

УДК 543.05,543.5

## ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ПОЛИМЕРОВ С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ОТПЕЧАТКАМИ РАКТОПАМИНА

© 2020 г. Т. Н. Ермолаева<sup>а</sup>, О. В. Фарафонова<sup>а, \*</sup>, В. Н. Чернышова<sup>а</sup>,  
А. Н. Зяблов<sup>б</sup>, Н. В. Тарасова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Липецкий государственный технический университет  
ул. Московская, стр. 30, Липецк, 398055 Россия

<sup>б</sup>Воронежский государственный университет  
Университетская площадь, 1, Воронеж, 394018 Россия

\*e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2020 г.

После доработки 12.04.2020 г.

Принята к публикации 30.04.2020 г.

Изучены условия синтеза наночастиц полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) рактопамина методом преципитации. Показано, что размер и дисперсность частиц ПМО в значительной степени определяются природой функционального и кросс-мономеров и условиями синтеза — температурой, скоростью перемешивания, продолжительностью синтеза и ультразвуковой обработкой полимеризационной смеси до и после проведения синтеза. Установлено, что минимальный размер и степень дисперсности имеют частицы ПМО рактопамина на основе метакриловой кислоты и этиленгликольдиметакрилата, обработанные ультразвуком в течение 30 мин. Методом пьезо кварцевого микровзвешивания установлены характеристики распознающего слоя на основе наночастиц ПМО, рассчитаны аналитические характеристики сенсора для определения рактопамина в водном растворе.

**Ключевые слова:** наночастицы полимера с молекулярными отпечатками рактопамина, метод преципитации, пьезоэлектрический сенсор.

DOI: 10.31857/S0044450220100060

Полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО) уже положительно зарекомендовали себя как высокоселективные сорбенты, способные во многих случаях заменить природные антитела при создании диагностических средств для чувствительного распознавания и определения различных химических соединений. В отличие от биомолекул, ПМО стабильны в области низких и высоких значений pH, при изменении давления и температуры, имеют более низкую стоимость, реакция их образования протекает легче, они могут быть синтезированы для широкого диапазона веществ и использоваться как в органических, так и в водных средах. Отмечено, что лучшими свойствами обладают импринтированные полимеры регулярной формы, особенно в наноразмерной области [1], что объясняется более высоким значением отношения площади поверхности к объему. Это улучшает доступность поверхностных отпечатков для молекул аналита и способствует увеличению скорости повторного связывания [2]. Кроме того, наночастицы ПМО легко остаются в растворе и их проще дозировать [3], что создает предпосылки для их широкого применения в сен-

сорах различной природы в качестве заменителей антител в псевдоиммуноанализе [4–7].

Наиболее популярными способами синтеза наночастиц ПМО являются методы микро- и миниэмульсионной полимеризации [8, 9], метод преципитации [10–14], методы синтеза “ядро–оболочка” (core–shell, core–shell by grafting) [15–18] (аналитическое применение наночастиц ПМО, полученных такими методами, описано в работах [19, 20]).

Удобный и простой метод преципитации приводит к получению сферических частиц ПМО высокой степени однородности. В данном методе полимеризация происходит в присутствии большего количества порогенного растворителя. Индивидуально растущие полимерные цепи захватывают олигомеры, мономеры и молекулы темплата из раствора, не коагулируя и не слипаясь между собой, а осаждение происходит лишь при достижении критического размера под действием сил гравитации. Контролируя параметры растворимости полимера и полярность растворителя, можно получать частицы с постоянными струк-

турными порами и неизменными средними значениями размеров в интервале от 0.01 до 1 мкм, а также высоким выходом (>85%) [5, 10]. Полученные методом преципитации полимерные сферы вследствие поперечной сшивки линейных цепочек кросс-мономером защищены от агрегации за счет сил поверхностного натяжения. Диаметр наносфер ПМО, полученных методом преципитации, можно снизить с помощью ультразвуковой обработки полимеризационной смеси.

Несмотря на явные достоинства наносфер ПМО как заменителей антител, разработка сенсоров на их основе началась сравнительно недавно, наиболее активно развиваются пьезоэлектрические сенсоры [21]. В частности, наночастицы ПМО уже положительно себя зарекомендовали при применении в качестве распознающих элементов в пьезоэлектрических сенсорах [22–24]. Однако для определения рактопамина пьезоэлектрические сенсоры на базе наносфер ПМО ранее не использовали.

Рактопамин (**Ракт**) относится к неспецифическим агонистам бета-адренорецепторов и в ряде стран используется в животноводстве как стимулятор роста мышечной массы, что приводит к его аккумуляции в тканях и жировых прослойках и вызывает у людей, потребляющих такую продукцию, токсические реакции, тахикардию и мышечные боли, негативно влияет на половое развитие детей и эндокринное равновесие в организме. В соответствии с решением Комиссии Codex Alimentarius установлены максимальные допустимые уровни (**МДУ**) содержания рактопамина в мясе (свинина и говядина) – 0.01 мг/кг, в печени – 0.04 мг/кг, в почках – 0.09 мг/кг [25, 26]. Несмотря на предложение Объединенного экспертного комитета ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA) установить максимальные остаточные уровни рактопамина для свинины и крупного рогатого скота, в России, ЕС и Китае рактопамин не разрешен к применению в животноводстве и птицеводстве, а импорт продукции, содержащей рактопамин, полностью запрещен. Тем не менее, рактопамин по-прежнему часто можно обнаружить в свинине и кормах.

