



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 27/26 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023111688, 05.05.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.05.2023

Дата регистрации:
31.01.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.05.2023

(45) Опубликовано: 31.01.2024 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, УрФУ,
Центр интеллектуальной собственности,
Маркс Т.В.

(72) Автор(ы):

Зайдуллина Регина Айратовна (RU),
Свалова Татьяна Сергеевна (RU),
Вербицкий Егор Владимирович (RU),
Квашнин Юрий Анатольевич (RU),
Козицина Алиса Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: SVALOVA T. S. et al. Electrochemical
behavior of chloramphenicol on carbon electrodes
in a microelectrochemical cell // Chim. Techno
Acta., 2022. V. 9, pp. 1-5. RU 2777265 C1,
01.08.2022. CN 107255664 B, 29.03.2019. CN
104677962 A, 03.06.2015. SHANMUGARAJU S.
et al. Coordination-Driven Self-Assembly of
Metallamacrocycles via a New PtII2 (см. прод.)

(54) Способ определения хлорамфеникола в водной среде с использованием 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9Н-карбазола в качестве элемента молекулярного распознавания

(57) Реферат:

Изобретение относится к электрохимическому анализу. Раскрыт способ определения содержания хлорамфеникола в анализируемой водной среде с использованием углеродсодержащего рабочего электрода, модифицированного 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9Н-карбазолом, включающий молекулярное распознавание данной органической молекулой молекулы хлорамфеникола в водной среде путем погружения электрода в электрохимическую ячейку, содержащую 0,05% раствор 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9Н-карбазола в ацетонитриле, наложения трех циклических разверток потенциала в диапазоне 0,3 до 1,8 В для формирования на электроде

электроосажденного слоя 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9Н-карбазола, перемещения электрода в водный анализируемый раствор, выдерживания в нем в течение 30 минут, затем детектирование прямого электрохимического сигнала от хлорамфеникола путем переноса электрода в водный раствор фонового электролита 0.1 М КСl, регистрации линейной вольтамперограммы в диапазоне от 0 до -0.8 В и определение содержания хлорамфеникола по величине тока электровосстановления нитрогруппы в структуре хлорамфеникола с использованием метода градуировочного графика. Изобретение обеспечивает селективность и чувствительность анализа с осуществлением малого количества

стадий. 2 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

Organometallic Building Block with 90 Geometry and Optical Sensing of Anions // Organometallics, 2010, V. 29, pp. 2971-2980.

R U 2 8 1 2 6 9 9 C 1

R U 2 8 1 2 6 9 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 812 699** (13) **C1**(51) Int. Cl.
G01N 27/26 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC
G01N 27/26 (2023.08)(21)(22) Application: **2023111688, 05.05.2023**(24) Effective date for property rights:
05.05.2023Registration date:
31.01.2024

Priority:

(22) Date of filing: **05.05.2023**(45) Date of publication: **31.01.2024** Bull. № 4

Mail address:

**620002, g. Ekaterinburg, ul. Mira, 19, UrFU, Tsentr
intellektualnoj sobstvennosti, Marks T.V.**

(72) Inventor(s):

**Zaidullina Regina Airatovna (RU),
Svalova Tatiana Sergeevna (RU),
Verbitskii Egor Vladimirovich (RU),
Kvashnin Iurii Anatolevich (RU),
Kozitsina Alisa Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal State Autonomous Educational
Institution of Higher Education Ural Federal
University named after the first President of
Russia B.N.Yeltsin (RU)**(54) **METHOD FOR DETERMINING CHLORAMPHENICOL IN AQUEOUS ENVIRONMENT USING 3,6-BIS[(TRIMETHYLSILYL)ETHYNYL]-9H-CARBAZOLE AS MOLECULAR RECOGNITION ELEMENT**

(57) Abstract:

FIELD: electrochemical analysis.

SUBSTANCE: method is disclosed for determining the content of chloramphenicol in the analysed aqueous medium using a carbon-containing working electrode modified with 3,6-bis[(trimethylsilyl)ethynyl]-9H-carbazole, including molecular recognition of the chloramphenicol molecule in an aqueous medium by this organic molecule by immersing the electrode in an electrochemical cell, containing 0.05% solution 3,6-bis[(trimethylsilyl)ethynyl]-9H-carbazole in acetonitrile, applying three cyclic potential scans in the range of 0.3 to 1.8 V to form an electrodeposited layer of 3,6-bis[(trimethylsilyl)ethynyl]-9H-carbazole on the electrode,

moving the electrode into the aqueous test solution, keeping it in it for 30 minutes, then detecting a direct electrochemical signal from chloramphenicol by transferring the electrode into an aqueous solution of the background electrolyte 0.1 M KCl, recording a linear voltammogram in the range from 0 to -0.8 V and determining the chloramphenicol content by the electroreduction current of the nitro group in the chloramphenicol structure using the method calibration chart.

