

УДК 543.866

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ
L-ЦИСТЕИНДЕСУЛЬФИДРАЗНЫЕ БИОСЕНСОРЫ
НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГРАФИТОВЫХ
ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИДЕПРЕССАНТОВ**

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

Аннотация

Разработаны новые ингибиторные амперометрические биосенсоры на основе планарных печатных графитовых электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками (МУНТ), наночастицами золота (НЧ Au) и иммобилизованным ферментом L-цистеиндесульфгидразой для определения антидепрессантов (моклубемид, имипрамин). Предложены различные способы получения НЧ Au (в суспензии МУНТ и электрохимическое осаждение). Биосенсоры могут быть использованы для контроля как остаточных количеств антидепрессантов в биологических жидкостях, так и основного вещества в лекарственных формах в области концентраций $1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-9}$ моль/л. Нижняя граница определяемых содержаний на уровне $6 \cdot 10^{-10}$ и $9 \cdot 10^{-10}$ моль/л для моклубемида и имипрамина соответственно.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, L-цистеиндесульфгидраза, многослойные углеродные нанотрубки, наночастицы золота, антидепрессанты, моклубемид, имипрамин.

Введение

Разработка способов определения лекарственных препаратов для контроля качества фармацевтической промышленности, выявления фальсифицированной продукции и определения терапевтических доз в биологических жидкостях является одним из приоритетных направлений развития биоаналитической химии.

Поскольку во всем мире число людей, принимающих антидепрессанты, постоянно растет в связи с увеличением стрессовых ситуаций, а антидепрессанты относятся к лекарственным препаратам строгого учета, разработка способов определения лекарственных препаратов именно этой группы является актуальной задачей.

Для определения биологически активных соединений, в том числе и обладающих лекарственным действием, в различных матриксах активно разрабатываются биосенсорные технологии как более экспрессные, гибкие и в ряде случаев менее трудоемкие, чем традиционные методы определения лекарственных соединений (например, хроматографические).

Одно из современных направлений развития технологии конструирования биосенсоров связано с использованием многослойных углеродных нанотрубок

(МУНТ) в сочетании с биомолекулами. Такая технология позволяет создавать бионаноструктурированные материалы, обладающие специфическими свойствами [1, 2]. Углеродные нанотрубки имеют уникальные физические свойства [3]: необычно высокая прочность sp^2 -связей C–C, отсутствие или малая плотность дефектов структуры, высокая электрическая проводимость. Использование углеродных нанотрубок привлекательно еще и возможностью их дальнейшей функционализации. Использование УНТ и наночастиц металлов обеспечивает необходимую плотность заряда, что позволяет напрямую влиять на чувствительность сенсора и поддерживать высокую электроактивность, что, в свою очередь, делает его пригодным для определения биологических активных соединений [4]. В качестве биоматериалов могут выступать различные биомолекулы, биополимеры, например хитозан [5]. Хитозан – это полисахарид, состоящий из сополимеров глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Он является полиэлектролитом поликатионного типа, обладает биосовместимостью с ферментами [6–8], прекрасной способностью к пленкообразованию и адгезии, нетоксичен. Именно такие бионаноструктурированные материалы являются весьма перспективными для модификации различных первичных преобразователей, в частности графитовых печатных электродов [9, 10].

В литературе практически отсутствуют сведения о биосенсорах для определения таких лекарственных соединений, как моклобемид и имипрамин. Лишь в последнее время появились работы, посвященные определению этих лекарственных соединений с помощью моноаминоксидазных биосенсоров [11, 12].

В то же время имипрамин (мелипрамин) – антидепрессант I поколения – является одним из основных представителей трициклических антидепрессантов. Он проявляет свойства ингибитора обратного захвата моноаминов. По характеру действия относится к антидепрессантам с сопутствующим стимулирующим эффектом [13].

Моклобемид относится уже к антидепрессантам II поколения, который обратимо ингибирует моноаминоксидазу А. Он имеет более широкий спектр антидепрессантной активности, лучшую по сравнению с трициклическими антидепрессантами переносимость, низкую токсичность и значительно меньшее число побочных эффектов. По характеру действия относится к антидепрессантам с сопутствующим стимулирующим эффектом [13].

Для определения трициклических антидепрессантов (имипрамина, кломипрамина) в плазме крови человека и образцах мочи предложен метод газовой хроматографии в сочетании с электромембранной экстракцией [14]. Разделение осуществлялось на колонке CP-SIL 8CB (25 мм × 0.32 мм, ID 0.25 мкм). В качестве датчика использовался пламенно-ионизационный детектор. Экстракция осуществлялась через мембрану, пропитанную 2-нитрофенил октиловым эфиром. В качестве газа-носителя использовали азот при постоянном давлении 20 бар. Предел обнаружения составлял 0.7 нг/мл, $R = 0.995$.

