

АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ И ОКСИДА ГРАФЕНА КАК МОДИФИКАТОРА ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

**Э.П. Медянцева, Д.В. Брусницын, Р.М. Варламова,
Р.Р. Ситдикова, А.Н. Галявина, Г.К. Будников**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Химический институт им. А.М. Бутлерова
420008, Российская Федерация, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.
Elvina.Medyantseva@kpfu.ru*

Поступила в редакцию 22 июля 2014 г.,
после доработки – 17 сентября 2014 г.

Предложено использовать наноструктурированный материал оксид графена (ГО) в качестве модификатора поверхности планарных печатных графитовых электродов как основы амперометрических биосенсоров с иммобилизованной моноаминоксидазой для определения антидепрессантов («Мелипрамин», «Коаксил» и «Феназепам»). Функционирование предлагаемых биосенсоров основано на ингибирующей способности антидепрессантов воздействовать на каталитическую активность иммобилизованного фермента. Сопоставлены аналитические возможности предлагаемых биосенсоров с биосенсорами на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками в хитозане и ДМФА. Предложенные биосенсоры можно использовать для контроля как остаточных количеств лекарственных препаратов в биологических жидкостях (урина) на уровне $9 \cdot 10^{-9}$ М, так и лекарственного вещества в лекарственных формах.

Ключевые слова: биосенсор, оксид графена, углеродные нанотрубки, хитозан, антидепрессанты, моноаминоксидаза, биологическая жидкость.

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Область научных интересов: электроаналитическая химия, ферментативный катализ, биосенсоры, электрокаталитические процессы, иммунохимический анализ.

Автор более 160 опубликованных работ.

Брусницын Даниил Владимирович – аспирант кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Варламова Регина Марковна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Область научных интересов: амперометрические биосенсоры, иммунохимический анализ, анализ объектов окружающей среды, пищевых продуктов, лекарственных препаратов.

Автор 30 опубликованных работ.

Ситдикова Ралина Раисовна – студент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Галявина Альфия Наильевна – студент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор, академик МАНВШ, член-корреспондент РАЕН, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Область научных интересов: электрохимические методы анализа, биосенсоры, модифицированные электроды, экоаналитический контроль.

Автор более 800 опубликованных работ.

ВВЕДЕНИЕ

Для контроля качества лекарственных препаратов в настоящее время чаще всего применяют различные варианты хроматографии [1-3]. Однако применение биосенсорных технологий как более быстрых и, в ряде случаев, менее трудоемких, чем традиционные методы определения лекарственных препаратов, составляет достойную альтернативу этим методам [4-6]. Особенно, если применяют биосенсоры, полученные с использованием современных наноструктурированных материалов. Поэтому разработка новых биосенсоров с использованием таких подходов является актуальной задачей.

Использование антидепрессантов (**АД**) для лечения депрессивных состояний человека и контроль за их применением в связи с широким распространением этих препаратов во всем мире является сегодня одной из насущных проблем аналитической химии. И один из путей решения этой проблемы – применение разработанных биосенсоров. Из литературы известно [7], что некоторые АД оказывают ингибирующее действие на моноаминоксидазу (**МАО**). В то же время примеры потенциометрических [8] и амперометрических [9] моноаминоксидазных биосенсоров в настоящее время единичны, к тому же предназначены они не для определения АД.

Внедрение в технологию изготовления ферментных сенсоров различных углеродных наноструктурированных материалов, таких как оксид графена (**ГО**), в качестве модификатора поверхности электродов, можно предположить, приведет к получению аналитических устройств с улучшенными аналитическими характеристиками.

Графен в отличие от оксида графена не имеет ни четкой границы поглощения, ни отчетливой запрещенной зоны. В оксиде графена за счёт дефектов в поликристаллической структуре (различных химических и физических неоднородностей и окисленных функциональных групп) возникает значительная запрещенная зона, что приводит к лучшим электропроводящим свойствам по сравнению с обычным графеном и появлению оптического поглощения, и это позволяет использовать ГО не только в биосенсорных технологиях, но и в промышленности [10]. Если углеродные нанотрубки – материал, который уже завоевал признание

при разработке различных сенсоров [11-13], то ГО получил свое активное развитие лишь в последнее время [14, 15].

Цель исследования – разработка новых амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных оксидом графена для контроля содержания антидепрессантов в лекарственных препаратах и биологических жидкостях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве основы биосенсоров использовали планарные печатные графитовые электроды, описываемые как система «три в одном» (изготовлены на кафедре аналитической химии КФУ), состоящие из рабочего, вспомогательного электродов (графитовые чернила фирмы «Gwent Electronic Materials», США) и электрода сравнения (паста Ag/AgCl), полученные на полимерной подложке методом трафаретной печати. Все измерения проводили с использованием потенциостата/гальваностата «μAutolab type III» (фирмы «Eco Chemie B.V.», Netherlands).

Фосфатные буферные растворы с pH от 6.0 до 8.2 готовили из препаратов марки «ч.» и «ч.д.а.» (ЗАО «Лаверна», Россия). В работе была использована центрифуга марки «MiniSpin» (фирмы «Eppendorf», Германия). Для получения дисперсий наноструктурированных материалов (многостенных углеродных нанотрубок – **МУНТ** и **ГО**) в различных растворителях применяли ультразвуковую ванну (**УЗ**) модель «WUC-A03H» фирмы «WiseClean» (Korea).

