 1.0$	$0.88 \pm 0.02$	$126.4 \pm 4.6$	$211 \pm 6$
миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ	$104.6 \pm 3.6$	$14.9 \pm 0.7$	$0.83 \pm 0.01$	$68.8 \pm 3.8$	$403 \pm 3$
миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ после накопления Клр (0.3 мМ)	$108.3 \pm 3.8$	$13.5 \pm 0.6$	$0.84 \pm 0.02$	$145.5 \pm 4.2$	$310 \pm 6$

Кларитромицин определяли с использованием 5 мМ  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  в качестве зонда, поскольку токи пика окисления самого Клр оказались достаточно низкими и не позволяли определить Клр с высокой чувствительностью. Использование зонда, как правило, значительно увеличивает чувствительность вольтамперометрических ПМО-сенсоров. В данном случае при увеличении концентрации Клр токи пика окисления  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ уменьшается, а аналитическим сигналом служит разность ( $\Delta I_p$ ) между токами пиков окисления  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  до и после инкубирования Клр. На рис. 4 представлены ДИВ 5 мМ  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , полученные на разных этапах модифицирования СУЭ. Полученные результаты соответствуют данным ЦВ и СЭИ.

Для оптимизации состава композита и условий определения Клр изучали зависимости аналитических сигналов и относительного стандартного отклонения от количества СВ в дисперсии, массового соотношения ПАФ : Клр в растворе полимера, времени вымывания темплата



**Рис. 4.** Дифференциально-импульсные вольтамперограммы 5 мМ  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  на СУЭ (1), СВ-ХТЗ/СУЭ (2), ПАФ/СУЭ (3), ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (4), ми ПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ (5) и миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ после накопления кларитромицина из раствора с концентрацией 0.3 мМ (6).

из пленки ПАФ и времени инкубирования Клр на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ перед регистрацией ДИВ (рис. 5). Результаты показали, что при увеличении количества СВ в 1 мл дисперсии с ХТЗ до 3 мг токи пика  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  возрастают (рис. 5а), а наименьшие относительные стандартные отклонения наблюдаются при 1.5 и 2 мг СВ, что, по-видимому, связано с образованием однородного и устойчивого слоя композита СВ-ХТЗ, поэтому в качестве оптимального количества СВ выбрали 2 мг. Зависимость  $\Delta I_p$  от соотношения ПАФ : Клр показала, что наибольший аналитический сигнал и наименьшие погрешности наблюдаются при соотношении 10 : 4 (рис. 5б). Полное вымывание темплата из пленки ПАФ достигается через 90 с выдерживания в 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (рис. 5в). Оптимальное время инкубирования миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ в 0.5 мМ растворе Клр составило 40 с (рис. 5г).

