

DOI: 10.26896/1028-6861-2018-84-8-5-14

**НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ
НА ОСНОВЕ ГРАФЕНА И НАНОЧАСТИЦ КОБАЛЬТА
В СОСТАВЕ МОНОАМИНОКСИДАЗНЫХ БИОСЕНСОРОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИДЕПРЕССАНТОВ¹**

© Эльвина Павловна Медянцева*, Даниил Владимирович Брусницын*,
Регина Марковна Варламова*, Ольга Анатольевна Коновалова**,
Герман Константинович Будников*

* Казанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А. М. Бутлерова, г. Казань, Россия;
e-mail: emedyant@gmail.com

** Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт физики, г. Казань, Россия;
e-mail: olga.konovalova@bk.ru

Статья поступила 14 марта 2018 г.

Разработаны амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе печатных графитовых электродов, модифицированных наноструктурированными композитами графена (ВГО) и наночастиц кобальта (НЧСо) для определения лекарственных веществ антидепрессивного действия: тианептина, тиоридазина и флуоксетина. Сочетания углеродных наноматериалов с наночастицами металлов (нанокомпозиты) позволяют не только сохранить свойства отдельных компонентов, но и за счет их совместного вклада приводят к новому качеству разрабатываемых устройств. Наноматериал-модификатор наносили на поверхность печатных графитовых электродов методом капельного испарения. Закрепление ВГО на поверхности происходит за счет электростатического взаимодействия между его карбоксильными группами и аминогруппами аминопроизводного на платформе полизэфирополиола (H_2O-NH_2). НЧСо получали электрохимически методом хроноамперометрии при потенциале $E = -1,0$ В и разном времени накопления (50 и 60 с). Согласно данным атомно-силовой микроскопии преимущественный размер НЧСо составляет (40 ± 2) и (78 ± 8) нм в зависимости от времени электрохимического накопления НЧ. Спектроскопия электрохимического импеданса показала, что наименьшими значениями сопротивления переноса электрона характеризуются нанокомпозиты ВГО-хитозан/НЧСо и ВГО- $(H_2O-NH_2)/NCHCo$. Использование выбранных нанокомпозитов для модификации поверхности электродов позволило улучшить аналитические характеристики разработанных биосенсоров: обеспечить более широкий диапазон рабочих концентраций — от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-9}$ моль/л, больший коэффициент чувствительности, лучший коэффициент корреляции и меньшее значение нижней границы определяемых концентраций (c_h). Показана возможность использования биосенсоров для контроля качества антидепрессантов при определении основного лекарственного вещества в лекарственных препаратах и биологических жидкостях. При использовании в качестве субстрата тирамина для определения флуоксетина, тиоридазина и тианептина c_h составляет $(7 - 9) \cdot 10^{-10}$ моль/л.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор; моноаминоксидаза; восстановленный оксид графена; наночастицы кобальта; антидепрессанты.

**NANOSTRUCTURED COMPOSITES BASED ON GRAPHENE
AND NANOPARTICLES OF COBALT IN THE COMPOSITION
OF MONOAMINE OXIDASE BIOSENSORS
FOR DETERMINATION OF ANTIDEPRESSANTS**

¹ Результаты обсуждены на Третьем съезде аналитиков России (Москва, 8 – 13 октября 2017 г.)

© Elvina P. Medyantseva*, Daniil V. Brusnitsyn*, Regina M. Varlamova*,
Olga A. Konovalova**, Herman K. Budnikov*

* Kazan (Volga region) Federal University, A. M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan, Russia;
e-mail: emedyant@gmail.com

** Kazan (Volga region) Federal University, Institute of Physics, Kazan, Russia; e-mail: olga.konovalova@bk.ru

Submitted March 14, 2018.

Amperometric monoamine oxidase biosensors based on screen-printed graphite electrodes modified with nanostructured reduced graphene oxide (RGO) composites and cobalt nanoparticles (CoNPs) were developed to determine antidepressant drug substances: tianeptine, thioridazine, and fluoxetine. Combinations of carbon nanomaterials with metal nanoparticles (nanocomposites) along with retaining the properties of individual components, also provide a new quality of the developed devices due to their joint contribution. The nanomaterial-modifier was applied to the surface of screen-printed graphite electrodes using dropwise evaporation. Fixing of RGO on the surface of the screen-printed graphite electrodes occurs due to electrostatic interaction between RGO carboxyl groups and amine groups of the amine derivative on the platform of polyester polyol (H_2O-NH_2). The CoNPs were obtained electrochemically by the method of chronoamperometry at a potential $E = -1.0$ V and different time of their accumulation (about 50 – 60 sec) on the electrode surface. According to the data of atomic force microscopy, the predominant size of CoNPs is (40 ± 2) and (78 ± 8) nm, depending on the time of electrochemical deposition of NPs. Data of electrochemical impedance spectroscopy show that nanocomposites RGO-chitosan/CoNPs and RGO-amine derivative on the polyester polyol (H_2O-NH_2)/CoNPs platform are characterized by the lowest values of the charge transfer resistance. The use of those nanocomposites modifying the electrode surface significantly improved the analytical characteristics of the developed biosensors providing a wider range of operating concentrations from 1×10^{-4} to 5×10^{-9} mol/liter, greater sensitivity coefficient, better correlation coefficient, and lower limit of the detectable concentrations. A possibility of using biosensors to control the quality of antidepressants upon determination of the main active substance in medicinal drugs and biological fluids is shown. The lower limit of detectable concentrations $(7 - 9) \times 10^{-10}$ mol/liter is attained when using tyramine as a substrate for determination of fluoxetine, thioridazine and tianeptine, respectively.

Keywords: biosensor; monoamine oxidase; reduced graphene oxide; cobalt nanoparticles; antidepressants.

В последнее время активно растет число публикаций [1 – 3], посвященных использованию наноструктурированных модифицирующих покрытий в составе различных сенсоров, что способствует развитию и биосенсорных технологий. Это приводит к улучшению аналитических характеристик соответствующих датчиков при определении различных биологически активных веществ, в частности, онкологических маркеров и лекарственных веществ.

Актуальной задачей является разработка способов определения лекарственных препаратов, относящихся к антидепрессантам, так как контроль за их использованием является неотъемлемой частью их применения. Особенность их действия состоит в ингибиции моноаминооксидазы (МАО). Однако в литературе практически отсутствуют данные об использовании моноаминооксидазы в качестве биочувствительного компонента датчиков для определения антидепрессантов: в единичных публикациях описано применение МАО для определения биогенных аминов [4].