Известные инструментальные методы анализа не обеспечивают достаточной чувствительности (фотометрия), длительны и требуют использования дорогостоящего оборудования (газовая и жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез). Такие методы малоприменимы для рутинных анализов большого количества образцов пищевых продуктов. Необходимо развитие простых и высокочувствительных методов экспрессного определения остаточных количеств рактопамина в пищевой продукции.

В последние годы в мировой практике для контроля содержания рактопамина в пищевой

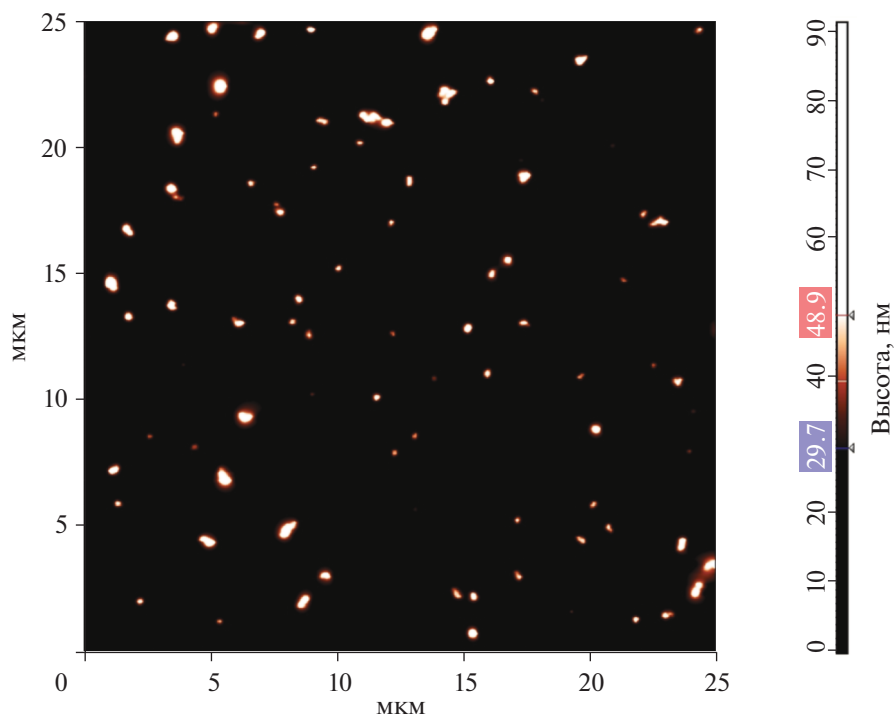
продукции активно используют экспрессные методы иммуноферментного анализа, иммуносенсоры (преимущественно электрохимические и на основе поверхностного плазмонного резонанса), сенсоры на основе ПМО [27–29]. Однако высокая степень сшивки молекулярно импринтированных систем затрудняет передачу электронов и фотонов и приводит к снижению чувствительности и точности обнаружения аналитов с помощью электрохимических и оптических сенсоров. Пьезоэлектрические гравиметрические сенсоры на основе ПМО сочетают преимущества методов молекулярного импринтинга и пьезоэлектрического детектирования и поэтому развиваются более активно. Разработан пьезоэлектрический сенсор на основе молекулярно импринтированных рактопамино силианов [30], но наночастицы ПМО рактопамина, полученные методом преципитации, ранее в пьезоэлектрических сенсорах не использовались.

Цель настоящей работы – изучение условий синтеза наночастиц ПМО рактопамина методом преципитации и формирования распознающего покрытия пьезоэлектрического сенсора для определения рактопамина в жидких средах.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и оборудование.** Для синтеза наночастиц ПМО применяли следующие реагенты: в качестве функционального мономера – метакриловую кислоту (**МК**), метилметакрилат (**ММА**), 4-винилпиридин (**4-ВП**) (Sigma-Aldrich, Великобритания); кросс-мономера – этиленгликольдиметакрилат (**ЭГДМА**) (Вектон, Россия), дивинилбензол (**ДВБ**), триметилпропантриметакрилат (**ТПТА**) (Sigma-Aldrich, Великобритания); инициатора полимеризации – азобисизобутиронитрил (Лабтех, Россия); темплата – рактопамина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, Великобритания). Для исследования перекрестного реагирования сенсора использовали салбутамол, (Sigma-Aldrich, Великобритания), кленбутерола гидрохлорид, (Abscam, Великобритания), пенициллин G, (Биохимик, Россия), цефотаксим (Борисовский завод медицинских препаратов, Россия). Растворители: ацетонитрил, толуол (Вектон, Россия), тетрагидрофуран (Sigma-Aldrich, Великобритания), этиловый спирт, х. ч. (Метафракс, Россия), конц.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (База № 1 химреактивов, Россия). Для иммобилизации использовали цианоакрилат.

**Синтез наночастиц полимера с молекулярными отпечатками рактопамина методом преципитации** проводили в круглодонной колбе, снабженной механической мешалкой. Хлорид рактопамина, функциональный мономер, кросс-мономер, взятые в соотношении 1 : 1 : 5, растворяли в 25 мл порогенного растворителя ацетонитрил–толуол (4 : 1, по объему). Предполимеризационную смесь об-



**Рис. 1.** АСМ-изображения частиц полимера с молекулярными отпечатками метакриловой кислоты–этиленгликольди-метакрилат.

рабатывали ультразвуком в течение 2 мин (ультразвуковая ванна ПСБ-2835-03; ПСБ-Галс, Россия) с частотой 40 кГц, переносили в термостатируемую водяную баню, добавляли инициатор полимеризации и проводили полимеризацию при постоянном перемешивании со скоростью 30 об/мин. После окончания синтеза коллоидный раствор частиц ПМО обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин.

