

Анализ вещества

Substances analysis

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2022-88-11-5-13>АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕТРАЦИКЛИНА© Регина Марковна Бейлинсон*, Алсу Айдаровна Явишева,
Надежда Юрьевна Лопатко, Эльвина Павловна Медянцева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18;

*e-mail: rvarlamo@mail.ru

Статья поступила 15 августа 2022 г. Поступила после доработки 10 сентября 2022 г.
Принята к публикации 28 сентября 2022 г.

Для экспрессного и точного определения тетрациклина разработаны амперометрические биосенсоры на основе иммобилизованного фермента тирозиназы и планарных графитовых электродов, модифицированных многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) в хитозане, восстановленным оксидом графена (ВГО), наночастицами золота (НЧ Au) в хитозане и нанокompозитами на их основе. Установлено, что тетрациклин является ингибитором тирозиназы, что позволяет определять его с использованием тирозиназного биосенсора в диапазоне концентраций от 1 нмоль/л до 1 мкмоль/л. По результатам кинетических исследований реакции ферментативного превращения фенола установлено, что в присутствии тетрациклина на тирозиназном биосенсоре наблюдается бесконкурентное ингибирование. Комбинация углеродных наноматериалов с наночастицами металлов может образовывать нанокompозит с синергетическим эффектом. Применение углеродных наноматериалов и наночастиц металлов в качестве модификаторов поверхности электродов позволило улучшить аналитические характеристики разрабатываемых сенсоров: расширить диапазон определяемых концентраций и уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний ($c_n = 50$ пмоль/л для биосенсора с МУНТ/НЧ Au и 0,7 нмоль/л для биосенсора с ВГО/НЧ Au). Относительное стандартное отклонение полученных с использованием биосенсоров результатов не превышало 0,08. Апробированы методики определения тетрациклина с помощью предлагаемых биосенсоров в молоке и косметическом средстве. Присутствующие в данных образцах структурно не родственные тетрациклину соединения не оказывают мешающего влияния на его определение.

Ключевые слова: определение антибиотиков; тирозиназный биосенсор; тетрациклин; углеродные нанотрубки; оксид графена; наночастицы золота; молоко.

AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE

© Regina M. Beilinson*, Alsu A. Yavisheva,
Nadezhda Yu. Lopatko, Elvina P. Medyantseva

Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18, Kremlevskaya ul., Kazan, 420008, Russia; *e-mail: rvarlamo@mail.ru

Received August 15, 2022. Revised September 10, 2022. Accepted September 28, 2022.

Amperometric biosensors based on planar graphite electrodes modified by multi-walled carbon nanotubes (CNTs) in chitosan, reduced graphene oxide (RGO), gold nanoparticles (Au NPs) in chitosan, nanocomposites based on them, and immobilized tyrosine enzyme for the determination of tetracycline have been developed. It is shown that tetracycline is a tyrosinase inhibitor, which provides the determination of tetracycline using a tyrosinase biosensor in the concentration range from 1 nM to 1 μ M with LOD 0.5 nM. According to the results of kinetic studies of the reaction of the enzymatic conversion of phenol, it is found that in the presence of tetracycline, uncompetitive inhibition is observed on the tyrosinase biosensor. Electrodes modified with nanomaterials can be used as primary transducers of biosensors for fast and accurate determination of the tetracycline concentration. Combination of carbon nanomaterials with metal nanoparticles can form a nanocomposite with a synergistic effect. The use of carbon nanomaterials and metal nanoparticles as modifiers of the electrode surface made it possible to improve the analytical characteristics of the developed sensors: the range of determined concentrations in case of a biosensor modified with CNT/Au NPs and RGO/Au NPs was 1 nM – 1 μ M and 0.1 nM – 1 μ M, respectively. The correlation

coefficient was 0.9925, and the lower limit of the determined concentrations was 50 pM (biosensor with CNT/Au NPs) and 0.7 nM (biosensor with RGO/Au NPs), respectively. The relative standard deviation of the results obtained using biosensors did not exceed 0.078. Methods for the determination of tetracycline using the proposed biosensors in milk and cosmetics have been tested. The compounds present in these samples, structurally unrelated to tetracycline, do not interfere with the determination.

Keywords: antibiotics; determination; tyrosinase; biosensor; tetracycline; carbon nanotubes; graphene oxide; gold nanoparticles; milk.

Введение

Антибиотики — лекарственные препараты, обладающие способностью избирательно подавлять жизнеспособность микроорганизмов. Они подразделяются на группы в зависимости от химического строения. Представители одной группы различаются лишь заместителями.

Одними из широко используемых антибиотиков являются тетрациклины. Данная группа характеризуется общностью химической структуры (четырёхчленное нафтаценовое ядро), сходным механизмом и широким спектром антибактериального действия. Наиболее широкое распространение в медицинской практике получил тетрациклин ([4S-(4a,4a,5a,6β,12a)]-4-(диметиламино)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагидро-3,6,10,12,12a-пентагидрокси-6-метил-1,11-диоксо-2-нафтацен-карбоксамид) (рис. 1) — антибиотик, применяющийся в виде таблеток, глазной и кожной мази, инъекций.

Тетрациклин является препаратом бактериостатического действия. Он ингибирует синтез белка в клетках бактерий, нарушает проницаемость микробной клетки. Препарат высокоактивен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [1].

Данное соединение относится к тетрациклинам природного (биосинтетического) происхождения. Препарат имеет большой спектр побочных эффектов, в частности, гепатотоксичность, вызывает дисбактериоз, тошноту, фотосенсибилизацию, нарушение формирования костной и зубной ткани, изменение цвета зубной эмали у детей, повышение внутричерепного давления и др. Появление резистентности организма к одно-

му представителю данной группы вызывает устойчивость ко всей группе тетрациклиновых антибиотиков [2]. Поэтому его нахождение в воде и продуктах питания может оказывать негативное влияние на организм человека. В настоящее время данный препарат применяют в ветеринарии для лечения крупного рогатого скота, а также при производстве мяса, овощей, молока для увеличения их срока хранения.