Субстратами моноаминоксидазы служили дофамин (фирма «Дофамин-Ферейн», Россия – раствор для инъекций 4 %) и серотонин (фирма «Sigma-Aldrich», США). Использовали: имипрамин, тианептин и феназепам – «Sigma-Aldrich» (США), их структурные формулы приведены на рис. 1. Применяли МАО, полученную из печени свиньи (гомогенат) с удельной активностью 0.078 мкм/мин·мг относительно дофамина.

Матричным материалом для иммобилизации фермента (**МАО**) на графитовые электроды, модифицированные МУНТ, служил водный раствор БСА (фирмы «Reanal», Венгрия) или хитозан «х.ч.» (ГО). Применяли 12.5 %-й водный раствор глутарового альдегида фирмы «ICN Biomedicals Ins.» (США).

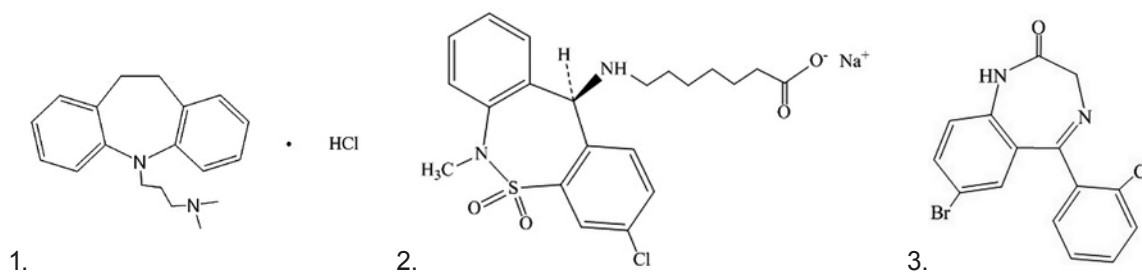


Рис. 1. Структурные формулы лекарственных веществ: 1 – имипрамин – N-(3-диметиламинопропил)-иминодобензила гидрохлорид; 2 – тианептин – R, S – 7 [(3-хлор-6,11-дигидро-6-метилдобензол[с, f][1,2]тиазепин-11-ил)амино]гептановой кислоты S,S-диоксид; 3 – феназепам – 7-бром-5-(2-хлорфенил)-1,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он

В качестве модификаторов поверхности применяли МУНТ и ГО («Sigma-Aldrich», США). МУНТ имели внутренний диаметр 10-15 нм (линейные размеры 1-10 мкм) производства «Sigma-Aldrich». В качестве растворителей МУНТ использовали диметилформамид (ДМФА) [16] марки «х.ч.» и хитозан «х.ч.» в 0.5 %-й CH_3COOH [17], для оксида графена – хитозан в 0.75 %-й CH_3COOH .

Для получения дисперсий МУНТ в растворителях и ГО в хитозане применяли УЗ с частотой 40 КГц. Электроды, модифицированные МУНТ в хитозане или ДМФА, и ГО в хитозане, высушивали при комнатной температуре (20 ± 2 °С) не менее суток.

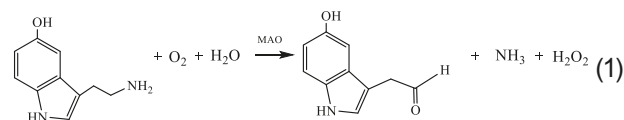
Получение биочувствительной части.

Для получения биочувствительной части биосенсора на поверхность рабочего электрода (модифицированного МУНТ в ДМФА или хитозане, ГО в хитозане) наносили смесь, содержащую раствор фермента, водный раствор БСА (для биосенсора, модифицированного МУНТ в ДМФА или хитозане) или хитозан (для биосенсора, модифицированного ГО в хитозане), фосфатный буфер (pH = 7.5), и 1 %-й водный раствор глутарового альдегида. После энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом биосенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при температуре $t = +4$ °С. На следующий день биосенсоры промывали водой и после высушивания на воздухе хранили в холодильнике. Полученный биосенсор на основе MAO сохранял каталитическую активность фермента в течение месяца с погрешностью не более 5-6 %.

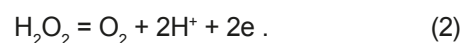
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моноаминоксидаза, как фермент класса аминоксидаз [18], катализирует реакции окислительно-дезаминирования различных моноаминов, в том числе серотонина и дофамина. Продуктами реакций окислительного дезаминирования субстратов в

присутствии MAO являются соответствующий альдегид, H_2O_2 и NH_3 . Биохимическая реакция окислительного дезаминирования моноаминов на примере серотонина протекает по схеме (1). Предлагаемые моноаминоксидазные биосенсоры (MAO-биосенсоры) основаны на сочетании реакции окислительного дезаминирования моноаминов и соответствующей реакции электроокисления одного из продуктов этой реакции, а именно, H_2O_2 (2).