EFFECT: selectivity and sensitivity of the analysis with implementation of a small number of stages.

1 cl, 2 dwg, 2 ex

RU 2 812 699 C1

RU 2 812 699 C1

Изобретение относится к бесферментному электрохимическому анализу, а именно, к определению содержания хлорамфеникола в водной среде. Изобретение создано с целью сокращения этапов проведения анализа с использованием малых количеств органических растворителей. Изобретение может быть использовано в экологическом мониторинге и пищевой промышленности.

Известна методика определения содержания остаточных количеств хлорамфеникола в сырье животного происхождения и пищевых продуктах [Полянских Е. И. [и др.]. Методика Контроля Остаточного Содержания Хлорамфеникола (Левомецетина) В Пищевой Продукции Животного Происхождения // Журнал Аналитической Химии. 2019. № 6 (74). С. 455-463]. Методика включает экстракцию аналита этилацетатом из раствора пробы в 4 М растворе сульфата аммония, упаривание органического растворителя, растворение полученного сухого остатка в воде, обезжиривание н-гексаном, концентрирование методом твердофазной экстракции и количественное определение методом ВЭЖХ-МС/МС. Недостатком описанной методики является длительность пробоподготовки и многостадийность анализа, с использованием большого количества органических растворителей и дорогостоящего оборудования.

Известен способ кулонометрического определения хлорамфеникола (торговое наименование “Левомецетин”) в лекарственных формах [Зиятдинова Г. К. [и др.].

КУЛОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕВОМИЦЕТИНА В

ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2007. № 4 (149). С. 98-195]. В данном способе

электрогенерированные галогены - хлор, бром и йод - были использованы для установления возможности количественного реагирования и стехиометрии реакций с левомецетином. Установлено, что только восстановленный левомецетин взаимодействует с электрогенерированными галогенами в условиях гальваностатической кулонометрии. Результаты кулонометрического титрования позволили установить, что восстановленный левомецетин взаимодействует с электрогенерированным бромом в соотношении 1 : 2. Недостатком представленного способа является многостадийность анализа и косвенное определение левомецетина с помощью электрогенерированных галогенов.

Предложен способ определения хлорамфеникола в молоке и меде с использованием прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [Wu S. W. [и др.]. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for rapid detecting chloramphenicol in food // Journal of Food Safety. 2020. № 2 (40)]. Для его осуществления антитела к хлорамфениколу, разбавленные фосфатным буферным раствором (ФБР), помещали в лунки планшета для иммуноферментного анализа, затем инкубировали 1 час при 37°, затем четыре раза промывали лунки смесью буферного раствора и реактива Твин-20 (Твин-ФБР). Далее в лунки добавляли раствор бычьего сывороточного альбумина в ФБР и инкубировали 30 мин при 37° для блокирования неспецифических центров связывания антител. Непрореагировавшие компоненты удалялись четырехкратным промыванием лунок раствором Твин-ФБР. Затем в лунки добавляли исследуемый образец с добавлением конъюгата «хлорамфеникол-пероксидаза хрена» с последующей инкубацией в течение 1 часа и последующим промыванием. После добавления субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (для протекания иммуноферментной реакции) и выдерживания луночного планшета в темноте в течение 20 минут в лунки добавляли соляную кислоту для прекращения ферментативной реакции и регистрировали спектры поглощения с помощью прибора Vmax® (автоматического ИФА ридера). Кроме описанного способа авторами предложены

иммунохроматографические тест-полоски для чувствительного определения наличия хлорамфеникола в пробах с использованием меченых золотыми наночастицами антител к хлорамфениколу и конъюгатов “хлорамфеникол-овальбумин”. Однако недостатками указанных способов и подходов является наличие биологических компонентов (антитела, ферменты, белки), при использовании которых обязательно соблюдение жестких условий хранения. Еще одним недостатком является многостадийность иммуноферментного анализа.