В настоящее время для определения тетрациклина широко используют оптические [3, 4], хроматографические [5, 6], электрохимические [7–9] биосенсорные устройства [10], отличающиеся высокой чувствительностью, селективностью, экспрессностью.

Использование амперометрических биосенсоров, модифицированных наноматериалами различной природы, является одним из современных подходов к определению лекарственных соединений. Биосенсоры на основе растительных и животных тканей ввиду доступности и дешевизны биологического материала могут быть предпочтительнее более дорогих методов, обеспечивая высокую чувствительность и, в отдельных случаях, селективность определения. Многообразие способов модификации поверхности первичных преобразователей для придания им определенных свойств обеспечит возможность улучшения характеристик новых амперометрических биосенсоров. Наноматериалы, например, многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) и восстановленный оксид графена (ВГО) вследствие своих исключительных электронных свойств являются весьма перспективными материалами при разработке биосенсорных устройств [11]. Актуальным подходом к улучшению свойств поверхности электродов является использование нанокомпозитов на основе углеродных наноматериалов и наночастиц металлов, в частности, наночастиц золота (НЧ Au). Это обусловлено их высокой электропроводностью, химической стойкостью и простотой получения стабильных золей золота [12].

Цель данной работы — разработка амперометрических биосенсоров на основе графитовых электродов, модифицированных МУНТ, ВГО, НЧ Au, и иммобилизованного фермента тирозиназы для определения тетрациклина, оценка их аналитических возможностей для контроля со-

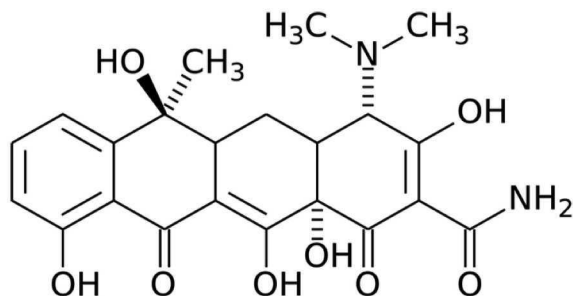


Рис. 1. Структурная формула тетрациклина

Fig. 1. Structural formula of tetracycline

держания тетрациклина в пищевых (в частности, молочных) продуктах и косметических средствах.

Экспериментальная часть

Реактивы и аппаратура. В основе разрабатываемых биосенсоров использовали систему, состоящую из рабочего и вспомогательного графитовых электродов и хлоридсеребряного электрода сравнения, полученную на полимерной подложке методом печатных технологий (кафедра аналитической химии КФУ).

Материалом поверхности рабочего электрода, на которой иммобилизуются модификатор и фермент, являются графитовые чернила (Gwent Electronic Materials, США). Вспомогательный электрод также изготовлен из графитовых чернил.

Объем рабочей ячейки составил 2000 мкл. Для электрохимического детектирования использовали потенциостат/гальваностат 204 N (Autolab, Нидерланды).

Электрохимическую стабилизацию и очистку поверхности электрода проводили путем циклического изменения потенциала в диапазоне от 0 до 1000 мВ, для этого регистрировали 5–7 циклических вольтамперограмм в 0,15 М растворе KCl при скорости развертки потенциала 100 мВ/с.

Фенол квалификации хч использовали в качестве субстрата. Его растворы готовили по точной навеске. В качестве растворителя был использован фосфатный буферный раствор с pH $7,1 \pm 0,05$. Срок хранения указанного раствора не превышал трех часов.

Для приготовления дисперсии МУНТ (внешний диаметр — 10–15 нм, внутренний диаметр — 2–6 нм, длина — 0,1–10 мкм, Sigma-Aldrich, США) диспергирование осуществляли в ультразвуковой (УЗ) ванне S30H (Elmasonic, Германия) с частотой 37 кГц.

Использовали 1 %-ный раствор глутарового альдегида (ГА) (ICN, США) и бычий сывороточный альбумин (БСА) (Reanal, Венгрия). Для получения НЧ Au использовали цитрат натрия хч, хитозан хч, HCl хч, $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ хч, SnCl_2 ч, полиэтиленгликоль (PEG-3000) (Sigma).

Препарат тетрациклина хроматографически чистый (Sigma-Aldrich, США) использовали для приготовления рабочих растворов посредством их растворения в 0,1 М серной кислоте. Значения pH водных растворов определяли с помощью pH-метра pH-150 со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

Подготовка углеродных нанотрубок для модификации электродов. Перед модификацией поверхности электродов смешивали МУНТ с раствором 0,5 %-ного (по массе) хитозана в 0,05 М

уксусной кислоте. Для достижения однородности смесь диспергировали в УЗ-ванне при комнатной температуре. Концентрация дисперсии МУНТ составила 1 мг/мл. Для поддержания однородности используемых для модификации растворов МУНТ периодически обрабатывали их ультразвуком.

Подготовка оксида графена для модификации поверхности электродов. Исходный ВГО представлял собой водный раствор с концентрацией 2 мг/мл (Sigma-Aldrich). Для лучшего закрепления ВГО на поверхности электрода добавляли 0,75 %-ный раствор хитозана в 2 %-ной уксусной кислоте. Полученный раствор подвергали ультразвуковой обработке при температуре 35 °С для получения дисперсии с концентрацией 1,5 мг/мл. При повышении температуры выше заданной охлаждали воду в УЗ-ванне до нужной температуры. Однородность используемого для модификации поверхности электрода раствора ВГО поддерживали периодической обработкой УЗ.