**Синтез неимпринтированных полимерных (НИП) наночастиц** проводили по аналогичной методике без применения рактопамина.

Для изучения закономерностей процесса полимеризации и свойств импринтированного полимера использовали данные, полученные методами пьезокварцевого микровзвешивания, инфракрасной спектроскопии (ИК-спектрометр Shimadzu Iaffinity-1, Япония) и оптической микроскопии (микроскоп DigiMicro Skale, DNT, Германия). Размер наносфер ПМО и НИП устанавливали с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (Нанотехнология-МДТ, Россия) в полуконтактном режиме на воздухе со скоростью сканирования 1.34 Гц, с использованием кантилеверов NSGO 1/20 из кремния с номинальной жесткостью 5 Н/м, с резонансной частотой сканирования в диапазоне 120–180 кГц и радиусом закругления 10 нм. С помощью программы Nova с применением функции Grain Analysis устанавливали размеры отдель-

ных частиц ПМО, локализованных на различных участках графитовой подложки. Дисперсность частиц оценивали по величине доверительного интервала среднего диаметра, рассчитанного для каждой партии наночастиц ПМО (рис. 1).

**Иммобилизация наночастиц полимера с молекулярными отпечатками на поверхности электрода сенсора.** К 5 мл раствора цианоакрилата (2 мг/мл) в тетрагидрофуране добавляли 6 мг частиц ПМО (до удаления темплата). Полученную смесь гомогенизировали в ультразвуковой ванне в течение 3 мин. Затем 2 мл полученной суспензии наносили в виде капли в центр предварительно обезжиренного ацетоном и промытого ацетонитрилом электрода пьезокварцевого резонатора, вращающегося со скоростью 900 об/мин, и проводили иммобилизацию частиц ПМО способом “spin-coating” [31] в течение 1–2 мин, контролируя однородность слоя методом оптической микроскопии. Нанесение суспензии повторяли до получения однородного слоя.

В качестве сенсоров применяли пьезокварцевые резонаторы АТ-среза с собственной частотой колебаний 10 МГц, 8 мм в диаметре с золотыми электродами диаметром 5 мм на двух сторонах (ЭТНА, Россия). Для измерения аналитического сигнала использовали установку, включающую генератор колебаний Б5-30 и цифровой модуль Дискон (Бафика, Россия), соединенный с персональным компьютером. Аналитический сигнал

сенсора измеряли в статическом режиме после высушивания покрытия до постоянной массы (метод “dip & dry”).

Для удаления молекул темплата с поверхности частиц ПМО, иммобилизованных на электроде, сенсор погружали в 75 мл регенерирующего раствора и выдерживали в течение фиксированного времени при постоянном перемешивании. Затем высушивали в потоке теплого воздуха до постоянной массы. В качестве регенерирующего раствора применяли бидистиллированную воду (раствор 1), 25%-ный раствор уксусной кислоты (раствор 2), смесь этилового спирта и уксусной кислоты (25%) (9 : 1, по объему) (раствор 3).

Распознающий слой на основе наночастиц ПМО характеризовали методом пьезокварцевого микровзвешивания аналогично описанному в работах [22, 31]. В качестве аналитического сигнала использовали изменение частоты колебаний после высушивания сенсора до постоянной массы на воздухе до и после формирования пленки на основе наночастиц ПМО, после встраивания в молекулярные отпечатки и удаления молекул рактопамина.

Массу полимерного покрытия сенсора  $m$  рассчитывали по уравнению Зауэрбрея:  $\Delta F = -2.3 \times 10^6 F_0^2 m / S$ , где  $S$  – площадь электрода пьезокварцевого сенсора ( $0.10 \text{ cm}^2$ ),  $F_0$  – базовая частота резонатора, Гц. Аналитический сигнал сенсора измеряли относительно сенсора сравнения на основе НИП:  $\Delta F_{\text{ан}} = \Delta F_{\text{ПМО}} - \Delta F_{\text{НИП}}$ , массу извлеченного ( $\Delta m_{\text{ПМО}}$ ) и повторно встроенного рактопамина ( $\Delta m_{\text{ПВС(Ракт)}}$  и  $\Delta m'_{\text{ПВС(Ракт)}}$ ) определяли по разности между массой слоя ПМО до и после извлечения темплата; концентрацию поверхностных отпечатков рактопамина на поверхности слоя наночастиц ПМО ( $R_{\text{max}}$ ) и отпечатков после регенерации поверхности ( $R'$ ) рассчитывали, как  $R = m_{\text{ВС}} / (SM_{\text{Ракт}})$ , мкмоль/см<sup>2</sup> [31]. Селективность распознающего слоя оценивали по коэффициентам перекрестного реагирования:  $\text{CR, \%} = \Delta F_{\text{меш}} / \Delta F_{\text{Ракт}}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Условия синтеза наночастиц полимера с молекулярными отпечатками рактопамина.** Размер, дисперсность и степень импринтинга частиц ПМО в значительной степени определяются природой функционального и кросс-мономеров, порогеного растворителя и условиями синтеза – температурой, скоростью перемешивания, продолжительностью синтеза и ультразвуковой обработкой полимеризационной смеси до и после проведения синтеза. Эффективное нековалентное взаимодействие между темплатом и функциональным мономером, а также стабильность предполимеризационного комплекса определяет аффин-

ность ПМО и селективность последующего распознавания молекул темплата. Ранее отмечено [23], что наилучшие результаты при синтезе наносфер ПМО методом преципитации достигнуты при применении в качестве функциональных мономеров МК, ММА и 4-ВП, что объясняется их способностью к образованию водородных связей с молекулами разнообразных темплатов, а в качестве кросс-мономеров – ЭГДМА, ТПТА и ДВБ, обеспечивающих стабильность полимерной матрицы и сайтов импринтинга, а также влияющих на размер наночастиц ПМО и их количество. Для инициирования процесса свободнорадикальной полимеризации в качестве инициатора выбран азобисизобутиронитрил, эффективно работающий в интервале 60–75°C и хорошо растворимый в порогенном растворителе. При выборе растворителя учитывали растворимость в нем всех компонентов. Проведенные ранее исследования показали, что применение смеси ацетонитрил–толуол (4 : 1, по объему) приводит к получению частиц минимального размера.