Согласно литературным данным [19], электрохимическое окисление H_2O_2 протекает по схеме (2):



Изучение электрохимического поведения дофамина, серотонина и адреналина на графитовых печатных электродах, модифицированных МУНТ и ГО, показало, что на фоне фосфатного буферного раствора с pH = 7.0 на циклических вольтамперограммах в интервале от 0 до 1 В наблюдается анодный пик (рис. 2, а) окисления субстратов MAO. Пик окисления, наблюдающийся в интервале от 0.15 до 0.55 В, связан с особенностями структуры данных соединений (возможность хинон-хиноидной перегруппировки).

Электрохимическое окисление серотонина протекает по схеме (3), что отражается в виде необратимого пика при потенциале 0.4 В.

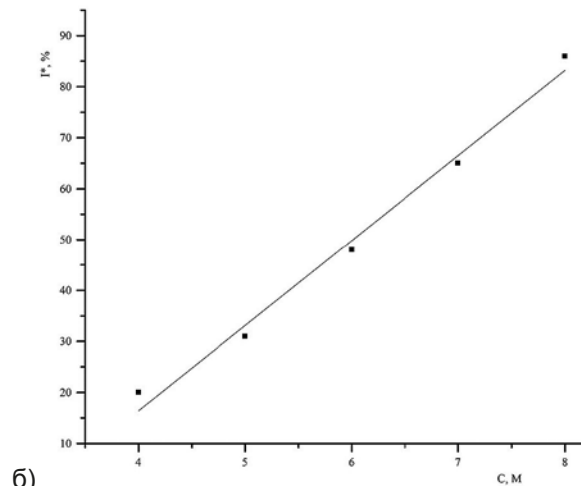
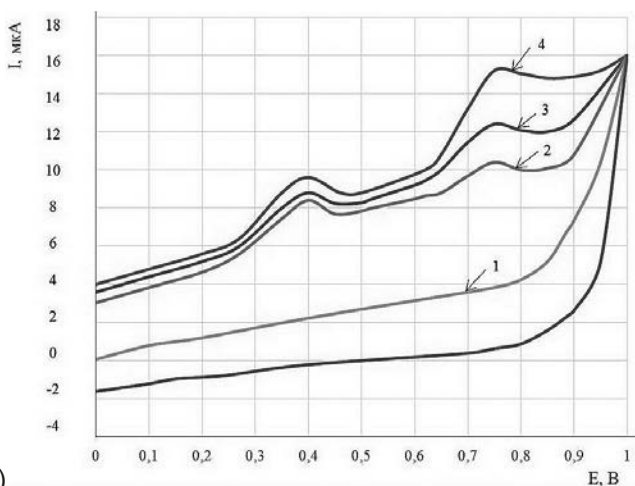
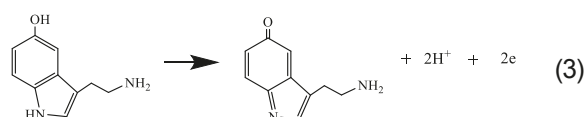


Рис. 2. а) Вольтамперограммы, полученные на MAO-биосенсоре третьего типа. 1 – 0.07 М фосфатный буферный раствор (pH = 7.0); 2 – фосфатный буферный раствор в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М серотонина и $1 \cdot 10^{-6}$ М тианептина; 3 – то же самое в присутствии $1 \cdot 10^{-7}$ М тианептина; 4 – в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М серотонина. б) Градуировочная зависимость для определения тианептина (MAO-биосенсор третьего типа, субстрат серотонин - $1 \cdot 10^{-3}$ М)

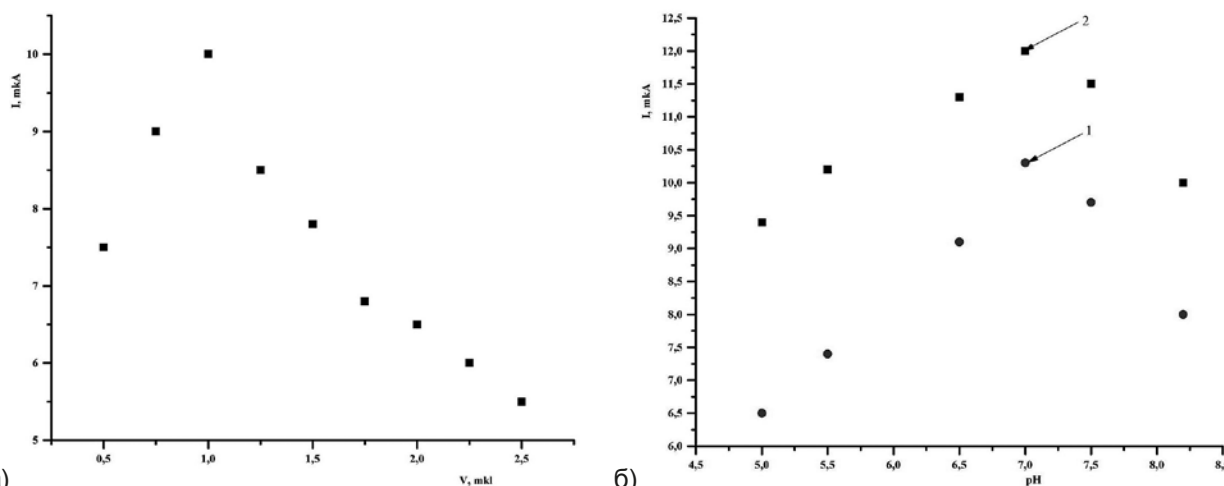


Рис. 3. а) Зависимость величины аналитического сигнала (ток окисления пероксида водорода) от количества ГО; б) Зависимость величины аналитического сигнала от pH буферных растворов для биосенсора два (кривая 1) и три (кривая 2) типов в системе фермент – субстрат – ингибитор MAO: MAO – дофамин – феназепам