Получение тирозиназы из гомогената грибов. 10 г мелконарезанного и предварительно замороженного растительного материала (грибов шампиньонов — *Agaricus bisporus*) доводили до пастообразной текстуры в вымороженной ступке. После этого к гомогенату добавляли 10 мл фосфатного буферного раствора с pH $7,00 \pm 0,05$ и перемешивали с использованием магнитной мешалки. Отделяли жидкую фракцию фильтрованием через двойной марлевый слой. Фильтрат является прямым источником тирозиназы.

Для определения каталитической активности тирозиназы использовали смесь, содержащую фосфатный буферный раствор (pH = $7,00 \pm 0,05$), 1 мМ раствор фенола и аликвоту гомогената тирозиназы [13, 14]. Оптическую плотность измеряли на длине волны 280 нм в течение примерно 20 мин. Активность фермента определяли как увеличение оптической плотности ($\lambda = 280$ нм) за определенное время при данных условиях.

По спектрофотометрическим данным каталитическая активность тирозиназы из грибов составляла 2751 ± 133 нкат/мл.

Получение биочувствительной части амперометрического тирозиназного биосенсора на основе печатного графитового электрода. Биочувствительной частью биосенсоров служила иммобилизованная на поверхности рабочего электрода тирозиназа, полученная из грибов. Для нанесения на поверхность электрода готовили смесь, состоящую из раствора фермента, дистиллированной воды, фосфатного буферного раствора, раствора БСА и 1 %-ного раствора ГА, который добавляли в самом конце, интенсивно перемешивая смесь. На электроды наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные биосенсоры поме-

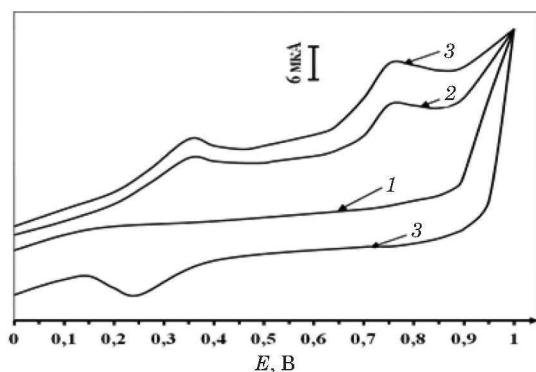


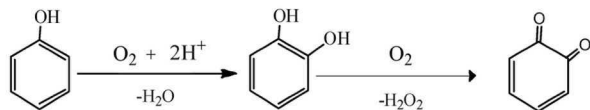
Рис. 2. Циклические вольтамперограммы превращения субстрата тирозиназы фенола ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на печатном графитовом электроде: в отсутствие (кривая 3) и в присутствии (кривая 2) тетрациклина ($1 \cdot 10^{-8}$ моль/л), фоновый электролит — фосфатный буферный раствор с $\text{pH } 7,00 \pm 0,05$ (кривая 1)

Fig. 2. Cyclic voltammograms of the conversion of phenol tyrosinase substrate (1×10^{-3} M): in the absence (curve 3) and in the presence (curve 2) of tetracycline (1×10^{-8} M), the supporting electrolyte is a phosphate buffer solution with $\text{pH } 7.00 \pm 0.05$ (curve 1) on a printed graphite electrode

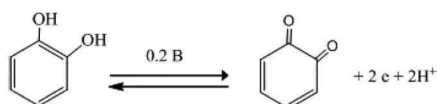
щали на ночь в закрытую чашку Петри при $t = +4^\circ\text{C}$. Через 12 ч биосенсоры промывали водой и высушивали. В дальнейшем их хранили в холодильнике при $t = 4^\circ\text{C}$.

Обсуждение результатов

Из литературных данных известно, что при действии фермента тирозиназы фенол подвергается биокаталитическому окислению, в ходе которого образуется хинон:

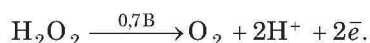


(ферментативная реакция [15]),



(электрохимическая реакция).

В области потенциалов 0,65 – 0,70 В на тирозиназном биосенсоре наблюдается дополнительный пик, который относится к окислению пероксида водорода. В соответствии с литературными данными [16] электрохимическое окисление пероксида водорода протекает по схеме:



Пик при потенциале 0,20 В, вероятно, соответствует электрохимическому окислению фенола до хинона (рис. 2).

Каталитическая активность фермента была максимальной при использовании в качестве среды фосфатного буферного раствора с $\text{pH } 7,00 \pm 0,05$ [17]. Используемая концентрация фенола — субстрата тирозиназы — составляет 1 ммоль/л.

Действие тетрациклина на каталитическую активность иммобилизованной тирозиназы. Изучение влияния тетрациклина на тирозиназу в составе амперометрического биосенсора показало, что в присутствии тетрациклина наблюдается линейное уменьшение аналитического сигнала разработанного биосенсора в диапазоне концентраций 1 ммоль/л – 10 мкмоль/л. Таким образом, можно сделать вывод о том, что тетрациклин является ингибитором ферментативного превращения фенола, что обнаружено впервые (см. рис. 2, кривая 2).

Максимальная степень ингибирования для тетрациклина в изученной области концентраций при действии на фермент-субстратную систему тирозиназа – фенол составляет $85 \pm 1\%$.

Наноструктурированные материалы в составе разрабатываемых биосенсоров. Для нанесения модификаторов на поверхность используемых печатных электродов применяли метод капельного испарения, используя дисперсии ВГО и МУНТ в хитозане или НЧ Au в хитозане.