В ходе эксперимента получили частицы ПМО рактопамина на основе МК, 4-ВП и ММА с применением в качестве кросс-реагентов ЭГДМА, ТПТА и ДВБ (табл. 1).

Результаты исследования методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) показали, что минимальный диаметр имеют частицы ПМО на основе МК–ЭГДМА (рис. 1), в отличие от ПМО-частиц на основе 4-ВП–ЭГДМА (рис. 2а), которые располагаются на плоскости при сканировании в виде цепей и различных скоплений. Кроме того, такие частицы неустойчивы для дальнейшего применения. Они диссоциируют на полидисперсные агрегаты при их растворении в тетрагидрофуране при иммобилизации на поверхности электрода сенсора. Частицы ПМО на основе ММА–ЭГДМА (рис. 2б) представляют собой крупные конгломераты неправильной формы с высокой степенью дисперсности, что затрудняет их дальнейшее применение в пьезоэлектрических сенсорах в качестве “искусственных антител”.

При синтезе частиц ПМО на основе МК с применением ЭГДМА, ДВБ и ТПТА только в первом случае образуются монодисперсные наносферы, тогда как при использовании ДВБ и ТПТА частицы имеют гелеобразную структуру (в виде капель, выпуклостей на поверхности подложки). Наличие в молекуле ТПТА трех алкильных групп, а в молекуле ДВБ двух винильных групп способствует получению более рыхлой структуры ПМО, облегчающей связывание молекул шаблона, однако одновременно это приводит к чрезмерному увеличению количества поверхностных отпечатков и размера частиц, что ограничивает их применение в качестве “искусственных антител”. В то же время использование в качестве кросс-реагента

**Таблица 1.** Синтез полимеров с молекулярными отпечатками рактопамина методом преципитации

№ ПМО	Мономер	Кросс-мономер	<i>t</i> , ч	<i>T</i> , °С	<i>v</i> , об/мин	УЗ*, мин	Диаметр, мкм
1	МК	ЭГДМА	3	60	30	2	0.034 ± 0.005
2	4-ВП	То же	3	60	30	2	0.06 ± 0.01
3	ММА	»	3	60	30	2	1.5 ± 0.3
4	МК	ДВБ	3	60	30	2	2.1 ± 0.4
5	То же	ТПТА	3	60	30	2	1.3 ± 0.2
6	»	ЭГДМА	6	60	30	2	0.65 ± 0.06
7	»	То же	3	40	30	2	0.25 ± 0.03
8	»	»	3	80	30	2	1.1 ± 0.1
9	»	»	3	60	30	15	0.7 ± 0.1
10	»	»	3	60	100	2	1.5 ± 0.2
11	»	»	3	60	240	2	1.7 ± 0.1

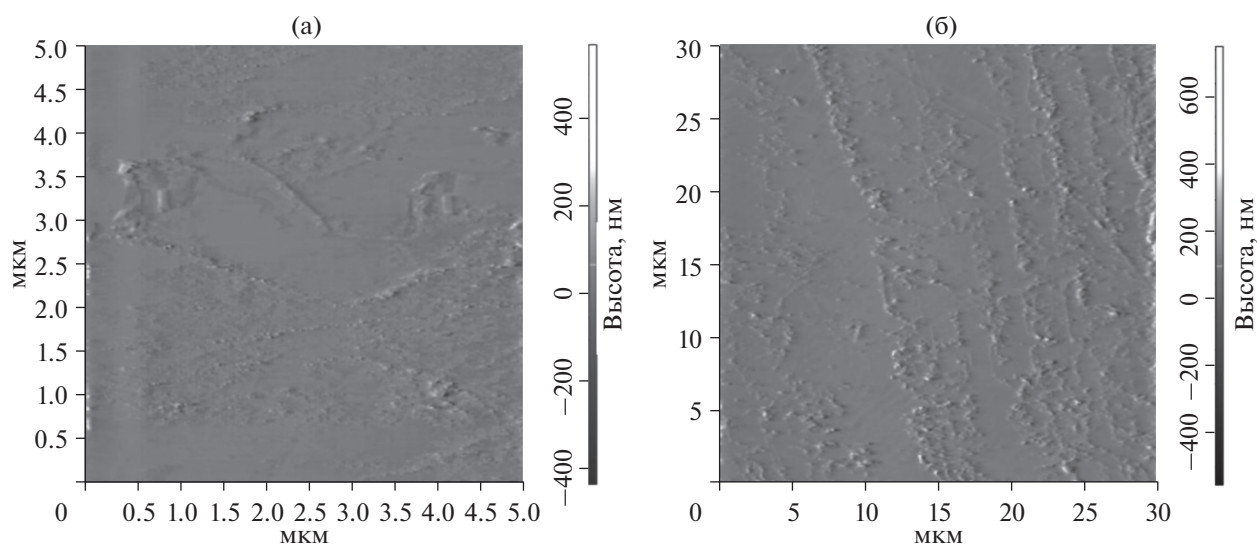
\* УЗ-обработка до синтеза, мин.

ЭГДМА способствует синтезу частиц минимального размера вследствие образования линейных мостиков меньшей длины.