На MAO-биосенсоре при потенциалах 0.7-0.75 В наблюдается дополнительный пик, который можно отнести к процессу окисления H_2O_2 . Этот пик контролируется кинетикой электродного процесса согласно критерию Семерано ($\Delta I_g / \Delta I_g V = 0.29$), где I – ток, измеряемый при потенциале пика, мкА; V – скорость наложения потенциала, В/с.

При разработке амперометрических биосенсоров варьировали количество ГО, наносимое на рабочую поверхность электродов методом капельного испарения. Количество ГО на поверхности электрода изменяли от 0.5 до 2 мкл при концентрации исходного раствора 0.5-1.9 мг/мл в хитозане. Установлено, что максимальная величина тока окисления H_2O_2 наблюдается при концентрации ГО $C_{ГО} = 1.75$ мг/мл и количестве 1 мкл (рис. 3, а), т.е. содержание ГО составляло 0.025 мг/см².

Количество МУНТ на поверхности электрода изменяли от 2.5 до 0.5 мкл при концентрации исходного раствора 1 мг/мл в ДМФА или хитозане. Установлено, что максимальная величина аналитического сигнала (ток окисления H_2O_2) наблюдалась при использовании 1 мкл раствора МУНТ, т.е. содержание МУНТ составляло 0.014 мг/см². Именно такая концентрация обеспечивала получение наилучших аналитических характеристик разрабатываемых биосенсоров, поэтому в дальнейшем использовали такое количество раствора МУНТ.

Для изучения действия АД на каталитическую активность MAO использовали три типа биосенсоров (табл. 1).

Влияние эфффекторов иммобилизованной MAO. Согласно литературным данным [7], лекарственные препараты, относящиеся к классу

АД, являются блокаторами действия MAO. В то же время нами ранее показано [19, 20], что лекарственные препараты, относящиеся к трициклическим АД, оказывают ингибирующее действие на каталитическую активность и иммобилизованной MAO (ИМАО). Изучение влияния исследуемых АД на каталитическую активность ИМАО показало, что ток окисления H_2O_2 (0.7-0.75 В) линейно зависит от концентрации в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ ($1 \cdot 10^{-5}$) до $1 \cdot 10^{-8}$ М. При этом в присутствии АД аналитический сигнал уменьшается (рис. 2, а), что указывает на их ингибирующее действие на каталитическую активность ИМАО. Поэтому в качестве аналитического сигнала использовали ток окисления H_2O_2 как продукта окислительного дезаминирования соответствующих субстратов MAO [20].

Было установлено, что наилучшие условия получения аналитического сигнала в диапазоне pH от 6.0 до 8.2 наблюдаются при pH = 7.0 для всех типов биосенсоров (рис. 3, б). Опасность самопроизвольного окисления биогенных аминов в щелочной области и сохранение достаточной величины каталитической активности ИМАО, что необходимо для получения хорошо выраженного аналитического сигнала, обуславливают выбор pH для последующих измерений.

Сопоставление аналитических возможностей разных типов биосенсоров показало, что лучшие аналитические характеристики наблюдались в случае MAO-биосенсоров третьего типа (дисперсия ГО в хитозане). Предлагаемые биосенсоры третьего типа имеют ряд преимуществ по сравнению с биосенсорами первого и второго типов на основе первичных преобразователей, модифици-

Таблица 1

Разработанные биосенсоры

Тип биосенсора	Модификатор	Биочувствительная часть
Первый	МУНТ в ДМФА	БСА
Второй	МУНТ в хитозане	БСА
Третий	ГО в хитозане	Хитозан

Таблица 2

Аналитические возможности различных типов МАО-биосенсоров для определения имиπραмина. Субстрат – дофамин, $c_s = 1 \cdot 10^{-3}$ М ($n = 5$, $P = 0.95$)

Тип биосенсора	Интервал рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \lg C$			c_H , моль/л
		$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r	
Первый	$1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-8}$	(2.5 ± 0.2)	(5.6 ± 0.5)	0.9825	$9 \cdot 10^{-9}$
Второй	$1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-8}$	(4.2 ± 0.3)	(18 ± 1)	0.9884	$8 \cdot 10^{-9}$
Третий	$1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-8}$	(13.7 ± 0.9)	(32 ± 2)	0.9895	$6 \cdot 10^{-9}$

Примечания: $I^* = (I_i/I_0) \cdot 100\%$, где I_i - величина аналитического сигнала (ток) в присутствии ингибитора, I_0 - ток в отсутствие ингибитора.