Среди наноструктурированных материалов в составе сенсоров особое место занимают композиты на основе сочетаний различных материалов [5 – 7]. К ним относятся, в том числе, и углеродные наноматериалы в сочетании с наночастицами металлов. В литературе описано применение

графена, наночастиц золота и серебра в качестве модификаторов в составе биосенсоров при определении различных лекарственных объектов [8 – 11]. Наночастицы кобальта используют гораздо реже [12 – 15]. Следует отметить, что моноаминооксидазные биосенсоры в этом плане пока не рассматривались. Углеродные наноматериалы, в частности графен, обладают высокими электропроводящими свойствами и обеспечивают большую удельную площадь поверхности электродов по сравнению с немодифицированными вариантами, что, в свою очередь, положительно сказывается на свойствах разрабатываемых датчиков [16, 17]. Наночастицы металлов вследствие своих размеров и конфигурации могут способствовать улучшению характеристик сенсоров. Сочетания углеродных наноматериалов с наночастицами металлов (композиты) могут позволить не только сохранить свойства отдельных компонентов, но и за счет их совместного вклада достичь нового качества разрабатываемых устройств [18, 19].

Цель исследования заключалась в выявлении наилучшего нанокомпозита для модификации поверхности печатных графитовых электродов как основы новых амперометрических моноаминооксидазных биосенсоров и сопоставлении их аналитических возможностей для разработки современных способов определения лекарственных

веществ с антидепрессивным действием в лекарственных формах и биологических жидкостях.

Экспериментальная часть. В качестве первичного преобразователя сигнала в конструкции биосенсора служила система печатных графитовых электродов (изготовлены на кафедре аналитической химии КФУ), состоящая из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения (графитовые чернила Gwent Electronic Materials, США, паста Ag/AgCl). Электрохимические измерения методами циклической вольтамперометрии, хроноамперометрии (ХА) и спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ) проводили с помощью потенциостата-гальваностата 204N с модулем FRA 32M (Autolab, Нидерланды). Микрофотографии снимали на атомно-силовом микроскопе SolverP47H (НТ-МДТ, Россия). В ходе приготовления лекарственных препаратов использовали центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия). Аналитические возможности разрабатываемых биосенсоров рассмотрены на примере определения тианептина, тиоридазина, флуоксетина (Sigma-Aldrich, США), структурные формулы которых приведены в табл. 1.

В работе использовали МАО, полученную из печени свиньи (гомогенат), с активностью $0,075 \pm 0,007 \text{ мкм}/(\text{мин} \cdot \text{мг})$ относительно дофа-

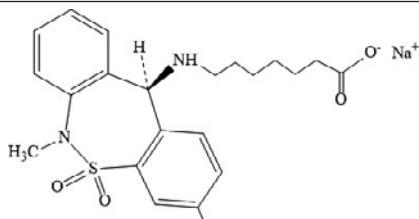
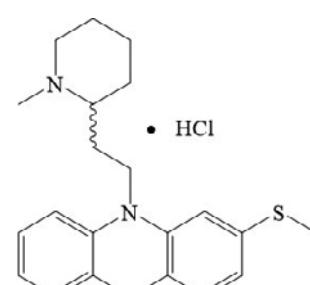
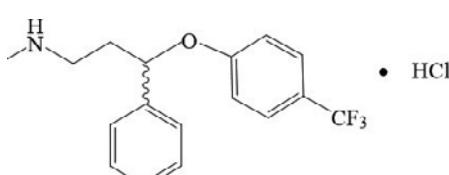
мина. Субстратом моноаминооксидазы служил тирамин (Sigma Aldrich, США).

Для приготовления фосфатных буферных растворов использовали гидрофосфат натрия и дигидрофосфат натрия квалификации ч и чда (ЗАО «Лаверна», Россия), для ацетатных буферных растворов — гидроксид натрия и уксусную кислоту (хч), для боратных буферных растворов — борную кислоту, тетраборат натрия, хлороводородную кислоту и гидроксид натрия. Применили ацетатный буферный раствор в диапазоне pH от 4,0 до 5,7, фосфатный буферный раствор — от 6,2 до 7,8 и боратный буферный раствор — от 8,0 до 11,0.

В работе использовали восстановленный оксид графена — ВГО (Sigma-Aldrich, США), наночастицы кобальта (НЧСо), полученные электрохимически [20], хитозан (хч) в растворе уксусной кислоты (хч), а также амино- и карбоксипроизводные на платформе Boltorn H₂O (H₂O-NH₂, H₂O-COOH), которые были предоставлены кафедрой неорганической химии КФУ (Кутырева М. П. с сотр.). Получение дисперсий ВГО в хитозане, H₂O-NH₂, H₂O-COOH осуществляли в ультразвуковой ванне (S30H Elmasonic, Германия) с частотой 37 кГц.

Получение биочувствительной части. Для получения биочувствительной части биосенсора использовали гомогенат, содержащий фермент,

Таблица 1. Объекты анализа

Лекарственное вещество (лекарственный препарат)	Химическое название	Структурная формула
Тианептин (Коаксил)	(RS)-7[(3-хлор-6, 11-дигидро-6-метилдibenзол[c,f][1,2]тиазепин-11-ил)амино]гептановой кислоты S,S-диоксид	
Тиоридазин (Сонопакс)	(±)-2-метилтио-10-[2-(1-метил-2-пиперидил)-этил]-фенотиазина гидрохлорид	
Флуоксетин (Флуоксетин)	(RS)-N-метил-3-фенил-3-[4-(трифторметил)фенокси]пропан-1-амина гидрохлорид	

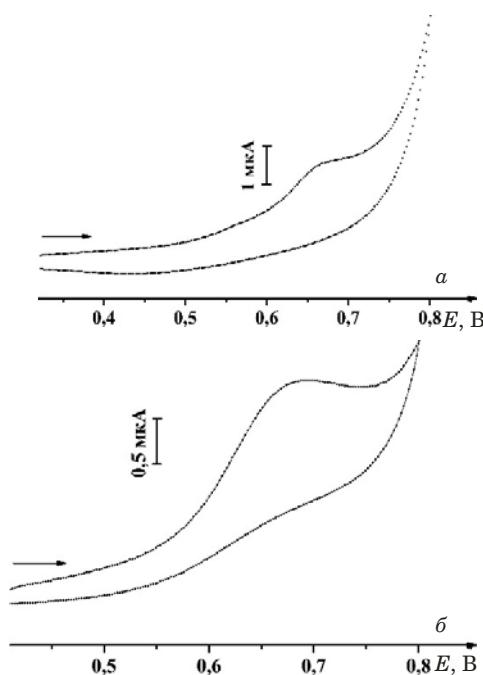


Рис. 1. Вольтамперограммы боратного буферного раствора с pH 11, полученные с использованием печатного графитового электрода, модифицированного ВГО-хитозан/H₂O/H₂(1), время накопления — 50 с (а) и ВГО-Н₂-Н₂/H₂O/H₂(2), время накопления — 60 с (б) ($V = 10$ мВ/с)

H₂O-NH₂ в качестве матричного материала, фосфатный буферный раствор (pH 7,5) и 1 %-ный водный раствор глутарового альдегида. Методика приготовления биочувствительной части биосенсоров с учетом используемых реагентов более подробно изложена в статье [21].