Размером синтезируемых частиц можно управлять, изменяя скорость перемешивания, продолжительность синтеза и температуру предполимеризационной смеси. Проведение синтеза частиц ПМО рактопамина на основе МК–ЭГДМА при перемешивании со скоростью 30, 100 и 250 об/мин показало, что увеличение скорости перемешивания приводит не только к росту диаметра частиц ПМО в 45–50 раз, но и к образованию гелеобразных или рыхлых частиц неправильной формы по сравнению с частицами, полученными при скорости 30 об/мин. Аналогично на диаметр синтезируемых частиц ПМО влияет уве-

личение продолжительности синтеза с 3 до 6 ч, что объясняется образованием большего количества олигомеров и, следовательно, поглощением больших концентраций функционального и кросс-мономеров. При этом существенно увеличивается размер частиц МК–ЭГДМА с  $34 \pm 5$  до  $650 \pm 55$  нм, а также полидисперсность.

Изменяя температуру полимеризационной смеси, можно влиять на скорость отдельных стадий синтеза и стабильность предполимеризационного комплекса за счет увеличения либо уменьшения кинетической энергии системы [32]. В ходе эксперимента получили частицы ПМО рактопамина на основе МК–ЭГДМА при 400, 600 и 800°С. Методом сканирования АСМ установлено, что при 400°С невозможно получить стабиль-



**Рис. 2.** АСМ-изображения частиц полимера с молекулярными отпечатками 4-винилпиридин–этиленгликольдиметакрилат (а) и метакриловая кислота–этиленгликольдиметакрилат (б).

**Таблица 2.** Влияние продолжительности ультразвуковой обработки предполимеризационной смеси и частиц полимера с молекулярными отпечатками метакриловая кислота–этиленгликольдиметакрилат на их диаметр

№	УЗ-обработка, мин	Средний диаметр частиц, мкм
УЗ-обработка частиц ПМО		
1	15	$0.9 \pm 0.1$
2	30	$0.034 \pm 0.005$
УЗ-обработка предполимеризационной смеси		
3	2	$0.034 \pm 0.005$
4	15	$0.7 \pm 0.1$

ные монодисперсные сферические ПМО-частицы из-за низкой скорости полимеризации за один и тот же промежуток времени (3 ч), что, несомненно, сказывается на структуре частиц ПМО. При 800°C получили ПМО-частицы в “сухом” виде, в виде “порошка”, в отличие от всех других образцов полимеров, полученных в виде суспензий. Полученные при этой температуре частицы имеют правильную четкую сферическую форму, однако их недостатком является сравнительно большой диаметр по сравнению с частицами, полученными при 600°C, и их относительная полидисперсность – диаметр отдельных сфер достигает 2 мкм.

Известно, что применение ультразвука после окончания синтеза существенно уменьшает размер частиц и их полидисперсность, а предварительная обработка предполимеризационной смеси ультразвуком способствует удалению из нее кислорода, ингибирующего процесс полимеризации частиц ПМО. В ходе эксперимента увеличили продолжительность УЗ-обработки предполимеризационной смеси с 2 до 15 мин, а также исследовали влияние ультразвука на размер сформированных частицы МК–ЭГДМА. Показано, что увеличение продолжительности обработки ультразвуком предполимеризационной смеси до 15 мин приводит к образованию частиц ПМО большего размера и рыхлой неоднородной структуры по сравнению с частицами, полученными при обработке в течение 2 мин. Ультразвуковая обработка частиц ПМО после синтеза, напротив, существенно уменьшает размер частиц (табл. 2).

**Изучение структуры наночастиц полимера с молекулярными отпечатками рактопамина методом ИК-спектроскопии.** Для выявления характера связей, образующихся при синтезе ПМО, установления функциональных групп, участвующих в неспецифическом взаимодействии с молекулой темплата, сопоставили ИК-спектры функционального мономера (МК) и рактопамина со спектрами ПМО и НИП. Уширение и смещение пика карбонильных групп метакриловой кислоты в ко-

ротковолновую область в спектрах ПМО с 1697 до 1728  $\text{см}^{-1}$ , а также уширение пиков гидроксильных групп (945–941  $\text{см}^{-1}$ ) свидетельствует об их участии в образовании водородных связей с молекулой рактопамина при формировании предполимеризационного комплекса (рис. 3). Аналогичный сдвиг и уширение пика группы –СООН в спектре НИП может говорить об участии карбонильной группы не только во взаимодействии с рактопамином, но и при полимеризации.

В спектрах ПМО и рактопамина имеется полоса спиртовой группы –С–ОН (1056–1053  $\text{см}^{-1}$ ), которая отсутствует в спектре НИП, что указывает на присутствие рактопамина в полимерной матрице импринтированных частиц. Уширение линии –С–ОН в спектре ПМО подтверждает участие гидроксильных групп в образовании водородных связей с функциональным мономером. Только в ИК-спектре ПМО наблюдается линия группы –NH– (1512  $\text{см}^{-1}$ ) и 1,4-замещенной ароматической (фенольной) группы –С<sub>6</sub>H<sub>4</sub>–ОН (1220–1170  $\text{см}^{-1}$ ), которые характерны для рактопамина. Смещение частоты колебаний группы –NH– в коротковолновую область в полимере по сравнению с чистым рактопамином свидетельствует об ее участии в образовании водородных связей. При полимеризации в присутствии кросс-мономера комплексы мономеров с темплатом фиксируются в определенных позициях жесткой полимерной структуры за счет образования поперечных связей, а удаление молекулы темплата путем экстракции органическим растворителем приводит к появлению в полимере молекулярных отпечатков, комплиментарных молекуле темплата.