Таблица 3

Аналитические возможности разных типов биосенсоров для определения ингибиторов МАО в интервале $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ М, $c_s = 1 \cdot 10^{-3}$ М ($n = 5$; $P = 0.95$)

Биосенсор	Лекарственное вещество/ суб-страт	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \lg C$			c_H , моль/л
		$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r	
Второго типа (МУНТ)	Имипрамин/серотонин	(3.1 ± 0.3)	(12.2 ± 0.9)	0.9975	$7 \cdot 10^{-9}$
	Тианептин/дофамин	(2.3 ± 0.1)	(8.7 ± 0.8)	0.9892	$8 \cdot 10^{-9}$
	Тианептин/серотонин	(1.8 ± 0.1)	(15.1 ± 0.9)	0.9844	$7 \cdot 10^{-9}$
	Феназепам/дофамин	(2.7 ± 0.2)	(9.4 ± 0.8)	0.9982	$9 \cdot 10^{-9}$
	Феназепам/серотонин	(1.4 ± 0.1)	(10.5 ± 0.9)	0.9963	$8 \cdot 10^{-9}$
Третьего типа (ГО)	Тианептин/серотонин	(19.4 ± 0.9)	(50 ± 3)	0.9912	$8 \cdot 10^{-9}$
	Феназепам/дофамин	(27 ± 2)	(93 ± 6)	0.9901	$6 \cdot 10^{-9}$
	Феназепам/серотонин	(12.6 ± 0.9)	(44 ± 2)	0.9895	$4 \cdot 10^{-9}$
	Имипрамин/серотонин	(18.8 ± 0.9)	(48 ± 3)	0.9860	$3 \cdot 10^{-9}$

рованных МУНТ в ДМФА и МУНТ в хитозане (табл. 2): в частности, большой по величине аналитический сигнал, лучшие операционные характеристики (сохранение большей величины каталитической активности, меньшая погрешность параллельных измерений).

В случае биосенсоров третьего типа (табл. 3) линейная зависимость величины тока от концентрации наблюдается в диапазоне от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ М при большем коэффициенте чувствительности по сравнению с биосенсорами первого и второго типов.

Оценку правильности полученных результатов осуществляли методом «введено-найдено». Погрешность определения не превышает $S_r = 0.086$. Данные представлены в табл. 4.

Определение тианептина в урине. Поскольку АД выводятся из организма с мочой, была предпринята попытка разработать способ определения их остаточных количеств в этой биологической жидкости. Предлагаемый биосенсор (третьего типа) опробован при определении в урине тианептина, который составляет главный активный компонент (лекарственное вещество) в лекарственном препарате «Коаксил», который относится кроме того к препаратам строгого учета. Поскольку в состав ури-

ны входят компоненты, которые могут окисляться в рабочей области потенциалов, в частности, мочевая кислота [21, 22], предпринята попытка смоделировать влияние матричных компонентов урины на возможность определения конкретного АД. Для этого получена так называемая «искусственная» урина, содержащая креатинин, мочевую кислоту, мочевины, KCl, NaCl, MgSO₄ и CuSO₄ в количествах, отвечающих их среднему содержанию [23, 24]. Чтобы нивелировать действие матричных компонентов, разбавляли как модельный раствор, так и натуральную мочу. Экспериментально установлено, что разбавление в 50 раз позволяет устранить влияние мешающих компонентов. Линейная зависимость между концентрацией тианептина и величиной аналитического сигнала на фоне натуральной и искусственной мочи наблюдается в том же интервале концентраций, что и на фоне буферного раствора, т.е. градуировочные зависимости наблюдаются в одном и том же интервале концентраций, причем коэффициенты чувствительности не сильно отличаются между собой (табл. 5).

Титриметрические методы анализа до настоящего времени относятся к референтным методам определения лекарственных веществ во многих

Таблица 4

Результаты определения некоторых антидепрессантов биосенсором третьего типа при использовании разных фермент-субстратных систем ($n = 5$; $P = 0.95$)

Система	Антидепрессант	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
ИМАО – дофамин	Феназепам	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.93 \pm 0.08) \cdot 10^{-7}$	0.087
		$1 \cdot 10^{-6}$	$(1.41 \pm 0.09) \cdot 10^{-6}$	0.064
	Коаксил	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.85 \pm 0.06) \cdot 10^{-7}$	0.072
		$1 \cdot 10^{-6}$	$(1.90 \pm 0.09) \cdot 10^{-6}$	0.049
	Имипрамин	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.96 \pm 0.08) \cdot 10^{-7}$	0.086
		$1 \cdot 10^{-6}$	$(1.2 \pm 0.07) \cdot 10^{-6}$	0.058
ИМАО – серотонин	Феназепам	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.87 \pm 0.06) \cdot 10^{-7}$	0.071
		$1 \cdot 10^{-6}$	$(1.62 \pm 0.09) \cdot 10^{-6}$	0.057
	Коаксил	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.95 \pm 0.08) \cdot 10^{-7}$	0.085
		$1 \cdot 10^{-6}$	$(1.54 \pm 0.09) \cdot 10^{-6}$	0.063
	Имипрамин	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.86 \pm 0.07) \cdot 10^{-7}$	0.083
		$1 \cdot 10^{-6}$	$(1.36 \pm 0.08) \cdot 10^{-6}$	0.061