Результаты и их обсуждение. Модификацию печатных графитовых электродов, являющихся основой разрабатываемых амперометрических моноаминооксидазных биосенсоров, проводили с использованием наноструктурированных композитов (ВГО/Н₂O/H₂). Наноматериал-модификатор наносили на поверхность печатных графитовых электродов методом капельного испарения.

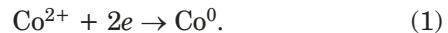
Закрепление углеродного наноматериала (ВГО) происходит за счет электростатического взаимодействия между карбоксильными группами ($-COOH$) ВГО и аминогруппами ($-NH_2$) H₂O-NH₂. Так как полимер H₂O-NH₂ обладает гиперразветвленной структурой, это позволяет за счет значительного количества аминогрупп более прочно закреплять на поверхности электрода не только модификатор, но и иммобилизованный фермент. Благодаря этому возможно использование полимера H₂O-NH₂ также в составе смеси для иммобилизации фермента.

Согласно литературным данным [20] электрохимический процесс получения наночастиц кобальта может быть описан уравнением:

реакция окисления:



реакция восстановления:



Получение Н₂O/H₂ осуществляли электрохимически методом ХА при постоянном потенциале $E = -1,0$ В (боратный буферный раствор pH 11). В ходе данной работы варьировали время накопления Н₂ на поверхности электродов. В первом случае использовали дисперсию ВГО в хитозане, время накопления для получения Н₂O/H₂ составляло 50 с (ВГО-хитозан/H₂O/H₂(1)), во втором случае — дисперсию ВГО в H₂O-NH₂, время накопления для получения Н₂O/H₂ — 60 с (ВГО-Н₂-Н₂/H₂O/H₂(2)). Рассматриваемые Н₂ обладают электрохимической активностью, поэтому в качестве первичного доказательства наличия Н₂ на поверхности электрода использовали метод циклической вольтамперометрии. На вольтамперограммах на фоне боратного буферного раствора в диапазоне потенциалов 650–750 мВ наблюдается анодный пик от Н₂. С увеличением времени накопления сигнал от Н₂O/H₂ смещается в сторону более положительных потенциалов (рис. 1).

Оценить размер Н₂ можно, используя метод атомно-силовой микроскопии в режиме топографии в различных проекциях (рис. 2). Метод позволяет увидеть морфологию поверхности (шероховатость поверхности). Согласно гистограммам распределения (рис. 3) преимущественный размер Н₂O/H₂(1) составляет (40 ± 2) нм, а Н₂O/H₂(2) — (78 ± 8) нм. Шероховатость поверхности электрода, модифицированного Н₂O/H₂(1), составляет (60 ± 5) нм, а Н₂O/H₂(2) — (268 ± 20) нм.

Дополнительно исследовали нанокомпозиты на основе различных сочетаний ВГО/Н₂O/H₂ методом СЭИ, что позволило провести их скрининг и выявить наилучшие сочетания. Согласно диаграммам Найквиста наилучшими сочетаниями являются ВГО-хитозан/H₂O/H₂(1) и ВГО-Н₂-Н₂/H₂O/H₂(2), которые обладают наименьшими значениями сопротивления переноса электрона (рис. 4), что впоследствии использовали при разработке биосенсоров.

Варьирование количества модификатора, наносимого на поверхность электрода, позволило установить, что максимальный аналитический сигнал (ток окисления пероксида водорода) наблюдается при использовании 1 мкл дисперсии