Углеродные наноматериалы (МУНТ и ВГО) благодаря своим уникальным электронным, электрофизическим, тепловым, оптическим и механическим свойствам оказались весьма перспективными для использования в качестве основы миниатюрных биосенсорных устройств [18, 19]. Наличие большого количества кислородсодержащих функциональных групп обеспечивает возможность сшивания и/или закрепления фермента на поверхности ВГО, что в сочетании с большой площадью поверхности делает ВГО идеальной платформой для ковалентной иммобилизации белка. Композиты на основе ВГО могут быть использованы в качестве материала электрода для улучшения электрохимических свойств сенсоров и биосенсоров [20]. ВГО может осаждаться на любую подложку, преобразуя ее свойства.

Далее на уже модифицированной поверхности рабочего электрода иммобилизовали раствор тирозиназы. Использование модификаторов позволяет увеличить площадь и шероховатость рабочей поверхности электродов, что, в первую очередь, отражается на количестве иммобилизованного фермента и приводит к улучшению аналитических характеристик сенсора.

Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ, ВГО, для определения тетрациклина. Изучение действия тетрациклина на тирозиназу, иммобилизованную на модифицированные МУНТ и ВГО в хитозане электроды, показало, что тетрациклин по-прежнему оказывает обрат-

мое ингибирующее действие на тирозиназу. При этом наблюдается лишь незначительное изменение значений потенциала окисления, в частности, смещение потенциала от 0,70 до 0,73 В.

Биосенсоры, модифицированные МУНТ в хитозане, позволяют расширить диапазон определяемых концентраций тетрациклина, улучшить коэффициент корреляции (табл. 1). Максимальная степень ингибирования тетрациклина при действии на фермент-субстратную систему тирозиназа — фенол в этих условиях составила около 90 % в изученной области концентраций.

Наночастицы золота как модификаторы поверхности печатных электродов. Одним из методов модификации электродной поверхности является использование нанокомпозитов на основе различных углеродных наноматериалов и наночастиц металлов. Для улучшения аналитических свойств биосенсоров были использованы нанокомпозиты на основе МУНТ, ВГО и НЧ Au (МУНТ/НЧ Au, ВГО/НЧ Au).

Для синтеза НЧ Au использовали восстановление золотохлороводородной кислоты хлоридом олова (II) [21]. Чтобы получить дисперсии наночастиц, применяли растворы SnCl₂, полиэтиленгликоля и HAuCl₄ в определенном соотношении. Стабилизатором выступал хитозан [22].

Подтверждением присутствия в растворах НЧ Au определенного размера служат соответствующие спектры поглощения (рис. 3) [23].

Влияние модификации поверхности электродов нанокомпозитами МУНТ/НЧ Au, ВГО/НЧ Au на аналитические возможности тирозиназного биосенсора. Исследование влияния тетрациклина на модифицированный МУНТ, ВГО и НЧ Au тирозиназный биосенсор показало, что тетрациклин оказывает ингибирующее действие на тирозиназу в области концентраций 0,1 нмоль/л – 1 мкмоль/л в случае МУНТ/НЧ Au и 1 нмоль/л – 1 мкмоль/л в случае

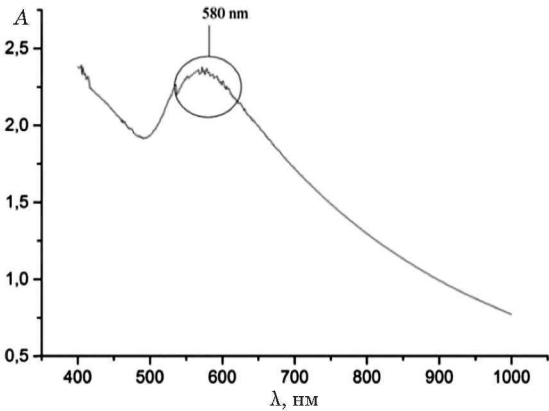


Рис. 3. Спектр поглощения НЧ Au в растворе хитозана
Fig. 3. Absorption spectrum of Au NPs in chitosan solution

ВГО/НЧ Au (табл. 2). Из полученных результатов следует, что использование нанокомпозитных модификаторов позволило почти на порядок величины уменьшить c_n и улучшить коэффициент корреляции.

Правильность определения тетрациклина в указанных диапазонах концентраций с помощью тирозиназных биосенсоров оценена способом «введено – найдено» (табл. 3).

Следует отметить, что модификация поверхности электродов композитами МУНТ/НЧ Au и ВГО/НЧ Au позволила улучшить аналитические характеристики разрабатываемых биосенсоров, в частности, расширить диапазон определяемых концентраций и снизить c_n по сравнению с немодифицированным аналогом.

Анализируя результаты определения тетрациклина биосенсорами, модифицированными углеродными наноматериалами и композитами на их основе, можно сделать вывод о том, что основной вклад в улучшение аналитических характеристик разрабатываемых биосенсоров вно-

Таблица 1. Аналитические возможности определения тетрациклина тирозиназными биосенсорами, модифицированными МУНТ и ВГО ($n = 5$; $P = 0,95$)

Table 1. Analytical capabilities of tetracycline determination by tyrosinase biosensors modified by CNTs and RGO ($n = 5$; $P = 0.95$)

Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости, $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta)(-\lg C)$			c_n , моль/л	Максимальная степень ингибирования, %
	$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r		
Тирозиназный биосенсор					
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-9}$	120 ± 8	$-4,2 \pm 0,5$	0,9823	$5 \cdot 10^{-10}$	85 ± 1
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВГО					
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-9}$	60 ± 7	$-15,6 \pm 0,7$	0,9901	$5 \cdot 10^{-10}$	$86,0 \pm 0,8$
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ					
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-10}$	101 ± 7	$-15,9 \pm 0,7$	0,9882	$7 \cdot 10^{-11}$	$88,0 \pm 0,9$

* $I = I_p/I_o \cdot 100$, ($I_p = I_o - I_s$), где I_s — ток в присутствии ингибитора, I_o — ток в его отсутствие.