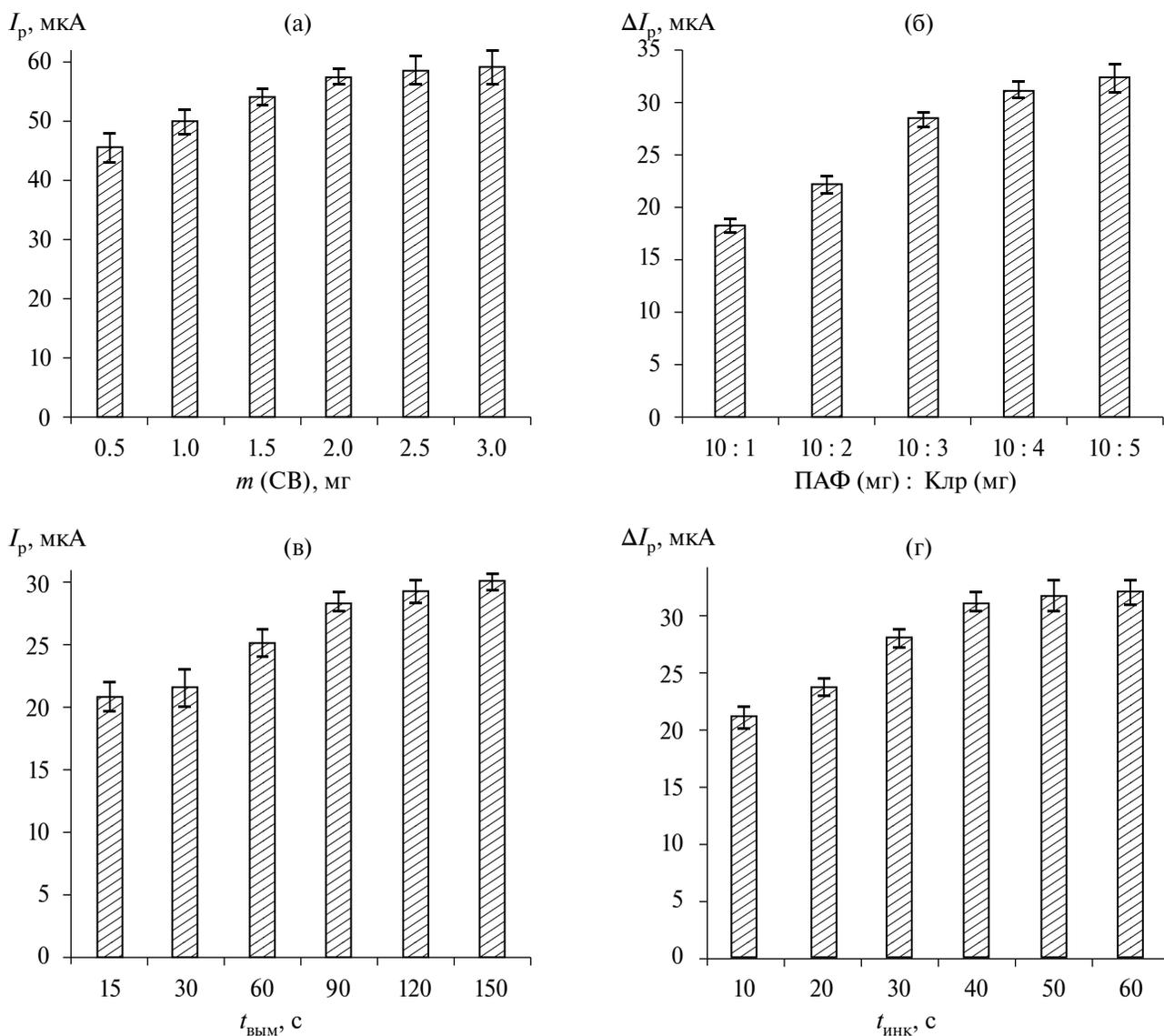
Линейный характер зависимости тока пика от содержания Клр в растворе сохраняется в концентрационном диапазоне  $1 \times 10^{-7}$ – $5 \times 10^{-4}$  М с пределом обнаружения  $5.3 \times 10^{-8}$  М (рис. 6). Кроме того, на рис. 5б показаны линейные зависимости для НИП-сенсоров. Наличие молекулярных отпечатков значительно повышает чувствительность миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ, фактор импринтинга  $F_{\text{имп}} = S_{\text{ПМО}}/S_{\text{НИП}}$  составил 9.88. Эти результаты свидетельствуют о высокой чувствительности и селективности сенсора миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ.

Оценка воспроизводимости и стабильности определения Клр на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ показала, что после 10 последовательных измерений токи пика оставались на уровне 95.8% от исходных значений с относительным стандартным отклонением 2.8%. После 14 дней хранения при комнатной температуре токи пика миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ составили 93.7% от исходного значения с относительным стандартным отклонением 3.9%.

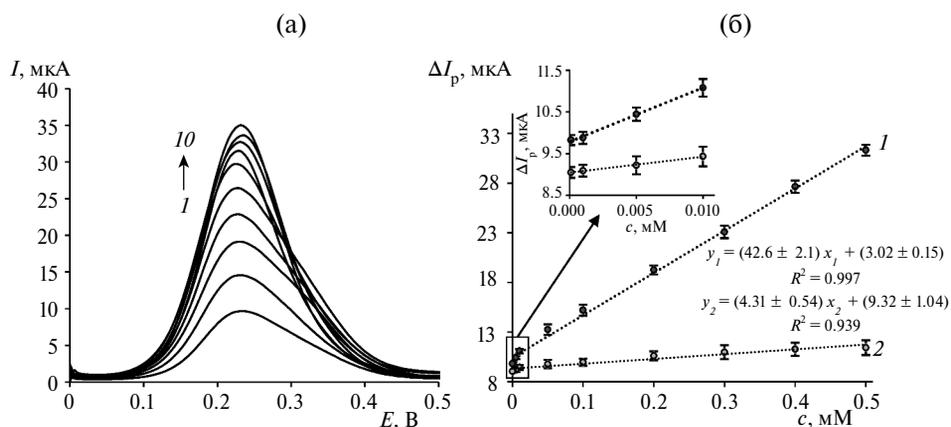
Для оценки правильности определения Клр использовали метод введено–найдено (табл. 2), относительное стандартное отклонение не превышало 2.1 %, что указывает на хорошую воспроизводимость результатов, а значение степени извлечения 98% свидетельствует о правильности результатов определения. Для оценки аналитических возможностей предложенный сенсор апробировали при определении Клр в моче и плазме крови человека. Относительное стандартное от-