Недостатками вышеописанных методов и подходов являются использование дорогостоящего лабораторного оборудования, длительность и многостадийность анализа, особые требования к хранению и использованию биологических реагентов с необходимостью предварительного получения и очистки конъюгатов.

Достоинством электрохимических способов определения является возможность детектирования прямого сигнала от хлорамфеникола в мутных и окрашенных пробах малого объема, что позволяет существенно упростить пробоподготовку из-за необязательной дополнительной очистки пробы.

В качестве сенсорной молекулы был использован 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазол, полученный с выходом 82% по ранее описанной в литературе методике [S. Shanmugaraju, A. K. Bar, K.-W. Chi, P. S. Mukherjee. Coordination-Driven Self-Assembly of Metallamacrocycles via a New Pt^{II}₂ Organometallic Building Block with 90° Geometry and Optical Sensing of Anions. // *Organometallics* 2010, 29, 2971-2980]. В литературе известно о применении данного соединения для получения кремнийсодержащих арилацетиленовых смол с высокой термической устойчивостью [L. Wan, K. Guo, J. Zhu, F. Wang, Y. Zhu, S. Deng, H. Qi. Improvement of the oxidation resistance of siliconcontaining arylacetylene resins upon the introduction of carbazoles. // *Journal of Applied Polymer Science* 2021, 138 (1), 49642]; кроме того, описано получение координационных соединений на основе платины (II), которые могут быть использованы как флуоресцентные сенсоры на пирофосфат анион (P₂O₇⁴⁻) [R. A. Al-Balushi, A. Haque, M. Jayapal, M. K. Al-Suti, J. Husband, M. S. Khan, O. F. Koentjoro, K. C. Molloy, J. M. Skelton, P. R. Raithby. Experimental and Theoretical Investigation for the Level of Conjugation in Carbazole-Based Precursors and Their Mono, Di, and Polynuclear Pt(II) Complexes. // *Inorganic Chemistry* 2016, 55 (13), 6465-6480; S. Shanmugaraju, A. K. Bar, K.-W. Chi, P. S. Mukherjee. Coordination-Driven Self-Assembly of Metallamacrocycles via a New Pt^{II}₂ Organometallic Building Block with 90° Geometry and Optical Sensing of Anions. // *Organometallics* 2010, 29, 2971-2980]; также данные соединения были применены для создания молекулярных систем хранения солнечной энергии на основе обратимой фотоизомеризации метастабильных изомеров [M. Mansø, B. E. Tebikachew, K. Moth-Poulsen, M. Brøndsted Nielsen. Heteroaryl-linked norbornadiene dimers with redshifted absorptions. // *Organic & Biomolecular Chemistry* 2018, 16 (31), 5585-5590]. Наиболее близким вариантом использования 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазола является его использование в качестве высокоэффективного флуоресцентного сенсора на нитроароматические взрывчатые вещества [S. Shanmugaraju, S. A. Joshi, P. S. Mukherjee. Fluorescence and visual sensing of nitroaromatic explosives using electron rich discrete fluorophores. // *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 9130-9138].

Предлагаемый способ определения содержания хлорамфеникола в анализируемой водной среде с использованием углеродсодержащего рабочего электрода, модифицированного 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазолом, включает молекулярное распознавание данной органической молекулы молекулы хлорамфеникола в водной среде путем погружения электрода в электрохимическую

ячейку, содержащую 0,05% раствор 3,6-*бис*[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазола в ацетонитриле, наложения трех циклических разверток потенциала в диапазоне 0,3 В до 1,8 В для формирования на электроде электроосажденного слоя *бис*[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазола, перемещения электрода в водный анализируемый раствор, выдерживания в нем в течение 30 минут, затем детектирование прямого электрохимического сигнала от хлорамфеникола путем переноса электрода в водный раствор фонового электролита 0.1 М КСl, регистрации линейной вольтамперограммы в диапазоне от 0 В до -0.8 В и определение содержания хлорамфеникола по величине тока электровосстановления нитрогруппы в структуре хлорамфеникола с использованием метода градуировочного графика, распространенного в аналитической химии.