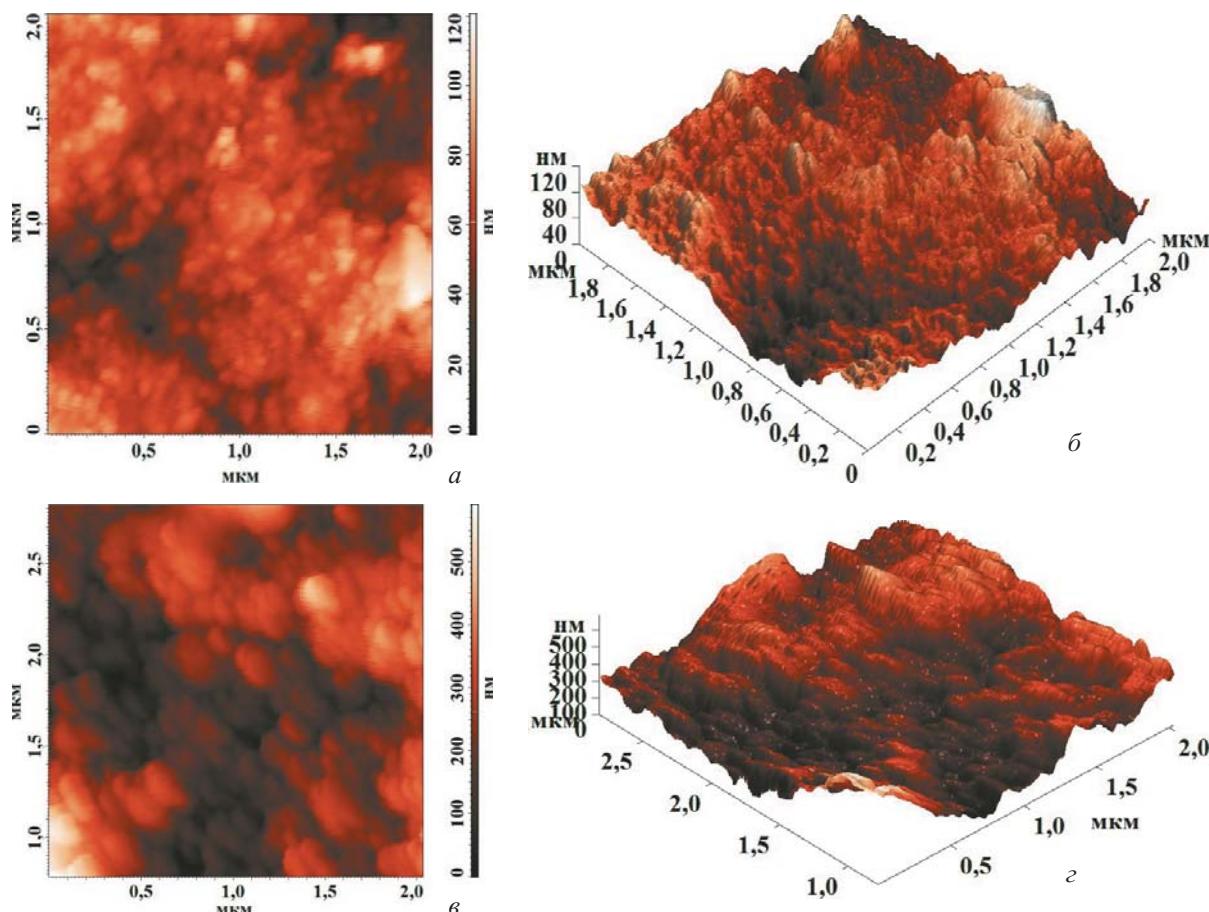


Рис. 2. Изображения в режиме топографии в 2D и 3D проекциях: поверхности электродов, модифицированных НЧСо(1) (*а, б*), НЧСо(2) (*в, г*), размер — 2,0 × 2,0 мкм

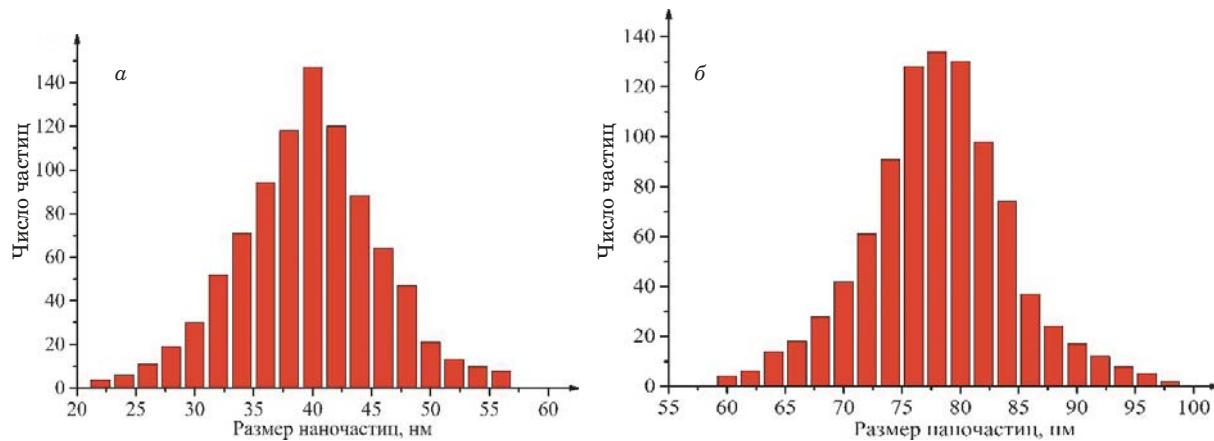


Рис. 3. Распределение по размеру: *а* — НЧСо(1); *б* — НЧСо(2)

ВГО в хитозане и H2O-NH₂ с концентрацией 1,5 мг/мл.

После модификации на поверхность электродов наносили раствор МАО в водном растворе H2O-NH₂.

Моноаминоксидаза относится к классу аминоксидаз [22] и катализирует реакции окислительно-дезаминирования различных моноаминов, в том числе, тирамина и др. Продуктами

этой биохимической реакции дезаминирования субстратов (моноаминов) в присутствии МАО являются соответствующий альдегид, пероксид водорода и аммиак. МАО-биосенсоры основаны на сочетании биохимической реакции и соответствующей реакции электроокисления пероксида водорода [21].

Согласно литературным данным и проведенным ранее исследованиям [23, 24] электрохими-

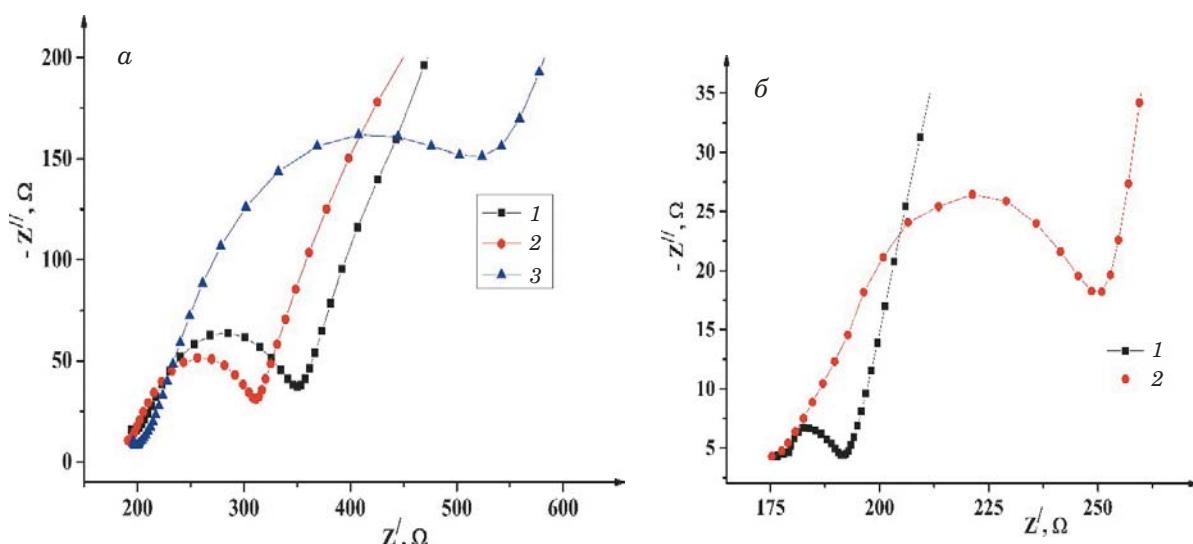
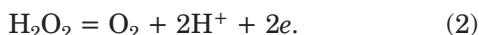


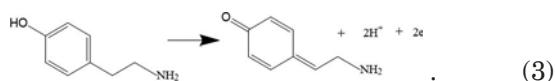
Рис. 4. Диаграммы Найквиста: 1 — ВГО-хитозан/НЧСо(2), 2 — ВГО-хитозан/НЧСо(1), 3 — ВГО-хитозан (а); 1 — ВГО-Н₂O-NH₂/НЧСо(2), 2 — ВГО-Н₂O-NH₂ (б)

ческое окисление H₂O₂ протекает по следующей схеме:



На фоне фосфатного буферного раствора (рН 7,0) на циклических вольтамперограммах наблюдается анодный пик в интервале от 0,35 до 0,45 В, что указывает на электрохимическую активность тирамина, а в области потенциалов от 0,7 до 0,75 В — пик, который можно отнести к процессу окисления пероксида водорода (рис. 5).