**Таблица 2.** Результаты определения кларитромицина с использованием дифференциально-импульсной вольтамперометрии предложенным сенсором с  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  в качестве зонда (20 мВ/с,  $n = 5$ ,  $P = 0.95$ )

Анализируемый образец	Введено, мкМ	Найдено, мкМ	$s_r$ , %	Степень извлечения, %
ФБР	0.50	$0.49 \pm 0.02$	2.1	98
Урина	5.0	$4.8 \pm 0.3$	5.8	96
Плазма крови	0.60	$0.54 \pm 0.08$	9.3	90
Экстракт мяса	0.10	$0.08 \pm 0.01$	9.8	80
Молоко	0.50	$0.46 \pm 0.07$	8.3	92



**Рис. 5.** (а) Зависимость тока окисления  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  на СВ-ХТЗ/СУЭ от количества графитированной сажи Carbolblack C в дисперсии; (б) зависимости  $\Delta I_p$  от массового соотношения полиариленфталид : кларитромицин в растворе полимера, (в) от времени вымывания темплата из пленки полиариленфталида и (г) от времени инкубирования кларитромицина на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ перед регистрацией дифференциально-импульсных вольтамперограмм ( $n = 5, P = 0.95$ ).



**Рис. 6.** (а) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы растворов кларитромицина разной концентрации ( $I - 0.5, 2 - 0.4, 3 - 0.3, 4 - 0.2, 5 - 0.1, 6 - 0.05, 7 - 0.01, 8 - 0.005, 9 - 0.001, 10 - 0.0001$  мМ) на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ; (б) соответствующие градуировочные графики на миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ ( $I$ ) и ниПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ ( $2$ ) ( $n = 5, P = 0.95$ ).

клонение при определении Клр в урине и плазме крови составило 5.8 и 9.3%, а значения степени извлечения — 96 и 90% соответственно. Более высокие погрешности при определении Клр в плазме крови связаны с ее сложным составом и большим содержанием органических структур по сравнению с уриной. Сенсор апробировали также на пищевых продуктах (мясо и молоко). Из-за сложного состава образцов можно было ожидать, что погрешности определения в них Клр будут более высокими. Относительное стандартное отклонение при определении Клр в мясе и молоке составило 9.8 и 8.3%, а значения степени извлечения — 80 и 92% соответственно. Однако данные результаты можно считать приемлемыми и использовать в дальнейшем для анализа. Выбор добавленных концентраций Клр в реальные образцы обусловлен его возможным содержанием в них согласно литературным данным [33–35].

Основной целью разработки миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ являлось повышение селективности сенсора по отношению к Клр. Для оценки влияния на аналитический сигнал Клр выбрали антибиотики азитромицин (Азт) и линкомицин (Лин). Получили ДИВ растворов Азт и Лин одинаковой концентрации (0.5 мМ) с использованием  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  в качестве зонда в тех же условиях. Из рис. 7 видно, что сенсор миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ обладает наибольшей селективностью в отношении Клр по сравнению с Азт и Лин. Это можно объяснить образованием более специфических сайтов связывания.

\*\*\*

Таким образом, для определения Клр разработан высокоселективный вольтамперометрический сенсор на основе СУЭ, модифицированного композитом ХТЗ, графитированной сажи СВ и ПАФ с молекулярными отпечатками кларитромицина, полученными методом инверсии фаз

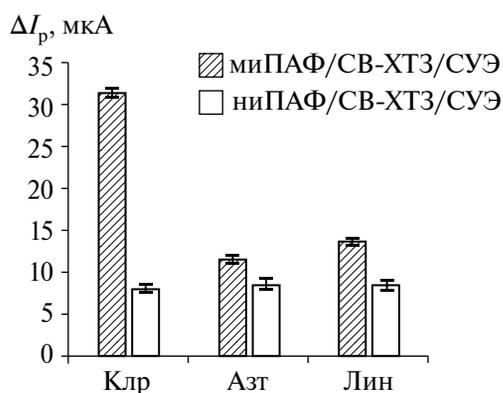


Рис. 7. Отклики миПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ и ниПАФ/СВ-ХТЗ/СУЭ на кларитромицин (0.5 мМ), азитромицин (0.5 мМ) и линкомицин (0.5 мМ) ( $n = 5$ ,  $P = 0.95$ ).