Сущность метода градуировочного графика можно изложить следующим образом: «В координатах аналитический сигнал-содержание компонента строят график с использованием образцов сравнения с различным, точно известным содержанием определяемого компонента. Затем, измерив аналитический сигнал анализируемой пробы, находят содержание определяемого компонента по градуировочному графику» [стр. 27, Основы аналитической химии. В 2 т. Т. 1 : учеб. для студ. учреждений высш. проф. образования / [Т.А.Большова и др.] ; под ред. Ю.А.Золотова. - 5 е изд., стер. - М. : Издательский центр «Академия», 2012 - 384 с. ISBN 978 5 7695 9124 2].

Общая схема процедуры анализа приведена в приложении 1.

Таким образом, предлагаемое техническое решение направлено на создание на поверхности рабочего электрода тонкого рецепторного слоя на основе молекул 3,6-*бис*[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазола. Благодаря ковалентному взаимодействию данной молекулы с хлорамфениколом обеспечивается селективность и чувствительность анализа с осуществлением малого количества стадий.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

В электрохимическую ячейку, содержащую 2,5 мл 0,05% раствор 3,6-*бис*[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазола в ацетонитриле погружают углеродсодержащий электрод. Затем накладывают три последовательных циклических развертки потенциала в диапазоне 0,3 В до 1,8 В для формирования на электроде электроосажденного рецепторного слоя 3,6-*бис*[(триметилсилил)этинил]-9*H*-карбазола. Об успешном электроосаждении слоя свидетельствует снижение токов пиков молекулы при каждом последующем цикле. Затем электрод переносят в водный анализируемый раствор (смывы с мяса), выдерживают в нем в течение 30 минут, после этого переносят электрод в водный раствор фонового электролита 0.1 М КСl, не содержащий хлорамфеникола и регистрируют линейную развертку потенциала в диапазоне от 0В до -0,8 В (поскольку известно, что нитрогруппа в структуре хлорамфеникола электровосстанавливается в данном диапазоне потенциалов [Svalova T. S. и др. Electrochemical behavior of chloramphenicol on carbon electrodes in a microelectrochemical cell // Chim. Techno Acta. 2022. Т. 9. № 4. С. 5-9.]). Измеряемой величиной является значение тока электровосстановления нитрогруппы, последующее определение содержания хлорамфеникола осуществляется с использованием метода градуировочного графика. Градуировочная зависимость между величиной регистрируемого тока и концентрацией хлорамфеникола в модельных суспензиях (смывах с мяса с известной добавленной концентрацией хлорамфеникола): $I, \text{ мкА} = (-0.2026 \pm 0,0351) \cdot C_{\text{ХА}}, \text{ мкМ} - (1,1816 \pm 0,3402)$. Зарегистрированная величина тока составила -1.2525 мкА, следовательно, в анализируемой пробе обнаружено 0,35 мкМ хлорамфеникола

На фигуре 1 приведены линейные вольтамперограммы, зарегистрированные на планарном углеродсодержащем электроде с электроосажденным рецепторным слоем до (1) и после (2) выдерживания в анализируемом растворе.

Пример 2.

5 В электрохимическую ячейку, содержащую 2,5 мл 0,05% раствор 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9H-карбазола в ацетонитриле погружают углеродсодержащий электрод. Затем накладывают три последовательных циклических развертки потенциала в диапазоне 0,3 В до 1,8 В для формирования на электроде электроосажденного рецепторного слоя 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9H-карбазола. Об успешном
10 электроосаждении слоя свидетельствует снижение токов пиков молекулы при каждом последующем цикле. Затем электрод переносят в водный анализируемый раствор (молочная сыворотка), выдерживают в нем в течение 30 минут, после этого переносят электрод в водный раствор фоновый электролита 0.1 М KCl, не содержащий хлорамфеникола и регистрируют линейную развертку потенциала в диапазоне от 0В
15 до -0,8 В (поскольку известно, что нитрогруппа в структуре хлорамфеникола электровосстанавливается в данном диапазоне потенциалов). Измеряемой величиной является значение тока электровосстановления нитрогруппы, последующее определение содержания хлорамфеникола осуществляется с использованием метода градуировочного графика. Градуировочная зависимость между величиной регистрируемого тока и
20 концентрацией хлорамфеникола в модельных суспензиях (молочных сыворотках с известной добавленной концентрацией хлорамфеникола): $I, \text{ мкА} = (-0.1442 \pm 0,0276) \cdot C_{\text{ХА}}, \text{ мкМ} - (1,1053 \pm 0,2154)$. Зарегистрированная величина тока составила -1.1083 мкА, следовательно, в анализируемой пробе обнаружено 0,021 мкМ хлорамфеникола.