* $I = I_p/I_o \cdot 100$, ($I_p = I_o - I_s$), где I_s — ток в присутствии ингибитора, I_o — ток в его отсутствие.

Таблица 2. Аналитические возможности определения тетрациклина тирозиназными биосенсорами, модифицированными МУНТ/НЧ Au и ВГО/НЧ Au ($n = 5$; $P = 0,95$)**Table 2.** Analytical capabilities of tetracycline determination by tyrosinase biosensors modified by CNT/Au NPs and RGO/Au NPs ($n = 5$; $P = 0.95$)

Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости, $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta)(-\lg C)$			c_H , моль/л	Максимальная степень ингибирования, %
	$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r		
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВГО/НЧ Au					
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-9}$	63 ± 6	$-20,6 \pm 0,8$	0,9925	$7 \cdot 10^{-10}$	90 ± 1
Тирозиназный биосенсор, модифицированный УНТ/НЧ Au					
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-10}$	131 ± 8	$-21,6 \pm 0,7$	0,9926	$5 \cdot 10^{-11}$	92 ± 1

сят МУНТ и ВГО. Однако в отдельных случаях, например, для более чувствительного определения, можно использовать и биосенсоры, модифицированные соответствующими нанокompозитами.

Кинетические параметры реакции ферментативного превращения фенола в присутствии тетрациклина. Значения характеристических кинетических параметров (константы Михаэлиса, максимальной скорости ферментативной реакции и типа ингибирования) ферментативной реакции в присутствии определяемого эффектора могут быть использованы для подбора условий, обеспечивающих получение максимального аналитического сигнала при определении микроколичеств аналита (табл. 4).

Для определения кинетических параметров реакции, таких как кажущаяся константа Миха-

элиса K_m , максимальная скорость V_{max} и константа ингибирования K_I , использовали интегральный анализ полной кинетической кривой действия иммобилизованной тирозиназы на фенол в отсутствие и в присутствии тетрациклина [24]. Для определения скоростей реакции использовали начальный участок этой кривой. Как показывают полученные результаты кинетических исследований, при использовании модифицированных МУНТ и НЧ Au биосенсоров в присутствии тетрациклина при концентрации субстрата 1 ммоль/л наблюдается двухпараметрически рассогласованное ингибирование (бесконкурентное ингибирование). При одинаковом воздействии, ведущем к снижению сродства субстрата и фермента, эффектор в присутствии 1 ммоль/л фенола уменьшает скорость его ферментативного превращения.

Таблица 3. Результаты определения тетрациклина с использованием тирозиназных биосенсоров ($n = 5$; $P = 0,95$)**Table 3.** The results of tetracycline determination using tyrosinase biosensors ($n = 5$; $P = 0.95$)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r	Степень открытия, %
Тирозиназный биосенсор			
$5 \cdot 10^{-8}$	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$	0,078	94 – 110
$3 \cdot 10^{-9}$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-9}$	0,071	93 – 107
Тирозиназный биосенсор — МУНТ в хитозане			
$5 \cdot 10^{-9}$	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$	0,062	94 – 106
$7 \cdot 10^{-10}$	$(6,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$	0,060	93 – 107
Тирозиназный биосенсор — МУНТ и НЧ Au в хитозане			
$8 \cdot 10^{-8}$	$(7,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$	0,053	95 – 105
$3 \cdot 10^{-10}$	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-10}$	0,069	93 – 107
Тирозиназный биосенсор — ВГО в хитозане			
$7 \cdot 10^{-8}$	$(6,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$	0,075	93 – 107
$3 \cdot 10^{-9}$	$(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-9}$	0,077	92 – 108
Тирозиназный биосенсор — ВГО в хитозане и НЧ Au в хитозане			
$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$	0,076	92 – 109
$5 \cdot 10^{-8}$	$(4,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	0,042	96 – 104

Определение тетрациклина в молоке. Тетрациклин, являясь антибиотиком широкого спектра действия, используется в ветеринарии для лечения крупного рогатого скота и, следовательно, может содержаться в молоке и молочных продуктах. Содержание данного препарата согласно нормам Европейского Союза регламентировано. Для молока ПДК тетрациклина составляет 100 мкг/л ($4,4 \cdot 10^{-7}$ моль/л).

Пробоподготовка образца молока (1,5 % жирности) для анализа заключалась в разбавлении в 50 раз фосфатным буферным раствором. Этого разбавления было достаточно для устранения влияния матричных компонентов. В то же время аналитические характеристики предлагаемых биосенсоров позволяют успешно работать в нужных диапазонах концентраций.

Установлено, что линейная зависимость между концентрацией тетрациклина и величиной аналитического сигнала на фоне молока в случае амперометрического тирозиназного биосенсора, модифицированного МУНТ/НЧ Au, наблюдается в той же области концентраций, что и на фоне буферного раствора. Следовательно, можно использовать любой из полученных ранее градуировочных графиков (см. табл. 4) для определения оста-

точных количеств лекарственных препаратов в образцах молока.

Результаты определения тетрациклина в образцах молочных продуктов представлены в табл. 5.

При анализе образцов молока другие лекарственные препараты, также используемые в ветеринарии, но имеющие структурно не родственное строение, в частности, колхицин, левомецетин, не оказывают мешающего влияния при определении тетрациклина разработанными биосенсорами.