путем испарения растворителя. Большим достоинством сенсора является простота изготовления за счет использования метода сухой инверсии фаз. Методом СЭМ показано образование однородной плотной полимерной пленки на поверхности электрода, а композит ХТЗ и СВ значительно увеличивает токи пиков. Оптимальное время вымывания темплата из пленки ПАФ и инкубирования предложенного сенсора в растворе Клр составило 90 и 40 с соответственно. Показано, что разработанный сенсор обладает высокой селективностью к определяемому антибиотику, а наличие специфических сайтов связывания в полимерной пленке позволяет определять Клр с чувствительностью, практически десятикратно превышающей чувствительность аналогичного сенсора без молекулярных отпечатков. Оценка селективности относительно других антибиотиков (Азт и Лин) показала, что предложенный сенсор обладает высокой селективностью к Клр. Полученный сенсор успешно применен для определения Клр в биологических жидкостях, образцах мяса и молока, степень извлечения составила 90–96, 80 и 92% соответственно, а относительное стандартное отклонение не более 10% во всех случаях.

Авторы выражают благодарность лаборатории синтеза функциональных полимеров УФИЦ РАН под руководством Крайкина В.А. за предоставленные образцы полимера.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (номер гранта 21-73-00295, <https://rscf.ru/en/project/21-73-00295/>).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *BelBruno J.* Molecularly imprinted polymers // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. P. 94. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
2. *Benachio I., Lobato A., Goncalves L.M.* Employing molecularly imprinted polymers in the development of electroanalytical methodologies for antibiotic determination // *J. Mol. Recognit.* 2021. V. 34. P. 2878. <https://doi.org/10.1002/jmr.2878>
3. *Crapnell R.D., Hudson A., Foster C.W., Eersels K., Grinsven B., Cleij T.J. et al.* Recent advances in electrosynthe-