Электрохимическое окисление тирамина проходит по уравнению:



Этот процесс отражается на вольтамперограммах в виде необратимого пика при потенциале ~0,4 В. Наблюдающийся пик окисления связан со структурой тирамина как субстрата МАО и возможностью хинон-хиноидной перегруппировки в данных условиях.

Для изучения действия лекарственных веществ на каталитическую активность МАО использовали биосенсоры на основе немодифицированных электродов (биосенсор 1) и на основе модифицированных электродов:

биосенсор 2 — МАО-биосенсор на основе печатных графитовых электродов, модифицированных дисперсией графена в хитозане и наночастицами кобальта — ВГО-хитозан/НЧСо(1);

биосенсор 3 — МАО-биосенсор на основе печатных графитовых электродов, модифицированных дисперсией графена в H₂O-NH₂ и наночастицами кобальта — ВГО-Н₂O-NH₂/НЧСо(2).

Определение лекарственных веществ МАО-биосенсорами. В литературе описано ингибирующее действие трициклических антидепрессантов на каталитическую активность МАО [25]. Предыдущие исследования показали, что лекарственные вещества с антидепрессивным действием оказывают ингибирующее действие на каталитическую активность иммобилизованной МАО в составе биосенсоров [26–28]. Изучение влияния исследуемых лекарственных веществ на каталитическую активность иммобилизованной МАО (ИМАО) показало, что ток окисления пероксида водорода (аналитический сигнал) линейно зависит от их концентрации. Установлено, что присутствие лекарственных веществ приводит к уменьшению аналитического сигнала при потенциале 0,7 – 0,75 В (см. рис. 5, кривая 2), что указывает на их ингибирующее действие на каталитическую активность ИМАО.

Подбор рабочих условий функционирования биосенсора показал, что наилучший аналитический сигнал (наибольшая каталитическая активность МАО) для всех биосенсоров наблюдается при рН 7,0.

Аналитические характеристики разработанных МАО-биосенсоров представлены в табл. 2.

Полученные результаты показывают, что биосенсоры на основе модифицированных электродов обладают лучшими аналитическими характеристиками и имеют ряд преимуществ по сравнению с биосенсором 1 (см. табл. 2): более широкий диапазон рабочих концентраций, больший коэффициент чувствительности и улучшенный коэффициент корреляции.

В случае биосенсора 3 линейная зависимость тока окисления пероксида водорода наблюдается

в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-9}$ моль/л при более низком значении нижней границы определяемых содержаний (c_h) по сравнению с биосенсорами 1 и 2.

Аналитические характеристики биосенсора 3 при определении других лекарственных веществ приведены в табл. 3.

В результате модификации поверхности электродов нанокомпозитом ВГО-Н2О-NH₂/НЧСо(2) для МАО-биосенсора получаются более четко выраженные вольтамперограммы, улучшаются коэффициент корреляции и коэффициент чувствительности.

Для оценки правильности результатов определения лекарственных веществ использовали способ «введено – найдено» (табл. 4).

Для изучения действия матричных компонентов мочи рассматривали возможность определения флуоксетина на фоне раствора, содержащего вещества, обычно входящие в состав данной биологической жидкости (креатинин, мочевая кислота, мочевина, KCl, NaCl, MgSO₄ и CuSO₄) в количествах, отвечающих их среднему содержанию согласно литературным данным [29, 30]. Наибольшее влияние оказывает мочевая кислота, окисляющаяся в области 0,7 В. Для устранения ее мешающего действия использовали разбавление модельного раствора в 50 раз. Аналитические характеристики биосенсора 3 при определении флуоксетина представлены в табл. 5.

Правильность определения была оценена способом «введено – найдено». Погрешность определения не превышает 0,079 (S_r). Полученные результаты представлены в табл. 6.

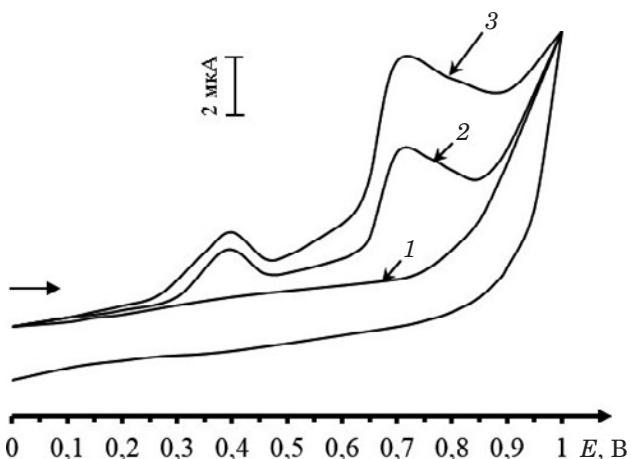


Рис. 5. Вольтамперограммы окисления продуктов ферментативного превращения субстрата МАО тирамина ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), полученные с использованием печатного графитового электрода, модифицированного ВГО-Н2О-NH₂/НЧСо(2) (биосенсор 3), в отсутствие (3) и в присутствии (2) флуоксетина ($1 \cdot 10^{-6}$ моль/л), фоновый электролит — фосфатный буферный раствор с рН 7,0 (1)

Как следует из данных табл. 6, модельный раствор урины достаточно адекватно отражает влияние сопутствующих компонентов на результаты определения флуоксетина.

Для сопоставления результатов определения лекарственных веществ применяли титриметрию как референтный метод в области концентраций $n \cdot 10^{-4}$ моль/л, поскольку концентрация до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л входит в диапазон определяемых содержаний как метода титриметрии, так и амперометрических биосенсоров 2 и 3 (см. табл. 2, 3). Приведенные в табл. 7 данные показывают, что полученные результаты равноточны

Таблица 2. Аналитические характеристики различных МАО-биосенсоров при определении флуоксетина (субстрат — тирамин, концентрация — $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $n = 5$; $P = 0,95$)

Тип биосенсора	Интервал концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \cdot (-\lg C)^*$			c_h , моль/л
		($A \pm \delta$)	($B \pm \delta$)	r	
Биосенсор 1	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-8}$	(15 ± 1)	($2,8 \pm 0,5$)	0,9824	$9 \cdot 10^{-9}$
Биосенсор 2	$1 \cdot 10^{-4} - 7 \cdot 10^{-9}$	(40 ± 3)	($4,2 \pm 0,3$)	0,9964	$9 \cdot 10^{-10}$
Биосенсор 3	$1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-9}$	(16 ± 1)	($8,5 \pm 0,8$)	0,9971	$7 \cdot 10^{-10}$

* $I = (I_1/I_0) \cdot 100\%$, где I_1 — величина аналитического сигнала (ток) в присутствии ингибитора, I_0 — ток в отсутствие ингибитора.