Определение тетрациклина в салициловом лосьоне. По результатам анализа широко используемых лосьонов от прыщей в их составе часто оказывается тетрациклин, который добавляют в эту продукцию (не заявляя об этом на этикетке), так как этот антибиотик может помочь справиться с кожными заболеваниями, но может и усугубить их. В нашей стране использование антибиотиков в декоративной косметике незаконно. В связи с этим представляло интерес оценить возможность использования разработанного биосенсора для оценки наличия или отсутствия тетрациклина на примере салицилового лосьона от

прыщей «Пропеллер» — недорогого косметического средства, которое можно найти во многих магазинах.

Методика определения тетрациклина в салициловом лосьоне. В ячейку на 2000 мкл вносили 100 мкл раствора образца исследуемого лосьона, полученного предварительным разбавлением в 25 раз, 0,1 М раствор фенола, фосфатный буферный раствор (pH 7,00) и тирозиназный биосенсор, модифицированный ВГО/НЧ Au. Растворы инкубировали в течение 10 мин, затем измеряли значение тока.

В исследуемом лосьоне тетрациклин обнаружен не был ($c_{\text{тетрациклина}} < c_n$).

Заключение

Таким образом, предложены немодифицированный и модифицированные различными наноматериалами биосенсоры на основе иммобилизованного фермента тирозиназы; определены их основные аналитические характеристики, найдены оптимальные условия подготовки сенсоров для проведения измерений в водных и биологических средах. Следует отметить, что примеры биосенсоров для определения тетрациклина в ли-

Таблица 4. Кинетические параметры реакции тирозиназного превращения фенола в присутствии тетрациклина ($C_{\text{фенола}} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, pH = 7,00, $n = 3$)

Table 4. Kinetic parameters of the reaction of tyrosinase conversion of phenol in the presence of tetracycline ($C_{\text{phenol}} = 1 \times 10^{-3}$ M, pH = 7.00, $n = 3$)

Концентрация тетрациклина, $C_{\text{тетрациклина}}$, моль/л	Константа Михаэлиса $K_m \cdot 10^5$, моль/л	Максимальная скорость $V_{\text{max}} \cdot 10^{-7}$, моль/(л · с)	Соотношение параметров K_m и V_{max}	Тип ингибирования	Константа ингибирования K_I , моль ⁻¹
Тирозиназный биосенсор — МУНТ/НЧ Au					
0	$3,2 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,2$	$K'_m < K_m$	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование (бесконкурентное ингибирование)	$(6,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-9}$
$1 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$	$V'_{\text{max}} < V_{\text{max}}$		

Примечание. K_m — кажущаяся константа Михаэлиса в отсутствие, а K'_m — в присутствии ингибитора тирозиназы; V_{max} — максимальная скорость реакции в отсутствие, а V'_{max} в присутствии ингибитора тирозиназы.

Таблица 5. Результаты определения тетрациклина в образцах молока различными методами и с использованием тирозиназного биосенсора, модифицированного МУНТ/НЧ Au ($n = 5$; $P = 0,95$)

Table 5. Determination of tetracycline in milk samples using various methods and a tyrosinase biosensor (modifier — CNT/Au NP) ($n = 5$; $P = 0.95$) (MAC of tetracycline in milk is 4.43×10^{-7} M)

Метод	Результат определения тетрациклина в молоке	Ссылка
Магнитная твердофазная экстракция в сочетании с ВЭЖХ	Обнаружен в одном образце молока в концентрации $75,8 \pm 3,8$ нг/мл	[25]
Магнитная твердофазная экстракция в сочетании с ВЭЖХ	Не обнаружено*	[26]
Хемилюминесцентный иммуноферментный анализ	Обнаружен в трех образцах молока в концентрациях 15 нг/мл, 18 нг/мл, 46 нг/мл	[27]
Тирозиназный биосенсор (модификатор — МУНТ/НЧ Au)	Не обнаружено*	Результаты настоящего исследования

* Концентрация меньше c_n .

температуре отсутствуют. В качестве модификаторов использованы многостенные углеродные нанотрубки в хитозане, восстановленный оксид графена, а также наночастицы золота в хитозане. Показано, что модификация поверхности электродов данными нанокомпозитами позволяет расширить диапазон определяемых концентраций и уменьшить нижнюю границу определяемых содержаний тетрациклина.