**Сорбция и регенерация слоя сенсора на основе наночастиц полимера с молекулярными отпечатками рактопамина методом пьезокварцевого микровзвешивания.** Наночастицы ПМО МК–ЭГДМА в растворе цианоакрилата в тетрагидрофуране до удаления из них молекул темплата иммобилизовали на поверхности золотого электрода сенсора. Для многократного применения сенсора для определения рактопамина необходимо выбрать состав регенерирующего раствора, в максимальной степени и с высокой скоростью удаляющего темплат из полимерной матрицы и не оказывающего разрушающего воздействия на конфигурацию молекулярных отпечатков.

Экспериментально установлена продолжительность удаления в максимальной степени и встраивания темплата в полимерную матрицу, позволяющая получить воспроизводимые результаты. Отмечено, что при использовании бидистиллированной воды (раствор 1) и 25%-ного раствора уксусной кислоты (раствор 2) в качестве регенерирующих растворов наибольшее количество рактопамина удаляется в первые 1–2 мин, а далее пленка начинает набухать и связывать воду.

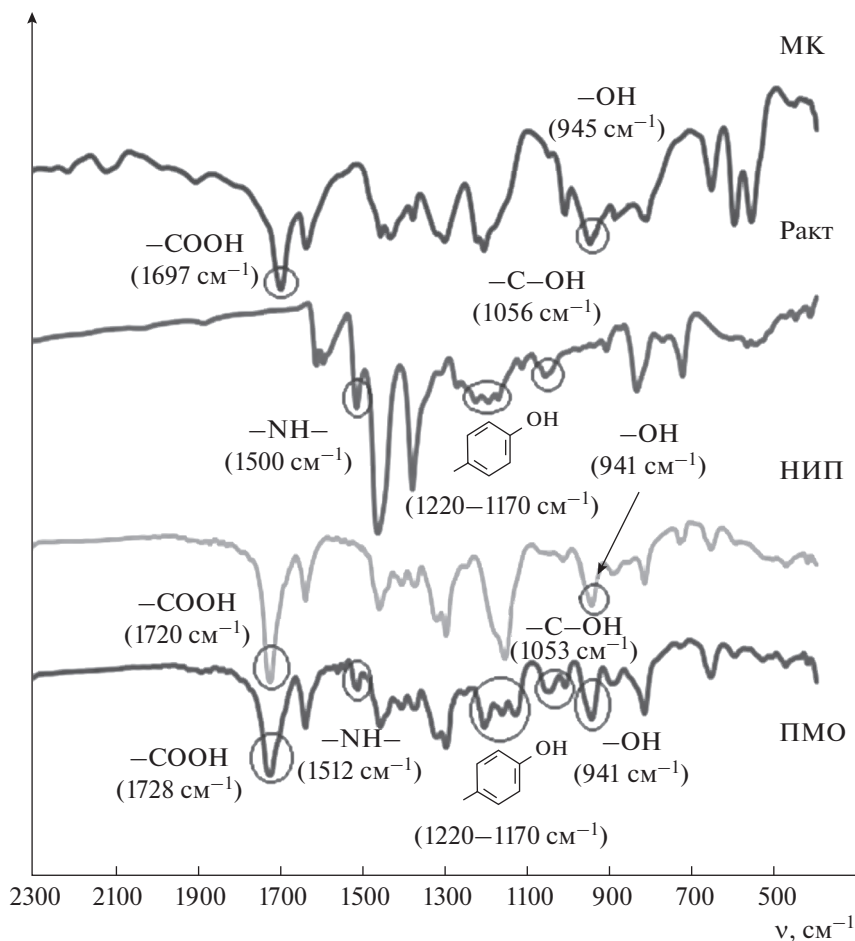


Рис. 3. ИК-спектры метакриловой кислоты, рактопамина, полимера с молекулярными отпечатками и неимпринтированного полимера.

Повторное встраивание молекул темплата не наблюдается, возможно, из-за эффекта “затирания отпечатков”, а также из-за заполнения отпечатков молекулами воды. И только при использовании раствора 3 за 16 мин происходит практически полное удаление темплата с поверхности частиц ПМО, поэтому для дальнейших исследований выбрали этот регенерирующий раствор.

Для последующего использования слоя ПМО для определения рактопамина необходимо установить продолжительность повторного встраивания молекул темплата в молекулярные отпечатки. Установлено, что максимальное количество рактопамина 0.82 мкг встраивается за 3 мин (рис. 4), а при дальнейшем контакте слоя ПМО с раствором рактопамина масса полимерной пленка уменьшается.

Характеристики пьезоэлектрического сенсора на основе ПМО (табл. 3) свидетельствуют о возможности его применения для определения рактопамина в жидких средах.

Сравнение масс встроенного рактопамина при повторной и последующей сорбции показывает, что они различаются незначительно ( $\Delta m_{\text{ПВС(Ракт)}} =$

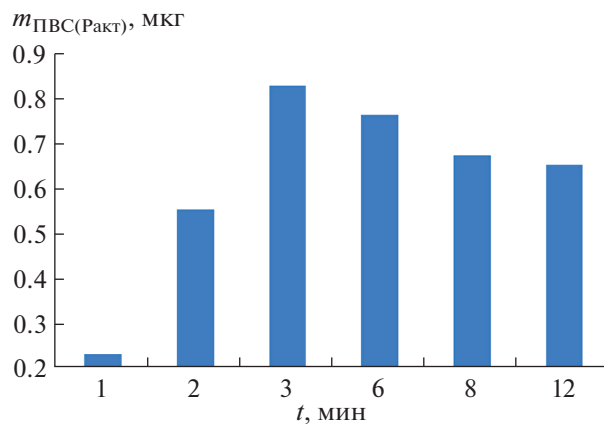


Рис. 4. Зависимость массы встроенного в молекулярные отпечатки рактопамина от продолжительности контакта с водным раствором.