Таблица 3. Аналитические характеристики биосенсора 3 при определении ингибиторов МАО (концентрация субстрата тирамина — $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $n = 5$; $P = 0,95$)

Лекарственное вещество	Интервал концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$			c_h , моль/л
		($A \pm \delta$)	($B \pm \delta$)	r	
Сонопакс	$1 \cdot 10^{-4} - 6 \cdot 10^{-9}$	(44 ± 2)	($4,2 \pm 0,3$)	0,9913	$8 \cdot 10^{-10}$
Коаксил	$1 \cdot 10^{-4} - 7 \cdot 10^{-9}$	(38 ± 2)	($5,9 \pm 0,5$)	0,9858	$9 \cdot 10^{-10}$

Таблица 4. Результаты определения лекарственных веществ амперометрическим биосенсором 3 ($n = 5$; $P = 0,95$)

Лекарственное вещество	Введено, мг	Найдено, мг	S_r
Флуоксетин	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$(6,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	0,088
	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$(5,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	0,068
Сонопакс	$7,4 \cdot 10^{-5}$	$(6,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$	0,092
	$7,4 \cdot 10^{-4}$	$(7,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	0,055
Коаксил	$8,7 \cdot 10^{-5}$	$(9,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	0,087
	$8,7 \cdot 10^{-4}$	$(9,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	0,075

($F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$) и вклад систематической погрешности незначим ($t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$).

Методика определения флуоксетина в лекарственных препаратах. Таблетку препарата растирали в ступке до однородного мелкодисперсного состояния. Добавляли небольшое количество этилового спирта (5 мл), так как соответствующие субстанции хорошо растворяются в воде и этаноле [25], и примерно 10 мл дистиллированной воды. Полученный раствор перемешивали и центрифугировали 15 мин при скорости 7000 мин⁻¹. Получившийся прозрачный раствор переносили в мерную колбу на 25 мл. Оставшийся осадок обрабатывали 10 мл дистиллированной воды и еще раз центрифугировали при тех же

условиях. Прозрачный раствор добавляли в ту же мерную колбу на 25 мл и доводили его объем водой до метки. Из этого раствора готовили рабочие образцы для определения флуоксетина титриметрически и с помощью МАО-биосенсора 3.

В ячейку на 2 мл с МАО-биосенсором вносили 1600 мкл фосфатного буферного раствора с pH 7,0, добавляли 200 мкл раствора лекарственного препарата соответствующей концентрации. Время инкубации — 5 мин, затем добавляли 200 мкл $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора тирамина. Через 10 мин регистрировали ток окисления пероксида водорода при потенциале 0,7 – 0,75 В. Измеряли величину отклика биосенсора при этих потенциалах. Концентрацию препарата определяли по соответствующему градуировочному графику (см. табл. 2).

Методика определения флуоксетина в урине и ее модельном растворе. В ячейку на 2 мл с МАО-биосенсором вносили 1600 мкл разбавленной мочи (в фосфатном буферном растворе с pH 7,0), добавляли 200 мкл раствора лекарственного препарата соответствующей концентрации. Остальные условия описаны выше. Концентрацию препарата определяли по соответствующему градуировочному графику (см. табл. 5).

Таким образом, в целях создания амперометрических моноаминооксидазных биосенсоров использованы нанокомпозиты на основе дисперсий ВГО в хитозане или аминопроизводных на плат-

Таблица 5. Аналитические характеристики МАО-биосенсора 3 при определении флуоксетина (область рабочих концентраций — $1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-9}$ моль/л; $n = 5$; $P = 0,95$)

Исследуемый раствор	Уравнение градуировочной зависимости $I = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \cdot (-\lg C)$			$c_{\text{нр}}$, моль/л
	$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r	
Урина	(11 ± 1)	$(9,3 \pm 0,9)$	0,9827	$9 \cdot 10^{-10}$
Модельный раствор урины	(14 ± 1)	$(9,0 \pm 0,9)$	0,9953	$8 \cdot 10^{-10}$

Таблица 6. Результаты определения флуоксетина МАО-биосенсором 3 ($n = 5$; $P = 0,95$)

Исследуемый раствор	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
Урина	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	0,079
	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$(6,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	0,062
Модельный раствор урины	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	0,076
	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$(6,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	0,068
Фосфатный буферный раствор	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$(6,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	0,065
	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$(6,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	0,061

Таблица 7. Результаты определения флуоксетина (20 мг, $C = 3,5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл) в лекарственном препарате методом титриметрии и с помощью МАО-биосенсора 3 ($n = 5$; $P = 0,95$)

Метод определения	$(x \pm \delta) \cdot 10^{-2}$, мг/мл	S_r	t		F	
			табл.	расч.	табл.	расч.
Кислотно-основное титрование	$3,20 \pm 0,01$	0,0034	2,78	1,87	6,39	3,68
МАО-биосенсор 3	$3,3 \pm 0,1$	0,0332				

форме полиэфирополиола H2O-NH₂ и наночастиц кобальта для модификации печатных графитовых электродов. Получение НЧСо осуществляли электрохимически в режиме хроноамперометрии при разном времени накопления. Наличие НЧСо на поверхности электродов доказано методом АСМ, при этом размеры НЧСо составляют (40 ± 2) и (78 ± 8) нм в зависимости от времени их электрохимического накопления на поверхности электродов. Для определения лекарственных веществ в препаратах предложены два новых типа МАО-биосенсоров, среди которых лучшими аналитическими характеристиками при определении лекарственных веществ тианептина, тиоридазина и флуоксетина обладал биосенсор на основе ВГО-H2O-NH₂/НЧСо. Показаны аналитические возможности предлагаемых биосенсоров для контроля содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях (урине) до уровня (8 – 9) · 10⁻¹⁰ моль/л.