Преимуществом планарных сенсоров является возможность их использования для проведения измерений в микрообъемах проб, что важно в анализе биосред. Показана возможность применения тирозиназных биосенсоров для определения тетрациклина в молоке и салициловом лосьоне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Большая медицинская энциклопедия. Т. 25. Фармакологический справочник / Под ред. Б. В. Петровского. 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1985.
<https://bmz.opr/index.php/ТЕТРАЦИКЛИНЫ> (дата обращения 10 августа 2022 г.)
2. Есипов С. Е. Тетрациклины / Химическая энциклопедия: в 5 т. Т. 4. / Под. ред. Н. С. Зефирова. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1995. С. 559.
3. Pei Yang, Ziqi Zhu, Minzhi Chen, et al. Microwave-assisted synthesis of xylan-derived carbon quantum dots for tetracycline sensing / Opt. Mater. 2018. Vol. 85. P. 329 – 336. DOI: 10.1016/j.optmat.2018.06.034
4. Anand S. K., Sivasankaran U., Jose A. R., Kumar K. G. Interaction of tetracycline with L-cysteine functionalized CdS quantum dots — Fundamentals and sensing application / Spectrochim. Acta. A. 2019. Vol. 213. P. 410 – 415. DOI: 10.1016/j.saa.2019.01.068
5. Grande-Martinez A., Moreno-Gonzalez D., Arrebola-Liebanas F. J., et al. Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC – MS/MS / J. Pharm. Biomed. Anal. 2018. Vol. 155. P. 27 – 32. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.03.029
6. Gissawong N., Boonchiangma S., Mukdasai S., Srijarnai S. Vesicular supramolecular solvent-based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines / Talanta. 2019. Vol. 200. P. 203 – 211. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.03.049
7. Hua Guo, Ya Su, Yanling Shen, et al. In situ decoration of Au nanoparticles on carbon nitride using a single-source precursor and its application for the detection of tetracycline / J. Colloid Interface Sci. 2019. Vol. 536. P. 646 – 654. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.10.104
8. Huimin Zhao, Hongtao Wang, Xie Quana, Feng Tan. Amperometric Sensor for Tetracycline Determination Based on Molecularly Imprinted Technique / Procedia Environ. Sci. 2013. Vol. 18. P. 249 – 257. DOI: 10.1016/j.proenv.2013.04.032
9. Кулапина Е. Г., Баринаова О. И., Кулапина О. И. и др. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах (обзор) / Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54. № 9 – 10. С. 53 – 60.
10. Besharati M., Hamed J., Hosseinkhani S., Sabe R. A novel electrochemical biosensor based on TetX2 monooxygenase immobilized on a nano-porous glassy carbon electrode for tetracycline residue detection / Bioelectrochemistry. 2019. Vol. 128. P. 66 – 73. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.02.010
11. Штыков С. Н. Нанообъекты и нанотехнологии в химическом анализе / Проблемы аналитической химии. Т. 20 // Под ред. С. Н. Штыкова. — М.: Наука, 2015. — 431 с.
12. Викулова Е. В. Электрохимические свойства наночастиц золота и сенсор на их основе: автореф. ... дисс. канд. хим. наук. — Екатеринбург, 2013. — 24 с.
13. Duckworth H. W., Coleman J. E. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase / J. Biol. Chem. 1970. Vol. 245. P. 1613 – 1625. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)77137-3
14. Yakup Arica M., Gülay B., Niyazi B. Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads / Process Biochem. 2004. Vol. 39. P. 2007 – 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.09.030
15. Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е. Основы биосенсорики: уч. пособие. — Казань, 2007. — 82 с.
16. Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. — Вильнюс: Мокслас, 1981. — 200 с.
17. Zhao Q., Zhuang Q. K. Determination of Phenolic Compounds Based on the Tyrosinase-Single Walled Carbon Nanotubes Sensor / Electroanalysis. 2005. Vol. 17. N 1. P. 85 – 88. DOI: 10.1002/elan.200403123
18. Huang T., Xu X.-H. N. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy / J. Mater. 2007. Vol. 300. P. 13 – 19. DOI: 10.1039/C0JM01990A
19. De Lima C., da Silva P. S., Spinelli A. Chitosan-stabilized silver nanoparticles for voltammetric detection of nitrocompounds / Sens. Actuators. B. 2014. Vol. 196. P. 39 – 45. DOI: 10.1016/j.snb.2014.02.005
20. Mani V., Devadas B., Chen S. M. Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor / Biosens. Bioelectron. 2013. Vol. 42. P. 309 – 315. DOI: 10.1016/j.bios.2012.08.045
21. Пашканова О. Ю., Ермолаева Т. Н. Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора / Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 5. С. 677 – 692.
22. Варламова Р. М., Медянцева Э. П., Хамидуллина Р. Р., Будников Г. К. Амперометрические тирозиназные биосенсоры на основе модифицированных наноматериалами электродов для определения афлатоксина М1 / Журн. аналит. химии. 2019. Т. 74. № 7. Приложение. С. S71 – S80. DOI: 10.1134/S0044450219070211
23. Бейлинсон Р. М., Явишева А. А., Медянцева Э. П., Будников Г. К. Амперометрические тирозиназные биосенсоры, модифицированные наноматериалами различной природы, для определения диклофенака / Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 5. С. 467 – 474. DOI: 10.31857/S004445022105078
24. Крупянко В. И. Векторный метод представления ферментативных реакций. — М.: Наука, 1990. — 144 с.
25. Vuran B., Ulusoy H. I., Sarp G., et al. Determination of chloramphenicol and tetracycline residues in milk samples by means of nanofiber coated magnetic particles prior to high-performance liquid chromatography-diode array detection / Talanta. 2021. Vol. 230. P. 1 – 8. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122307
26. Wang Q., Zhang L. Fabricated ultrathin magnetic nitrogen doped graphene tube as efficient and recyclable adsorbent for highly sensitive simultaneous determination of three tetracyclines residues in milk samples / J. Chromatogr. A. 2018. Vol. 1568. P. 1 – 7. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.07.012
27. Wang G., Jing H. C. Z., Jian L., Wang P. A receptor-based chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay for determination of tetracyclines in milk / Anal. Biochem. 2019. Vol. 564 – 565. P. 40 – 46. DOI: 10.1016/j.ab.2018.10.017

REFERENCES

1. Great Medical Encyclopedia (ed. by B. V. Petrovsky). Vol. 25: Reference book. — Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya, 1985.
<https://bmz.opr/index.php/ТЕТРАЦИКЛИНЫ> (accessed August 10, 2022)
2. Esipov S. E. Tetracyclines / Chemical Encyclopedia. Vol. 4 // Ed. by N. S. Zefirov. — Moscow: Bol'shaya Rossiiskaya Entsiklopediya, 1995. P. 559 [in Russian].