Для определения моклобемида и наркотиков при интоксикации организма человека предложен метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим методом обнаружения [15]. Разделение осуществлялось на колонке (100 мм × 2.1 мм, ID = 1.9 мкм). Анализ проводили при скорости потока 0.4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из воды, содержащей 0.1%-ную муравьиную кислоту и ацетонитрила.

Линейная область концентраций для моклобемида лежит в пределах от 50 до 350 мкг/л. Способ обладает возможностью определения моклобемида до 54 мкг/л.

Хроматографические методы являются более трудоемкими и дорогостоящими, чем, например, методы с использованием биосенсоров.

В то же время биосенсоры могут упростить процедуру определения рассматриваемых лекарственных соединений при высокой чувствительности анализа.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке новых амперометрических биосенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных МУНТ и наночастицами золота, а также иммобилизованным ферментом – L-цистеиндесульфгидразой, в выборе условий их функционирования, в оценке аналитических возможностей, в сопоставлении их с полученными ранее результатами для биосенсоров на основе электродов, не модифицированных МУНТ, для контроля содержания лекарственных веществ с антидепрессивным действием в модельных растворах и лекарственных формах (препаратах).

1. Экспериментальная часть

1.1. Аппаратура и оборудование. В качестве основы для биосенсора использовали печатные графитовые электроды (изготовлены на кафедре аналитической химии Казанского федерального университета), представляющие собой систему из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения (Ag/AgCl), полученную на полимерной подложке методом трафаретной печати. Материалом поверхности рабочего электрода, на которой иммобилизуются модификатор и фермент, а также и вспомогательного являлись графитовые чернила (фирма Gwent Electronic Materials, США). Использовали ячейку объемом 2 мл. Все измерения проводили с использованием потенциостата/гальваностата μ Autolab type III (фирма Eco Chemie B.V., Нидерланды). Электрохимическую стабилизацию и очистку поверхности электрода проводили путем циклического изменения потенциала (5–7 раз) в диапазоне потенциалов от 0 до 1000 мВ в растворе 0.01 М KCl при скорости развертки 100 мВ/с. Использована центрифуга марки CM-50 (Россия).

1.2. Реактивы. Для приготовления буферных растворов применяли гидрофосфат натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) и дигидрофосфат калия ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) марок «ч.» и «ч.д.а.» (ЗАО «Лаверна», Россия). Использовали фосфатный буферный раствор с pH (7.0 ± 0.2). Значения pH водных растворов определяли pH-метром pH-150 со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам. В качестве субстрата для биосенсоров применяли L-цистеин (фирма Sigma, США).

Объектами анализа служили лекарственные препараты (в таблетках): «Мелипрамин» (Фармацевтический завод ЭГИС, Венгрия), «Аурорикс» (компания «Ф. Хоффман-Ля Рош», Швейцария). Структурные формулы действующих компонентов лекарственных средств приведены на рис. 1. В состав «Мелипрамина» помимо основного действующего вещества согласно инструкции входят еще следующие компоненты: титана диоксид, глицерин, макрогол 3500, железа оксид красный, магния стеарат, тальк, сахароза, лактоза моногидрат. В состав

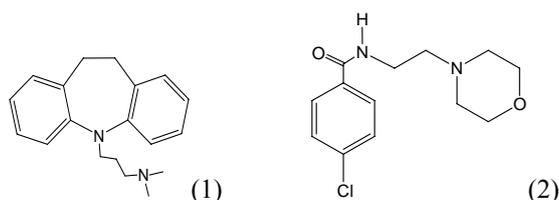


Рис. 1. Структурные формулы ингибиторов L-цистеиндесульфгидразы: 1 – имипрамина (препарат «Мелипрамин») – N-(3-диметиламинопропил)-иминодобензил и 2 – моклобемида (препарат «Аурорикс») – 4-хлор-N-(2-морфолино-4-этил)бензамид

«Аурорикса» кроме основного действующего вещества включены гипромеллоза, этилцеллюлоза, макрогол 6000, тальк, титана диоксид, краситель железа оксид желтый, лактозы моногидрат, крахмал кукурузный, повидон К-30, карбоксиметилкрахмал натрия, магния стеарат.

Рабочие растворы нужной концентрации готовили путем минимального количества последовательных разбавлений их исходных водных растворов.

В качестве матричного материала для иммобилизации фермента на графитовые электроды, модифицированные МУНТ, и графитовые электроды, модифицированные МУНТ и наночастицами золота, использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы Reanal (Венгрия). Применяли 12.5%-ный раствор глутарового альдегида фирмы ICN Biomedicals Ins. (США).