ЛИТЕРАТУРА

- Kokkinos C., Economou A., Prodromidis M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies / Trends Anal. Chem. 2016. Vol. 79. P. 88 – 105.
- Li F., Li Y., Feng J., et al. Ultrasensitive amperometric immunosensor for PSA detection based on Cu₂O@CeO₂-Au nanocomposites as integrated triple signal amplification strategy / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 630 – 637.
- Çeviketal E., Bahar Ö., Senel M., et al. Construction of novel electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using ferrocene-PAMAM dendrimers / Biosens. Bioelectron. 2016. Vol. 86. P. 1074 – 1079.
- De Jesus D. S., Couto C. M. C. M., Araujo A. N., et al. Amperometric biosensor based on monoamine oxidase (MAO) immobilized in sol/gel film for benzylamine determination in pharmaceuticals / J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. Vol. 33. N 5. P. 983 – 990.
- Sharma S., Raghav R., O'Kennedy R., et al. Advances in ovarian cancer diagnosis: A journey from immunoassays to immunosensors / Enzyme Microb. Technol. 2016. Vol. 89. P. 15 – 30.
- Lin C.-H., Wu C.-C., Kuo Y.-F. A high sensitive impedimetric salbutamol immunosensor based on the gold nanostructure-deposited screen-printed carbon electrode / J. Electroanal. Chem. 2016. Vol. 768. P. 27 – 33.
- Feng J., Li Y., Li M., et al. A novel sandwich-type electrochemical immunosensor for PSA detection based on PtCu bimetallic hybrid (2D/2D) rGO/g-C₃N₄ / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 91. P. 441 – 448.
- Zhu Q., Liu H., Zhang J., et al. Ultrasensitive QDs based electrochemiluminescent immunosensor for detecting ractopamine using AuNPs and Au nanoparticles@PDDA-graphene as amplifier / Sens. Actuators B. 2017. Vol. 243. P. 121 – 129.
- Zhang X., Ding S.-N. Sandwich-structured electrogenerated chemiluminescence immunosensor based on dual-stabilizers-capped CdTe quantum dots as signal probes and Fe₃O₄-Au nanocomposites as magnetic separable carriers / Sens. Actuators B. 2017. Vol. 240. P. 1123 – 1133.
- Roushani M., Valipour A. Using electrochemical oxidation of Rutin in modeling a novel andsensitive immunosensor based on Pt nanoparticle and graphene-ionicliquid-chitosan nanocomposite to detect human chorionic gonadotropin / Sens. Actuators B. 2016. Vol. 222. P. 1103 – 1111.
- Wang Y., Fan D., Wu D., et al. Simple synthesis of silver nanoparticles functionalized cuprous oxide nanowires nanocomposi-
- tes and its application in electrochemical immunosensor / Sens. Actuators B. 2016. Vol. 236. P. 241 – 248.
- Wang S., Lu L., Yang M., et al. A novel cobalt hexacyanoferrate nanocomposite on CNT scaffold by seed medium and application for biosensor / Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 651. P. 220 – 226.
- Lee H. U., Park C., Kim S. W. Immobilization of glucose oxidase onto cobalt based on silica core/shell nanoparticles as carrier / Process Biochem. 2012. Vol. 47. P. 1282 – 1286.
- Shahrokhan S., Ghalkhani M., Adeli M., et al. Multi-walled carbon nanotubes with immobilised cobalt nanoparticle for modification of glassy carbon electrode: Application to sensitive voltammetric determination of thioridazine / Biosens. Bioelectron. 2009. Vol. 24. P. 3235 – 3241.
- Li T., Yang M., Li H. Label-free electrochemical detection of cancer marker based on graphene-cobalt hexacyanoferrate nanocomposite / J. Electroanal. Chem. 2011. Vol. 655. P. 50 – 55.
- Bollella P., Fusco G., Tortolini C., et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 89. P. 152 – 166.
- Pinto T. da S., Alves L. A., Cardozo G. de A., et al. Layer-by-layer self-assembly for carbon dots/chitosan-based multilayer: Morphology, thickness and molecular interactions / Mater. Chem. Phys. 2017. Vol. 186. P. 81 – 89.
- Wang N., Pandit S., Ye L., et al. Efficient surface modification of carbon nanotubes for fabricating high performance CNT based hybrid nanostructures / Carbon. 2017. Vol. 111. P. 402 – 410.
- Wisitsoraat A., Mensing J. Ph., Karuwan C., et al. Printed organo-functionalized graphene for biosensing applications / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 7 – 17.
- Benchettara A., Benchettara A. Electrochemical sensor based on nanoparticles of cobalt oxides for determination of glucose / Mater. Today: Proc. 2015. Vol. 2. P. 4212 – 4216.
- Медянцева Э. П., Брусицын Д. В., Варламова Р. М. и др. Амперометрическиеmonoаминоксидазные биосенсоры на основе графитовых электродов и оксида графена как модификатора поверхности для определения некоторых антидепрессантов / Аналитика и контроль. 2014. Т. 18. № 4. С. 442 – 450.
- Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. — М.: Медицина, 1981. — 336 с.
- Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. — Вильнюс: Мокслас, 1981. — 200 с.
- Брусицын Д. В., Медянцева Э. П., Варламова Р. М. и др. Амперометрическое определение антидепрессантов monoаминооксидазными биосенсорами на основе углеродных нанотрубок и наночастиц серебра как химических модификаторов / Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2014. Т. 156. Кн. 2. С. 37 – 50.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М.: Новая Волна, 2017. — 1216 с.
- Медянцева Э. П., Брусицын Д. В., Варламова Р. М. и др. Возможности амперометрических monoаминооксидазных биосенсоров на основе модифицированных многостенных углеродными нанотрубками графитовых печатных электродов для определения некоторых антидепрессантов / Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 5. С. 470 – 475.
- Медянцева Э. П., Брусицын Д. В., Варламова Р. М. и др. Влияниеnanoструктурированных материалов как модификаторов поверхности электродов на аналитические возможности амперометрических биосенсоров / Журн. прикл. химии. 2015. Т. 87. № 1. С. 45 – 54.
- Брусицын Д. В., Медянцева Э. П., Варламова Р. М. и др. Углеродные наноматериалы как модификаторы поверхности электродов при разработке амперометрических monoаминооксидазных биосенсоров / Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2015. Т. 81. № 6. С. 21 – 27.
- Шайдарова Л. Г., Челюкова И. А., Романова Е. И. и др. Совместное вольтамперометрическое определение дофамина и мочевой кислоты на электроде, модифицированном самоорганизующимся монослоем цистамина с наночастицами золота / Журн. прикл. химии. 2011. Т. 84. № 2. С. 222 – 228.

30. **Данилова Л. А.** Анализы крови и мочи. — СПб.: Салит-Медкнига, 2003. — 128 с.