**Таблица 3.** Характеристика ПМО-сенсора на основе полимерных частиц метакриловая кислота–этиленгликольдиметакрилат

Характеристика	Значение
Уравнение градуировочной функции	$\Delta F = 1.2c + 64.7$
Линейный диапазон функции, мкг/мл	15.6–1000
Коэффициент корреляции	0.97
Предел обнаружения, мкг/мл	12.0
$m_{\text{ПМО}}$ , мкг	3.2
$\Delta m_{\text{ВС(Ракт)}}$ , мкг	$1.03 \pm 0.12$
$R$ , ммоль/см <sup>2</sup>	3.04
$\Delta m_{\text{ПВС(Ракт)}}$ , мкг	$0.71 \pm 0.08$
$\Delta m'_{\text{ПВС(Ракт)}}$ , мкг	$0.69 \pm 0.05$
$R'$ , ммоль/см <sup>2</sup>	2.08
$R''$ , ммоль/см <sup>2</sup>	2.04
$\Delta F_{\text{ПМО}}/\Delta F_{\text{НИП}}$	6

**Таблица 4.** Оценка селективности определения рактопамина с помощью коэффициента кросс-реактивности  $CR'$ , % (концентрация аналитов 1 мг/мл)

Аналит/молярная масса, г/моль	$CR'$ , %
Рактопамин/337.84	100
Кленбутерол/277.19	12.76
Сальбутамол/239.31	13.75
Пенициллин G/334.39	2.63
Цефотаксим/477.46	5.67

$= 0.71 \pm 0.08$  и  $\Delta m'_{\text{ПВС(Ракт)}} = 0.69 \pm 0.05$  мкг) и существенно меньше массы рактопамина ( $1.0 \pm 0.1$  мкг), включенного в структуру ПМО при синтезе. Также несущественны различия в концентрациях молекулярных отпечатков, рассчитанных после повторного и последующего встраивания молекул темплата  $R'$  (2.08 ммоль/см<sup>2</sup>) и  $R''$  (2.04 ммоль/см<sup>2</sup>). Следовательно, только после второго цикла сорбции–десорбции формируется постоянное количество молекулярных отпечатков, удобно расположенных для повторного встраивания молекул темплата. В то же время при первоначальной регенерации поверхности частиц происходит, вероятно, частичное разрушение полимерных структур, прилегающих к отпечатку, что объясняет более высокое значение  $\Delta m_{\text{ВС(Ракт)}} = 1.03$  мкг, установленное методом пьезокварцевого микровзвешивания.

Величина соотношения  $\Delta F_{\text{ПМО}} : \Delta F_{\text{НИП}} = 6 : 1$  позволяет сопоставить вклад в аналитический сигнал сенсора специфических и неспецифических взаимодействий.

**Селективность частиц полимера с молекулярными отпечатками МК–ЭГДМА** рактопамина, иммобилизованных на поверхности электрода пьезокварцевого сенсора, оценивали с помощью коэффициента кросс-реактивности  $CR$ , % (табл. 4).

Выявлена высокая селективность ПМО по отношению к рактопамину в присутствии кленбутерола и сальбутамола, относящихся, как и рактопамин, к группе бета-агонистов и имеющих родственное строение. Селективность в присутствии пенициллина и цефотаксима также высока и указывает на возможность определения рактопамина в присутствии равных и даже превышающих концентраций антибиотиков. В случае присутствия в пробе целевого и мешающих соединений в концентрациях 1 мг/мл и ниже возможно селективное определение рактопамина в присутствии бета-агонистов (кленбутерола и сальбутамола) и бета-лактамов (пенициллина и цефотаксима). И только при значительном (10-кратном) избытке кленбутерола и сальбутамола в аналитической пробе они будут мешать определению рактопамина.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-03-97505-р\_центр\_а) “Селективность и эффективность молекулярного распознавания и определения гормонов и бета-агонистов с помощью пьезокварцевого иммуно- и биомиметического сенсора”.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vaihinger D., Landfester K., Kräuter I., Brunner H., Toivar G.E.M.* Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation // *Macromol. Chem. Phys.* 2002. V. 203. № 13. P. 1965.
2. *Poma A.* MIPs nanoparticles // *Bionanotechnology Laboratory: BioNanoTech.* 2005. P. 1.
3. *Poma A., Turner A. P.F., Piletsk S.A.* Advances in the manufacture of MIP nanoparticles // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 203. P. 629.
4. *Zhu H., Wang Y., Yuan Y., Zeng H.* Development and characterization of molecularly imprinted polymer microspheres for the selective detection of kaempferol in traditional Chinese medicines // *Anal. Methods.* 2010. V. 10. P. 139.
5. *Yoshimatsu K., Reimhult K., Krozer A., Mosbach K., Ye L.* Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: the control of particle size suitable for different analytical applications // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 584. P. 112.
6. *Ye L., Haupt K.* Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery // *Anal. Chem.* 2004. V. 378. P. 1887.
7. *Baggiani C., Anfossi L., Giovannoli C.* Molecular imprinted polymers as synthetic receptors for the analysis of myco- and phyco-toxins // *Analyst.* 2008. V. 133. P. 719.
8. *Ермолаева Т.Н., Чернышова В.Н., Бессонов О.И.* Микро- и наночастицы полимеров с молекуляр-