- sized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection // *Sensors*. 2019. V. 19. P. 204. <https://doi.org/10.3390/s19051204>
4. *Wulff G.* Forty years of molecular imprinting in synthetic polymers: Origin, features and perspectives // *Microchim. Acta*. 2013. V. 180. № 15. P. 1359. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-0992-9>
  5. *Yarkaeva Y., Maistrenko V., Dymova D., Zagitova L., Nazrov M.* Polyaniline and poly(2-methoxyaniline) based molecular imprinted polymer sensors for amoxicillin voltammetric determination // *Electrochim. Acta*. 2022. V. 433. Article 141222. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.141222>
  6. *Dmitrienko E.V., Pyshnaya I.A., Martyanov O.N., Pyshnyi D.V.* Molecularly imprinted polymers for biomedical and biotechnological applications // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. P. 513. <https://doi.org/10.1070/RCR4542>
  7. *Poller A.-M., Spieker E., Lieberzeit P.A., Preininger C.* Surface imprints: Advantageous application of ready2use materials for bacterial quartz-crystal microbalance sensors // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. V. 9. P. 1129. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13888>
  8. *Dima S.-O., Meouche W., Dobre T., Nicolescu T.-V., Sarbu A.* Diosgenin-selective molecularly imprinted pearls prepared by wet phase inversion // *React. Funct. Polym.* 2013. V. 73. P. 1188. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.05.014>
  9. *Yang Q., Wu X., Peng H., Fu L., Song X., Li J., Xiong H., Chen L.* Simultaneous phase-inversion and imprinting based sensor for highly sensitive and selective detection of bisphenol A // *Talanta*. 2018. V. 176. P. 595. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.075>
  10. *Mulder M.* Basic Principles of membrane technology. Kluwer: Dordrecht, 1991.
  11. *Wang H.Y., Kobayashi T., Fujii N.* Molecular imprint membranes prepared by the phase inversion precipitation technique // *Langmuir*. 1996. V. 12. P. 4850. <https://doi.org/10.1021/la960243y>
  12. *Noaman U.H., Park J.K.* Optical resolution of phenylalanine using D-Phe-imprinted poly(acrylic acid-co-acrylonitrile) membrane: Racemate solution concentration effect // *Polym. Composite*. 2008. V. 29. P. 949. <https://doi.org/10.1002/pc.20479>
  13. *Tasselli F., Donato L., Drioli E.* Evaluation of molecularly imprinted membranes based on different acrylic copolymers // *J. Membrane Sci.* 2008. V. 320. P. 167. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.03.071>
  14. *Silvestri D., Barbani N., Cristallini C., Giusti P., Ciardelli G.* Molecularly imprinted membranes for an improved recognition of biomolecules in aqueous medium // *J. Membrane Sci.* 2006. V. 282. P. 284. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.05.031>
  15. *Mkhize D.S., Nyoni H., Quinn L.P., Mamba B.B., Msagati T.A.M.* Molecularly imprinted membranes (MIMs) for selective removal of polychlorinated biphenyls (PCBs) in environmental waters: fabrication and characterization // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017. V. 24. P. 11694. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8829-4>
  16. *Kobayashi T., Murawaki Y., Reddy P.S., Abe M., Fujii N.* Molecular imprinting of caffeine and its recognition assay by quartz-crystal microbalance // *Anal. Chim. Acta*. 2001. V. 435. P. 141. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01281-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01281-2)
  17. *Qiu Z., Fan D., Xue X., Guo S., Lin Y., Chen Y., Tang D.* Molecularly imprinted polymer functionalized Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>/Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>TX MXene nanocomposites for photoelectrochemical/electrochemical dual-mode sensing of chlorogenic acid // *Chemosensors*. 2022. V. 10. P. 252. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10070252>
  18. *Reddy P.S., Kobayashi T., Abe M., Fujii N.* Molecularly imprinted Nylon-6 as a recognition material of amino acids // *Eur. Polym. J.* 2002. V. 38. P. 521. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(01\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(01)00212-9)
  19. *Abdel-Shafy H.I., Sayour H.E., Mansour M.S.M.* Molecularly imprinted membrane based on molecularly imprinted nanoparticles polymer for separation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Polym. Adv. Technol.* 2016. V. 27. P. 724. <https://doi.org/10.1002/pat.3704>
  20. *Donato L., Tasselli F., Drioli E.* Molecularly imprinted membranes with affinity properties for folic acid // *Sep. Sci. Technol.* 2010. V. 45. P. 2273. <https://doi.org/10.1080/01496395.2010.510089>
  21. *Barbani N., Rosellini E., Donati M., Costantino P., Cristallini C., Ciardelli G.* Molecularly imprinted polymers by phase inversion technique for the selective recognition of saccharides of biomedical interest in aqueous solutions // *Polym. Int.* 2017. V. 66. P. 900. <https://doi.org/10.1002/pi.5334>
  22. *Ciobanu M., Marin L., Cozan V., Bruma M.* Aromatic polysulfones used in sensor applications // *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2009. V. 22. P. 89
  23. *Kraikin V., Fatykhov A., Gileva N., Kravchenko A., Salazkin S.* NMR study of dyadic and triadic splitting in copoly(arylene)phthalides based on diphenyl oxide and diphenyl sulfide // *Magn. Reson. Chem.* 2020. V. 59. № 1. P. 61. <https://doi.org/10.1002/mrc.5079>
  24. *Салазкин С.Н., Шапошникова В.В., Мачуленко Л.Н., Гилева Н.Г., Крайкин В.А., Лачинов А.Н.* Синтез полиариленфталидов, перспективных в качестве “умных” полимеров // 2008. Т. 50. № 3. С. 399. (*Salazkin S., Shaposhnikova V., Machulenko L., Gileva N., Kraikin V., Lachinov A.* Synthesis of polyarylenephthalides prospective as smart polymers // *Polym. Sci. Ser. A*. 2008. V. 50. № 3. P. 243. <https://doi.org/10.1134/S0965545X08030024>)
  25. *Гилева Н.Г., Крайкин В.А., Седова Э.А., Лобов М.С., Кузнецов С.И., Салазкин С.Н.* Регулирование состава и микроструктуры сополиариленфталидов // *Журн. прикл. химии*. 2005. Т. 78. № 10. С. 1712. (*Gileva N., Kraikin V., Sedova E., Lobov M., Kuznetsov S., Salazkin S.* Control over the composition and mi-