3. **Pei Yang, Ziqi Zhu, Minzhi Chen, et al.** Microwave-assisted synthesis of xylan-derived carbon quantum dots for tetracycline sensing / *Opt. Mater.* 2018. Vol. 85. P. 329 – 336. DOI: 10.1016/j.optmat.2018.06.034
4. **Anand S. K., Sivasankaran U., Jose A. R., Kumar K. G.** Interaction of tetracycline with L-cysteine functionalized CdS quantum dots — Fundamentals and sensing application / *Spectrochim. Acta. A* 2019. Vol. 213. P. 410 – 415. DOI: 10.1016/j.saa.2019.01.068
5. **Grande-Martínez A., Moreno-Gonzalez D., Arrebola-Liebanas F. J., et al.** Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC – MS/MS / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. Vol. 155. P. 27 – 32. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.03.029
6. **Gissawong N., Boonchiangma S., Mukdasai S., Srijarnai S.** Vesicular supramolecular solvent-based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines / *Talanta* 2019. Vol. 200. P. 203 – 211. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.03.049
7. **Hua Guo, Ya Su, Yanling Shen, et al.** *In situ* decoration of Au nanoparticles on carbon nitride using a single-source precursor and its application for the detection of tetracycline / *J. Colloid Interface Sci.* 2019. Vol. 536. P. 646 – 654. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.10.104
8. **Huimin Zhao, Hongtao Wang, Xie Quana, Feng Tan.** Amperometric Sensor for Tetracycline Determination Based on Molecularly Imprinted Technique / *Procedia Environ. Sci.* 2013. Vol. 18. P. 249 – 257. DOI: 10.1016/j.proenv.2013.04.032
9. **Kulapina E. G., Barinova O. I., Kulapina O. I., et al.** Modern methods for the determination of antibiotics in biological and medicinal environments (a review) / *Antibiot. Khimioter.* 2009. Vol. 54. N 9 – 10. P. 53 – 60 [in Russian].
10. **Besharati M., Hamed J., Hosseinkhani S., Sabe R.** A novel electrochemical biosensor based on TetX2 monooxygenase immobilized on a nano-porous glassy carbon electrode for tetracycline residue detection / *Bioelectrochemistry*. 2019. Vol. 128. P. 66 – 73. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.02.010
11. **Shtykov S. N., ed.** Nanoobjects and Nanotechnologies in Chemical Analysis: Problems of Analytical Chemistry. — Moscow: Nauka, 2015. — 431 p. [in Russian].
12. **Vikulova E. V.** Electrochemical properties of gold nanoparticles and a sensor based on them: author's abstract of candidate's thesis. — Yekaterinburg, 2013. — 24 p. [in Russian].
13. **Duckworth H. W., Coleman J. E.** Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase / *J. Biol. Chem.* 1970. Vol. 245. P. 1613 – 1625. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)77137-3
14. **Yakup Arica M., Gülay B., Niyazi B.** Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads / *Process Biochem.* 2004. Vol. 39. P. 2007 – 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.09.030
15. **Evtuguin G. A., Budnikov G. K., Stoikova E. E.** Fundamentals of biosensors: a tutorial. — Kazan, 2007. — 82 p. [in Russian].
16. **Kulis Yu. Yu.** Analytical systems based on immobilized enzymes. — Vilnius: Mokslas, 1981. — 200 p. [in Russian].
17. **Zhao Q., Zhuang Q. K.** Determination of Phenolic Compounds Based on the Tyrosinase-Single Walled Carbon Nanotubes Sensor / *Electroanalysis*. 2005. Vol. 17. N 1. P. 85 – 88. DOI: 10.1002/elan.200403123
18. **Huang T., Xu X.-H. N.** Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy / *J. Mater.* 2007. Vol. 300. P. 13 – 19. DOI: 10.1039/C0JM01990A
19. **De Lima C., da Silva P. S., Spinelli A.** Chitosan-stabilized silver nanoparticles for voltammetric detection of nitrocompounds / *Sens. Actuators. B*. 2014. Vol. 196. P. 39 – 45. DOI: 10.1016/j.snb.2014.02.005
20. **Mani V., Devadas B., Chen S. M.** Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor / *Biosens. Bioelectron.* 2013. Vol. 42. P. 309 – 315. DOI: 10.1016/j.bios.2012.08.045
21. **Shashkanova O. Yu., Ermolaeva T. N.** A new method for diagnosing autoimmune diseases based on an affinity reaction on the surface of a piezoquartz sensor / *Sorbts. Khromatogr. Prots.* 2009. Vol. 9. N 5. P. 677 – 692.
22. **Varlamova R. M., Medyantseva E. P., Khamidullina R. R., Budnikov G. K.** Amperometric tyrosinase biosensors based on nanomaterial-modified electrodes for aflatoxin M1 / *J. Anal. Chem.* 2019. Vol. 74. Suppl. 1. P. 59 – 61. DOI: 10.1134/S1061934819070189
23. **Beilinson R. M., Yavisheva A. A., Medyantsev E. P., Budnikov G. K.** Amperometric tyrosinase biosensors modified with nanomaterials of various nature for the determination of diclofenac / *J. Anal. Chem.* 2021. Vol. 76. N 5. P. 653 – 659. DOI: 10.1134/S1061934821050075
24. **Krupyanko V. I.** Vector method for representing enzymatic reactions. — Moscow: Nauka, 1990. — 144 p. [in Russian].
25. **Vuran B., Ulusoy H. I., Sarp G., et al.** Determination of chloramphenicol and tetracycline residues in milk samples by means of nanofiber coated magnetic particles prior to high-performance liquid chromatography-diode array detection / *Talanta*. 2021. Vol. 230. P. 1 – 8. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122307
26. **Wang Q., Zhang L.** Fabricated ultrathin magnetic nitrogen doped graphene tube as efficient and recyclable adsorbent for highly sensitive simultaneous determination of three tetracyclines residues in milk samples / *J. Chromatogr. A*. 2018. Vol. 1568. P. 1 – 7. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.07.012
27. **Wang G., Jing H. C. Z., Jian L., Wang P.** A receptor-based chemiluminescence enzyme linked immunosorbent assay for determination of tetracyclines in milk / *Anal. Biochem.* 2019. Vol. 564 – 565. P. 40 – 46. DOI: 10.1016/j.ab.2018.10.017