- ными отпечатками – синтез, характеристика и применение в пьезокварцевых сенсорах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2015. Т. 15. № 3. С. 345.
9. Avila M., Zougagh M., Rios A. Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules // Trends Anal. Chem. 2008. V. 27. № 1. P. 54.
  10. Lai J.-P., Yang M.-L., Niessner R., Knopp D. Molecularly imprinted microspheres and nanospheres for di(2-ethylhexyl)phthalate prepared by precipitation polymerization // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 389. № 2. P. 405.
  11. Li P., Rong F., Yuan C. Morphologies and binding characteristics of molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization // Polym. Int. 2003. V. 52. № 12. P. 1799.
  12. Xu Sh., Li J., Chen L. Molecularly imprinted polymers by reversible addition–fragmentation chain transfer precipitation polymerization for preconcentration of atrazine in food matrices // Talanta. 2011. V. 85. P. 282.
  13. Abouzarzadeh A., Forouzani M., Jahanshahi M., Bahramifar N. Synthesis and evaluation of uniformly sized nalidixic acid–imprinted nanospheres based on precipitation polymerization method for analytical and biomedical applications // J Mol. Recog. 2012. V. 25. P. 404.
  14. Pardeshi S., Dhodapkar R., Kumar A. Molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared using precipitation polymerization method for selective extraction of gallic acid from *Emblca officinalis* // Food Chem. 2013. V. 33. P. 239.
  15. Barahona F., Turiel E., Cormack P.A.G., Martin-Esteban A. Chromatographic performance of molecularly imprinted polymers: Core-shell microspheres by precipitation polymerization and grafted MIP films via iniferter-modified silica beads // J. Polym. Sci. Part A – Polym. Chem. 2010. V. 48. P. 1058.
  16. Barahona F., Turiel E., Cormack P. A. G., Martin-Esteban A. Synthesis of core-shell molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerisation for the in-line molecularly imprinted solid-phase extraction of thiabendazole from citrus fruits and orange juice samples // J. Sep. Sci. 2011. V. 34. P. 217.
  17. Pérez N., Mayes A.G. Noncovalent imprinting in the shell of core-shell nanoparticles // Langmuir. 2004. V. 20. P. 3775.
  18. Lu C.H., Wang Y., Li Y., Yang H.H., Chen X., Wang X.R. Bifunctional superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer core–shell nanoparticles // J. Mater. Chem. 2009. V. 19. P. 1077.
  19. Arenas L.F., Ebarvia B.S., Sevilla F.B. Enantioselective piezoelectric quartz crystal sensor for d-methamphetamine based on a molecularly imprinted polymer // Anal Bioanal Chem. 2010. V. 397. P. 3155.
  20. Liu N., Han J., Liu Z., Qu L., Gao Z. Rapid detection of endosulfan by a molecularly imprinted polymer microsphere modified quartz crystal microbalance // Anal. Methods. 2013. V. 5. P. 4442.
  21. Reimhulta K., Yoshimatsub K., Risvedenb K., Chena S., Yeb L., Krozera A. Characterization of QCM sensor surfaces coated with molecularly imprinted nanoparticles // Biosens. Bioelectron. 2008. V. 23. P. 1908.
  22. Ермолаева Т.Н., Фарафонова О. В., Бессонов О.И. Синтез и применение наночастиц полимеров с молекулярными отпечатками сальбутамола в распознающем слое пьезоэлектрического сенсора // Сорбционные и хроматографические процессы. 2019. Т. 19. № 6. С. 682.
  23. Karaseva N., Ermolaeva T., MizaiKoff B. Piezoelectric sensors using molecularly imprinted nanospheres for the detection of antibiotics // Sens. Actuators B. 2016. V. 225. P. 199.
  24. Ebarvia B.S., Ubando I.E., Sevilla F.B. Biomimetic piezoelectric quartz crystal sensor with chloramphenicol-imprinted polymer sensing layer // Talanta. 2015. V. 1. P. 1260.
  25. Codex Alimentarius Commission adopts maximum residue levels. UN food safety body sets limits on veterinary growth promoting drug 06–07–2012. <http://www.fao.org/news/story/en/item/150953/icode/> (дата обращения: 29.04.2020).
  26. Residue evaluation of certain veterinary drugs / Meeting 2010 – Evaluation of data on ractopamine residues in pig tissues. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, Italy. 2010. P. 52.
  27. Liu M., Ning B., Qu L., Peng Y., Dong J., Gao Na, Liu L., Gao Zh. Development of indirect competitive immunoassay for highly sensitive determination of ractopamine in pork liver samples based on surface plasmon resonance sensor // Sens. Actuators B: Chem. 2012. V. 161. № 1. P. 124.
  28. Poo-arporn Y., Pakapongpan S., Chanlek N., Poo-arporn R.P. The development of disposable electrochemical sensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-doped reduced graphene oxide modified magnetic screen-printed electrode for ractopamine determination in pork sample // Sens. Actuators B: Chem. 2019. V. 284. P. 164.
  29. Felix F.S., Angnes L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 102. P. 470.
  30. Pan M., Li R., Xu L., Yang J., Cui X., Wang Sh. Reproducible molecularly imprinted piezoelectric sensor for accurate and sensitive detection of ractopamine in swine and feed products // Sensors. 2018. V. 18. P. 1870.
  31. Ермолаева Т.Н., Фарафонова О. В., Бессонов О.И. Синтез и применение тонких пленок полимеров с молекулярными отпечатками сальбутамола в пьезоэлектрических сенсорах // Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 9 Приложение. С. S5.
  32. Yang K., Ye L. One-pot synthesis of hydrophilic molecularly imprinted nanoparticles // Macromolecules. 2009. V. 42. P. 8739.