- crostructure of copoly(arylene phthalides) // Russ. J. Appl. Chem. 2005. V. 78. № 10. P. 1683.  
<https://doi.org/10.1007/S11167-005-0586-3>
26. Salikhov R., Zilberg R., Mullagaliev I., Salikhov T., Teres Y. Nanocomposite thin film structures based on polyarylenephthalide with SWCNT and graphene oxide fillers // Mendeleev Commun. 2022. V. 32. P. 520.  
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.07.029>
  27. Yarkaeva Y., Maistrenko V., Zagitova L., Nazyrov M., Berestova T. Voltammetric sensor system based on Cu(II) and Zn(II) amino acid complexes for recognition and determination of atenolol enantiomers // J. Electroanal. Chem. 2021. V. 903. Article 115839;  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115839>
  28. Zagitova L., Yarkaeva Y., Zagitov V., Nazyrov M., Gainanova S., Maistrenko V. Voltammetric chiral recognition of naproxen enantiomers by N-tosylproline functionalized chitosan and reduced graphene oxide based sensor // J. Electroanal. Chem. 2022. V. 992. Article 116774.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116774>
  29. Jafari S., Dehghani M., Nasirizadeh N., Azimzadeh M. An azithromycin electrochemical sensor based on an aniline MIP film electropolymerized on a gold nano urchins/graphene oxide modified glassy carbon electrode // J. Electroanal. Chem. 2018. V. 829. P. 27.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.053>
  30. Шендерович В.А., Пастернак Н.А., Столярова Л.Г., Соловьева В.Е., Власова И.В., Ведьмиа Е.А., Шевелева С.А. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. Методические указания. 29 марта 1995 г. МУК 4.2.026–95.
  31. Jafari M., Tashkhourian J., Absalan G. Chiral recognition of tryptophan enantiomers using chitosan-capped silver nanoparticles: Scanometry and spectrophotometry approaches // Talanta. 2018. V. 178. P. 870.  
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.10.005>
  32. Lasia A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. Springer: New York, 2014. 10.1007/978-1-4614-8933-7
  33. Kul A., Ozdemir M., Sagirl O. Pharmacokinetic study of clarithromycin in human breast milk by UPLC–MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. 2022. V. 208. Article 114438.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114438>
  34. Chu S.-Y., Sennello L.T., Sonders R.C. Simultaneous determination of clarithromycin and 14(R)-hydroxy-clarithromycin in plasma and urine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 1991. V. 571. № 1–2. P. 199.  
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80446-J](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80446-J)
  35. Zuckerman J.M., Qamar F., Bono B.R. Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycolcyclines (tigecycline) // Med. Clin. North Am. 2011. V. 95. № 4. P. 761.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.03.012>

---



---

 ORIGINAL ARTICLES
 

---



---

## VOLTAMMETRIC SENSOR BASED ON A COMPOSITE OF CHITOSAN, GRAPHITIZED CARBON BLACK AND POLYARYLENEPHTHALIDE WITH MOLECULAR IMPRINTS FOR THE DETERMINATION OF CLARITHROMYCIN

Yu. A. Yarkaeva<sup>a</sup>\*, M.I. Nazyrov<sup>a</sup>, D.A. Dymova<sup>a</sup>, and V.N. Maistrenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Chemistry Faculty, Ufa University of Science and Technology, 450076 Ufa, Russia

\*e-mail: julijajarkaeva05@gmail.com

Received April 13, 2023. Revised April 27, 2023. Accepted April 27, 2023

**Abstract.** For selective determination of the antibiotic clarithromycin, a voltammetric sensor based on a glass-carbon electrode modified with a composite of chitosan, Carboblack C graphitized carbon black and polyarylenephthalide containing diphenylene-thio- and diphenylene oxide fragments in the main chain of the polymer in the ratio of 1 : 2 with molecular imprints of clarithromycin obtained by phase inversion method was developed. The composition and morphology of the modifying coating were studied using IR spectroscopy and scanning electron microscopy. The electrochemical and analytical characteristics of the sensor were studied by electrochemical impedance spectroscopy, cyclic and differential-pulse voltammetry. Optimal conditions for analytical signal registration were selected. Using [Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>] as a probe, the linear range of determined concentrations was  $1 \times 10^{-7}$ – $5 \times 10^{-4}$  M with a detection limit of  $5.3 \times 10^{-8}$  M. It is shown that the use of a polymer with molecular imprints of clarithromycin increases the sensitivity of the sensor almost 10 times compared to the non-imprinted polymer. The proposed sensor was tested on samples of urine, blood plasma, as well as food products (meat, milk), the degree of extraction was 90–96, 80 and 92%, respectively, and the relative standard deviation did not exceed 10% in all cases.

**Keywords:** molecular imprinted polymers, polyarylenephthalide, phase inversion, voltammetric sensor, clarithromycin, graphitized carbon black.