На фигуре 2 приведены линейные вольтамперограммы, зарегистрированные на
25 планарном углеродсодержащем электроде с электроосажденным рецепторным слоем до (3) и после (4) выдерживания в анализируемом растворе.

Таким образом, предложенный способ является одним из способов электрохимического определения хлорамфеникола в водной среде с использованием углеродсодержащего электрода.

30 На фиг. 1 приведены линейные вольтамперограммы, зарегистрированные на планарном углеродсодержащем электроде с электроосажденным рецепторным слоем до (1) и после (2) выдерживания в анализируемом растворе.

На фиг. 2 приведены линейные вольтамперограммы, зарегистрированные на
35 планарном углеродсодержащем электроде с электроосажденным рецепторным слоем до (3) и после (4) выдерживания в анализируемом растворе.

(57) Формула изобретения

Способ определения содержания хлорамфеникола в анализируемой водной среде с использованием углеродсодержащего рабочего электрода, модифицированного 3,6-
40 бис[(триметилсилил)этинил]-9H-карбазолом, включающий молекулярное распознавание данной органической молекулы молекулы хлорамфеникола в водной среде путем погружения электрода в электрохимическую ячейку, содержащую 0,05% раствор 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9H-карбазола в ацетонитриле, наложения трех циклических разверток потенциала в диапазоне 0,3 до 1,8 В для формирования на электроде
45 электроосажденного слоя 3,6-бис[(триметилсилил)этинил]-9H-карбазола, перемещения электрода в водный анализируемый раствор, выдерживания в нем в течение 30 минут, затем детектирование прямого электрохимического сигнала от хлорамфеникола путем переноса электрода в водный раствор фоновый электролита 0.1 М KCl, регистрации

линейной вольтамперограммы в диапазоне от 0 до -0.8 В и определение содержания хлорамфеникола по величине тока электровосстановления нитрогруппы в структуре хлорамфеникола с использованием метода градуировочного графика.

5

10

15

20

25

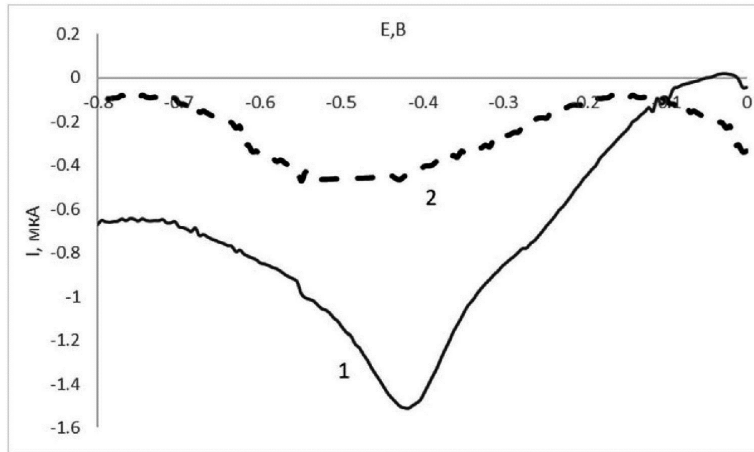
30

35

40

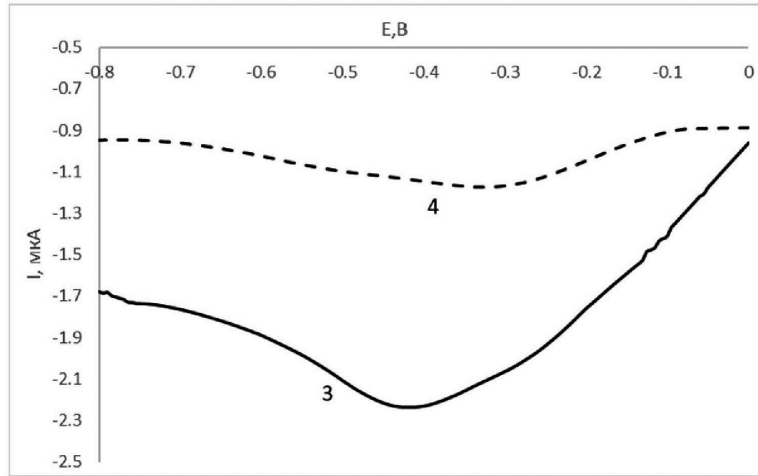
45

1



Фиг. 1

2



Фиг. 2