REFERENCES

1. Kokkinos C., Economou A., Prodromidis M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies / Trends Anal. Chem. 2016. Vol. 79. P. 88 – 105.
2. Li F., Li Y., Feng J., et al. Ultrasensitive amperometric immunosensor for PSA detection based on $\text{Cu}_2\text{O}@\text{CeO}_2\text{-Au}$ nanocomposites as integrated triple signal amplification strategy / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 630 – 637.
3. Çeviketal E., Bahar Ö., Şenel M., et al. Construction of novel electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using ferrocene-PAMAM dendrimers / Biosens. Bioelectron. 2016. Vol. 86. P. 1074 – 1079.
4. De Jesus D. S., Couto C. M. C. M., Araujo A. N., et al. Amperometric biosensor based on monoamine oxidase (MAO) immobilized in sol/gel film for benzylamine determination in pharmaceuticals / J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. Vol. 33. N 5. P. 983 – 990.
5. Sharma S., Raghav R., O'Kennedy R., et al. Advances in ovarian cancer diagnosis: A journey from immunoassays to immunosensors / Enzyme Microb. Technol. 2016. Vol. 89. P. 15 – 30.
6. Lin C.-H., Wu C.-C., Kuo Y.-F. A high sensitive impedimetric salbutamol immunosensor based on the gold nanostructure-deposited screen-printed carbon electrode / J. Electroanal. Chem. 2016. Vol. 768. P. 27 – 33.
7. Feng J., Li Y., Li M., et al. A novel sandwich-type electrochemical immunosensor for PSA detection based on PtCu bimetallic hybrid (2D/2D) rGO/g-C₃N₄ / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 91. P. 441 – 448.
8. Zhu Q., Liu H., Zhang J., et al. Ultrasensitive QDs based electrochemiluminescent immunosensor for detecting ractopamine using AuNPs and Au nanoparticles@PDDA-graphene as amplifier / Sens. Actuators B. 2017. Vol. 243. P. 121 – 129.
9. Zhang X., Ding S.-N. Sandwich-structured electrogenerated chemiluminescence immunosensor based on dual-stabilizers-capped CdTe quantum dots as signal probes and Fe₃O₄-Au nanocomposites as magnetic separable carriers / Sens. Actuators B. 2017. Vol. 240. P. 1123 – 1133.
10. Roushani M., Valipour A. Using electrochemical oxidation of Rutin in modeling a novel andsensitive immunosensor based on Pt nanoparticle and graphene-ionicliquid-chitosan nanocomposite to detect human chorionic gonadotropin / Sens. Actuators B. 2016. Vol. 222. P. 1103 – 1111.
11. Wang Y., Fan D., Wu D., et al. Simple synthesis of silver nanoparticles functionalized cuprous oxide nanowires nanocomposites and its application in electrochemical immunosensor / Sens. Actuators B. 2016. Vol. 236. P. 241 – 248.
12. Wang S., Lu L., Yang M., et al. A novel cobalt hexacyanoferrate nanocomposite on CNT scaffold by seed medium and application for biosensor / Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 651. P. 220 – 226.
13. Lee H. U., Park C., Kim S. W. Immobilization of glucose oxidase onto cobalt based on silica core/shell nanoparticles as carrier / Process Biochem. 2012. Vol. 47. P. 1282 – 1286.
14. Shahrokhian S., Ghalkhani M., Adeli M., et al. Multi-walled carbon nanotubes with immobilised cobalt nanoparticle for modification of glassy carbon electrode: Application to sensitive voltammetric determination of thioridazine / Biosens. Bioelectron. 2009. Vol. 24. P. 3235 – 3241.
15. Li T., Yang M., Li H. Label-free electrochemical detection of cancer marker based on graphene-cobalt hexacyanoferrate nanocomposite / J. Electroanal. Chem. 2011. Vol. 655. P. 50 – 55.
16. Bollella P., Fusco G., Tortolini C., et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 89. P. 152 – 166.
17. Pinto T. da S., Alves L. A., Cardozo G. de A., et al. Layer-by-layer self-assembly for carbon dots/chitosan-based multilayer: Morphology, thickness and molecular interactions / Mater. Chem. Phys. 2017. Vol. 186. P. 81 – 89.
18. Wang N., Pandit S., Ye L., et al. Efficient surface modification of carbon nanotubes for fabricating high performance CNT based hybrid nanostructures / Carbon. 2017. Vol. 111. P. 402 – 410.
19. Wisitsoraat A., Mensing J. Ph., Karuwan C., et al. Printed organo-functionalized graphene for biosensing applications / Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 7 – 17.
20. Benchettara A., Benchettara A. Electrochemical sensor based on nanoparticles of cobalt oxides for determination of glucose / Mater. Today: Proc. 2015. Vol. 2. P. 4212 – 4216.
21. Medyantseva É. P., Brusnitsyn D. V., Varlamova R. M., et al. Monoamine oxidase amperometric biosensor based on graphite electrodes and graphene oxide as a surface modifier for the determination of some antidepressants / Analitika Kontrol'. 2014. Vol. 18. N 4. P. 442 – 450 [in Russian].
22. Gorkin V. Z. Aminoksidazes and their importance in medicine. — Moscow: Meditsina, 1981. — 336 p. [in Russian].
23. Kulis Yu. Yu. Analytical systems based on immobilized enzymes. — Vilnius: Moksolas, 1981. — 200 p. [in Russian].
24. Brusnitsyn D. V., Medyantseva É. P., Varlamova R. M., et al. Amperometric determination of antidepressants using monoaminooxidase amperometric biosensors based screen-printed electrodes with multi-walled carbon nanotubes and nanoparticles of silver / Uch. Zap. Kazan. Univ. Ser. Estestv. Nauki. 2014. Vol. 156. Book 2. P. 37 – 50 [in Russian].
25. Mashkovskii M. D. Drug substance. — Moscow: Novaya Volna, 2017. — 1216 p. [in Russian].
26. Medyantseva E. P., Brusnitsyn D. V., Varlamova R. M., et al. Capabilities of amperometric monoamine oxidase biosensors based on screen-printed graphite electrodes modified with multiwall carbon nanotubes in the determination of some antidepressants / J. Anal. Chem. 2015. Vol. 70. N 5. P. 535 – 539.
27. Medyantseva E. P., Brusnitsyn D. V., Varlamova R. M., et al. Effect of nanostructured materials as electrode surface modifiers on the analytical capacity of amperometric biosensors / Russ. J. Appl. Chem. 2015. Vol. 88. N 1. P. 40 – 49.
28. Brusnitsyn D. V., Medyantseva E. P., Varlamova R. M., et al. Carbon nanomaterials as electrode surface modifiers in development of amperometric monoamino oxidase biosensors / Inorg. Mater. 2016. Vol. 52. N 14. P. 1413 – 1419.
29. Shaidarova L. G., Chelnokova I. A., Romanova E. I., et al. Joint voltammetric determination of dopamine and uric acid / Russ. J. Appl. Chem. 2011. Vol. 84. N 2. P. 218 – 224.
30. Danilova L. A. Blood and urine tests. — St. Petersburg: Salit-Medkniga, 2003. — 128 p. [in Russian].