Таблица 5

Определение тианептина биосенсором третьего типа в интервале $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-8}$ М. Субстрат – дофамин, $c_s = 1 \cdot 10^{-3}$ М ($n = 5$, $P = 0.95$)

Исследуемый раствор	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) / g C$			S_H , моль/л
	$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r	
Урина	(19.3 ± 0.9)	(23 ± 2)	0.9865	$9 \cdot 10^{-9}$
Модельный раствор	(18.2 ± 0.9)	(21 ± 2)	0.9872	$8 \cdot 10^{-9}$
Фосфатный буфер	(16 ± 1)	(19.5 ± 0.9)	0.9919	$7 \cdot 10^{-9}$

Таблица 6

Определение имипрамина (МАО-биосенсор третьего типа, содержание лекарственного вещества – $3.17 \cdot 10^{-2}$ мг/мл), $n = 5$; $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.78$, $F_{\text{табл}} = 6.39$

Метод	Найдено, мг/мл		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
	$(x \pm \delta) \cdot 10^{-2}$ мг/мл	S_r		
Титриметрия	2.38 ± 0.01	0.0043	1.63	1.94
Биосенсор третьего типа	2.7 ± 0.1	0.038		

случаях [25]. Учитывая, что, например, имипрамин применяется в виде гидрохлорида, использовали вариант потенциометрического кислотно-основного титрования для определения данного лекарственного вещества (табл. 6). Анализ полученных результатов по t - и F -критериям показывает, что систематическая погрешность при определении имипрамина отсутствует и результаты его определения двумя методами согласуются друг с другом.

Результаты определения лекарственных веществ в лекарственных препаратах с антидепрессивным действием «Мелипрамин», «Коаксил» и «Феназепам» приведены в табл. 7.

Полученные результаты показывают, что предложенные биосенсоры можно применять как для контроля качества лекарственных препаратов в биологических жидкостях, так и лекарственного вещества в лекарственных формах.

ВЫВОДЫ

Рассмотрены различные наноструктурированные модификаторы поверхности, в частности многостенные углеродные нанотрубки и оксид графена.

Установлено, что использование хитозана как растворителя для углеродных нанотрубок и оксида графена приводит к получению более хорошо выраженных аналитических сигналов по сравнению с дисперсиями в ДМФА.

Таблица 7

Результаты определения антидепрессантов в лекарственных препаратах с помощью МАО-биосенсора третьего типа ($n = 5$, $P = 0.95$)

Лекарственный препарат (таблетки)	Содержание, указанное в инструкции, мг	Найдено, мг	S_r
«Мелипрамин» (ОАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия, Будапешт)	(25 ± 1)	(25.1 ± 0.9)	0.039
«Коаксил» («Сервье Индастри», Франция)	(12.5 ± 0.5)	(12.3 ± 0.7)	0.058
«Феназепам» (ОАО «Валента Фармацевтика», Щелково, Россия)	(2.5 ± 0.1)	(2.80 ± 0.2)	0.073

Среди рассмотренных наноструктурированных модификаторов поверхности первичных преобразователей наилучшие аналитические возможности в составе биосенсора проявил ГО. Такой биосенсор имеет определенные преимущества перед биосенсорами, модифицированными углеродными нанотрубками, в частности больший коэффициент чувствительности и лучшие операционные характеристики.

Разработанный биосенсор на основе электродов, модифицированных ГО был использован для контроля качества лекарственных препаратов («Мелипрамин», «Коаксил», «Феназепам») и определения остаточных количеств АД в биологической жидкости (в моче) до уровня $n \cdot 10^{-9}$ М.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (грант № 13-03-01101-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography–mass spectrometry / E. Pietracci [et al.] // *Forensic Toxicol.* 2013. V. 31. P. 124-132.
2. Fernandez-Navarro J. J., Ruiz-Angel M. J., Garcia-Alvarez-Coque M. C. Reversed-phase liquid chromatography without organic solvent for determination of tricyclic antidepressants // *J. Sep. Sci.* 2012. V. 35. P. 1303-1309.
3. Davarani S., Najarian A., Nojavan S.M. Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 725. P. 51-56.
4. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney / S. Wang [et al.] // *Meat Science.* 2009. V. 82. P. 53-58.
5. Electrochemical immunosensor for salbutamol detection based on CS-Fe₃O₄-PAMAM-GNPs nanocomposites and HRP-MWCNTs-Ab bioconjugates for signal amplification / S. Liu [et al.] // *Sens. Actuators B.* 2011. V. 156. P. 71-78.
6. Rapid and sensitive detection of β -agonists using a portable fluorescence biosensor based on fluorescent nanosilica and a lateral flow test strip / C. Song [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 50. P. 62-65.
7. Лекарственные средства. В 2 кн. Кн 1. / М.Д. Машковский; отв. ред. С.Б. Дивов. М.: Новая Волна, 2002. 540 с.
8. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline / D. Brondani [et al.] // *Sens. Actuators B.* 2009. V. 140. P. 252-260.
9. Amperometric biosensor based on monoamine oxidase (MAO) immobilized in sol/gel film for benzydamine determination in pharmaceuticals / D.J. Djane [et al.] // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Anal.* 2003. V. 33. P. 983-990.
10. Reusable sensor based on high magnetization carboxyl-modified graphene oxide with intrinsic hydrogen peroxide catalytic activity for hydrogen peroxide and glucose detection / H. Yang [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 41. P. 172-179.
11. Chen B., Ma M., Su X. An amperometric penicillin biosensor with enhanced sensitivity based on co-immobilization of carbon nanotubes, hematein, and β -lactamase on glassy carbon electrode // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 674. P. 89-95.
12. Olivé-Monllau R., Muñoz-Pascual F.X., Baldrich E. Characterization and optimization of carbon nanotube electrodes produced by magnetic entrapment: Application to paracetamol detection // *Sens. Actuators B.* 2013. V. 185. P. 685-693.
13. Shahrokhian S., Rastgar S. Electrochemical deposition of gold nanoparticles on carbon nanotube coated glassy carbon electrode for the improved sensing of tinidazole // *Electrochim. Acta.* 2012. V. 78. P. 422-429.
14. Unnikrishnan B., Mani V., Chen S.-M. Highly sensitive amperometric sensor for carbamazepine determination based on electrochemically reduced graphene oxide–single-walled carbon nanotube composite film // *Sens. Actuators B.* 2012. V. 173. P. 274-280.
15. Electrochemical sensor for toxic ractopamine and clenbuterol based on the enhancement effect of graphene oxide / C. Wu [et al.] // *Sens. Actuators B.* 2012. V. 168. P. 178-184.
16. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools / P. Fanjul-Bolado [et al.] // *Talanta.* 2007. V. 74. P. 427-433
17. Li X., Jiang X. Electrostatic layer-by-layer assembled multilayer films of chitosan and carbon nanotubes // *New Carbon Materials.* 2010. V. 25, № 3. P. 237-240.
18. Горкин В.З. Аминоксидазы и их значение в медицине. М.: Медицина, 1981. 336 с.
19. Амперометрический моноаминоксидазный биосенсор для определения некоторых антидепрессантов / Э.П. Медянцева [и др.] // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63, №3. С. 302-307.
20. Условия функционирования амперометрического биосенсора на основе моноаминоксидазы / Э.П. Медянцева [и др.] // *Учёные записки Каз. гос. ун-та. Естественные науки.* 2006. Т. 148, № 2. С. 21-29.
21. Данилова Л. А. Анализы крови и мочи. СПб.: Салит-Медкнига, 2003. 128 с.
22. Совместное вольтамперометрическое определение дофамина и мочевой кислоты на электроде, модифицированном самоорганизующимся монослоем цистамина с наночастицами золота / Л.Г. Шайдарова [и др.] // *Журн. прикладн. химии.* 2011. Т. 84, вып. 2. С. 222-228.
23. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М.: Медицина, 1983. 272 с.
24. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с.
25. European pharmacopoeia 7.0, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2010, V. 2, P. 231-2232.

THE USE OF MONOAMINE OXIDASE AMPEROMETRIC BIOSENSORS BASED ON GRAPHITE ELECTRODES AND GRAPHENE OXIDE AS A SURFACE MODIFIER FOR THE DETERMINATION OF SOME ANTIDEPRESSANTS

*E.P. Medyantseva, D.V. Brusnitsyn, R.M. Varlamova,
R.R. Sitdikova, A.N. Galiavina, G.K. Budnikov*

*Department of Analytical Chemistry, Kazan` Federal University
ul. Kremlevskaia, 18, Kazan`, 420008, Russian Federation*

Novel monoamine oxidase amperometric biosensors based on screen-printed graphite electrodes modified with nanostructured material graphene oxide (GO) were developed for the determination of antidepressants («Melipraminum», «Coaxil» and «Fenazepam»).

Response of the created biosensor is based on a combination of monoamine oxidase biochemical action towards biogenic amines (dopamine, serotonin) and electrochemical oxidation of hydrogen peroxide (a product of the enzymatic reaction) as well as the inhibition effect of the studied antidepressants on the immobilized enzyme. Analytic signal is hydrogen peroxide oxidation current at potentials 0.7-0.75 V.

The usage of chitosan acetate solution as a dispersant for carbon nanotubes and graphene oxide provides more pronounced analytical biosensor signals compared to the suspension in DMF. The antidepressants under investigation were determined within the wide range concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ M.

The analytical capabilities of the GO-based biosensor were compared with the biosensor modified with carbon nanotubes in chitosan. GO-modified biosensor had certain advantages over biosensors modified with carbon nanotubes, in particular the higher sensitivity coefficient and lower detection limit.

The application of acid-base titration as a reference method for determination on example of imipramine has shown the absence of systematic error in measurements using the developed biosensors.

The developed biosensors can be applied for the control of the residual amounts of drugs in biological fluids (urine) at $9 \cdot 10^{-9}$ M as well as contents of active substance in pharmaceutical dosage forms.

Keywords: biosensor, graphene oxide, carbon nanotubes, chitosan, antidepressants, monoamine oxidase, biological fluid.

REFERENCES

- Pietracci E. Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, 2013, vol. 31, pp.124-132.
- Fernandez-Navarro J. J., Ruiz-Angel M. J., Garcia-Alvarez-Coque M. C. Reversed-phase liquid chromatography without organic solvent for determination of tricyclic antidepressants. *J. Sep. Sci.*, 2012, vol. 35, pp. 1303-1309.
- Davarani S., Najarian A., Nojavan S.M. Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids. *Anal. Chim. Acta.*, 2012, vol. 725, pp. 51-56.
- Wang S. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Science*, 2009, vol. 82, pp. 53-58.
- Liu S. Electrochemical immunosensor for salbutamol detection based on CS-Fe₃O₄-PAMAM-GNPs nanocomposites and HRP-MWCNTs-Ab bioconjugates for signal amplification. *Sens. Actuators B*, 2011, vol. 156, pp. 71-78.
- Song C. Rapid and sensitive detection of β -agonists using a portable fluorescence biosensor based on fluorescent nanosilica and a lateral flow test strip. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, vol. 50, pp. 62-65.
- Mashkovskii M.D. *Lekarstvennye sredstva. V 2 kn. Kn. 1* [Drug substance. Vol. 1]. M.: Novaia Volna, 2002, 540 p. (in Russian).
- Brondani D. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline. *Sens. Actuators B*, 2009, vol. 140, pp. 252-260.
- Djane D.J. Amperometric biosensor based on monoamine oxidase (MAO) immobilized in sol/gel film for benzydamine determination in pharmaceuticals. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Anal.*, 2003, vol. 33, pp. 983-990.
- Yang H. Reusable sensor based on high magnetization carboxyl-modified graphene oxide with intrinsic hydrogen peroxide catalytic activity for hydrogen peroxide and glucose detection. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, vol. 41, pp. 172-179.
- Chen B., Ma M., Su X. An amperometric penicillin biosensor with enhanced sensitivity based on co-immobilization of carbon nanotubes, hematein, and β -lactamase on glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta*, 2010, vol. 674, pp. 89-95.
- Olivé-Monllau R., Munoz-Pascual F.X., Baldrich E. Characterization and optimization of carbon nanotube electrodes produced by magnetic entrapment: Application to paracetamol detection. *Sens. Actuators B*, 2013, vol. 185, pp. 685-693.
- Shahrokhian S., Rastgar S. Electrochemical deposition of gold nanoparticles on carbon nanotube coated glassy carbon electrode for the improved sensing of tinidazole. *Electrochim. Acta*, 2012, vol. 78, pp. 422-429.
- Unnikrishnan B., Mani V., Chen S.-M. Highly sensitive amperometric sensor for carbamazepine determination based on electrochemically reduced graphene oxide–single-walled carbon nanotube composite film. *Sens. Actuators B*, 2012, vol. 173, pp. 274-280.

15. Wu C. Electrochemical sensor for toxic ractopamine and clenbuterol based on the enhancement effect of graphene oxide. *Sens. Actuators B*, 2012, vol. 168, pp. 178-184.
16. Fanjul-Bolado P. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta*, 2007, vol. 74, pp. 427-433.
17. Li X., Jiang X. Electrostatic layer-by-layer assembled multilayer films of chitosan and carbon nanotubes. *New Carbon Materials*, 2010, vol. 25, no. 3, pp. 237-240.
18. Gorkin V.Z. *Aminoksidazy i ikh znachenie v meditsine* [Aminoksidazes and their importance in medicine]. M.: Medicina, 1981. 336 p. (in Russian).
19. Medyantseva E.P., Varlamova R.M., Gimaletdinova D.A., Budnikov G.K., Fattakhova A.N. [An amperometric monoamine oxidase biosensor for determining some antidepressants]. *Zhurn. analit. khimii* [Journal of Analytical Chemistry], 2008, vol. 63, no. 3, pp. 275-279 (in Russian).
20. Medyantseva E.P., Varlamova R.M., Gimaletdinova D.A., Fattakhova A.N. Budnikov G.K. [The conditions of functioning of the amperometric biosensor based on monoamine oxidase]. *Uchjonye zapiski Kaz. gos. un-ta. Estestvennye nauki* [Proceedings of the Kazan State University. Natural science], 2006, vol. 148, no. 2, pp. 21-29 (in Russian).
21. Danilova L.A. *Analizy krovi i mochi* [Blood and urine tests]. SPb.: Salit-Medkniga, 2003. 128 p. (in Russian).
22. Shaidarova L.G., Romanova E.I., Chelnokova I.A., Gedmina A.V., Budnikov G.K. [Joint voltammetric determination of dopamine and uric acid at an electrode modified with self-assembled monolayer of cystamine with gold nanoparticles]. *Zhurn. prikladn. khimii* [J. of Applied Chem], 2011, vol.84, no. 2, pp. 222-228 (in Russian).
23. Kushmanova O.D., Ivchenko G.M. *Rukovodstvo k laboratornym zaniatiyam po biologicheskoi khimii* [Guide to laboratory studies on biological chemistry]. M.: Medicina, 1983, 272 p. (in Russian).
24. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biologicheskaja khimija* [Biological chemistry]. M.: Medicine, 1998, 704 p. (in Russian).
25. *European pharmacopoeia 7.0*, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2010, vol. 2, pp. 2231-2232.