Источником L-цистеиндесульфгидразы (ЦДГ) служил гомогенат из проростков зерновой культуры (овес, пшеница). Зерновую культуру выращивали в почве для рассады, высаживая семена на глубину 1.5–2 см. В теплице поддерживался постоянный режим: относительная влажность 60–70%, температура воздуха 20–25 °С, освещенность 10 клк, фотопериод 14 ч. Для приготовления гомогената растительный материал мелко нарезали и растирали пестиком в вымороженной ступке, заливали 0.1 М фосфатным буферным раствором с рН 7.6 в соотношении 1 : 3, процеживали суспензию через двойной марлевый слой и добавляли 0.5 М раствор сахарозы. Полученный гомогенат вводили в биочувствительный слой сенсоров.

Использовали МУНТ с линейными размерами от 2–6 до 10–15 нм и хитозан $C_{12}H_{24}N_2O_9$ производства Sigma-Aldrich.

Для получения наночастиц золота на поверхности печатных графитовых электродов применяли 1%-ный раствор $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$ фирмы «Аурат» (Россия), 1%-ный раствор $HClO_4$ (марки «х.ч.») и 1%-ный раствор $K_2C_6H_6O_7$ (марки «х.ч.»).

1.3. Подготовка углеродных нанотрубок. МУНТ очищали от остаточных количеств оксидов переходных металлов, а также аморфного углерода диспергированием в растворах концентрированных кислот в соотношении 1 : 3 ($HNO_3 : H_2SO_4$) [3] с помощью ультразвуковой (УЗ) ванны (модель DAIHAN WiseClean WUC-A03H, фирма DAIHAN Scientific Co.Ltd, Корея), с частотой 40 КГц в течение 1–2 ч, до получения гомогенного раствора при температуре 75 °С. МУНТ сушили до постоянной массы и взвешивали.

Затем солюбилизировали МУНТ в 0.5%-ном растворе хитозана, растворенного в 2%-ном растворе уксусной кислоты с помощью УЗ-ванны при температуре 30 °С, до получения однородной дисперсии. Полученную суспензию

МУНТ в хитозане наносили по 1 мкл на поверхность графитового печатного электрода. Электроды, модифицированные таким способом ($C_{\text{МУНТ}} = 1.0$ мг/мл), высушивали при комнатной температуре не менее суток.

Однородность используемых для модификации поверхности электродов МУНТ поддерживали периодической (не менее раза в месяц) обработкой ультразвуком.

Электрохимическую активацию поверхности электродов с МУНТ проводили в режиме ЦВА в растворе 0.5 М Na_2SO_4 в течение 10 мин в интервале потенциалов от 0 до 1.0 В при скорости наложения потенциалов 100 мВ/с.

1.4. Получение ферментного сенсора. Для получения биочувствительной части сенсора на поверхность рабочего электрода наносили гомогенат, полученный из проростков пшеницы. Для этого готовили смесь, содержащую раствор фермента, БСА (50 мг/мл), фосфатный буфер (50 мМ, pH 7.5), дистиллированную воду и 1%-ный раствор глутарового альдегида. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь и после энергичного перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом биосенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри. На следующий день биосенсоры промывали водой, оставляли для высушивания на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике при 4 °С.

Полученные биосенсоры на основе L-цистеиндесульфгидразы сохраняли каталитическую активность фермента в течение месяца (погрешность изменения каталитической активности не более 5–6%).

2. Результаты и их обсуждение

Как отмечено выше, согласно литературным данным примеры использования амперометрических цистеиндесульфгидразных биосенсоров для определения антидепрессантов практически отсутствуют. Вместе с тем представляло интерес использовать в качестве модификаторов первичных преобразователей МУНТ в сочетании с биомолекулами (хитозаном) и наночастицами золота при создании целевого биосенсора.

Количество суспензии МУНТ, наносимой на поверхность печатного электрода, меняли от 2 до 0.5 мкл. Было установлено, что 2.0–1.0 мкл раствора позволяют получить поверхность, на которой более хорошо выражен аналитический сигнал, повысить воспроизводимость результатов, поэтому в дальнейшем использовали именно такое количество раствора МУНТ.

Компоненты, входящие в состав лекарственных препаратов «Мелипрамин» и «Аурорикс», не влияют на электрохимическое поведение основного действующего вещества.

2.1. Получение модифицированной наночастицами золота поверхности графитовых печатных электродов.

Получение наночастиц золота в суспензии МУНТ. Для получения наночастиц золота в суспензии МУНТ использовали HAuCl_4 , $\text{K}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ и суспензию МУНТ в хитозане ($C_{\text{МУНТ}} = 1$ мг/мл). Суспензию HAuCl_4 в МУНТ ($C_{\text{HAuCl}_4} = 1 \cdot 10^{-3}$ М) и цитрат натрия ($C_{\text{K}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7} = 1 \cdot 10^{-3}$ М) помещали в УЗ-ванну на 2.5 ч до получения

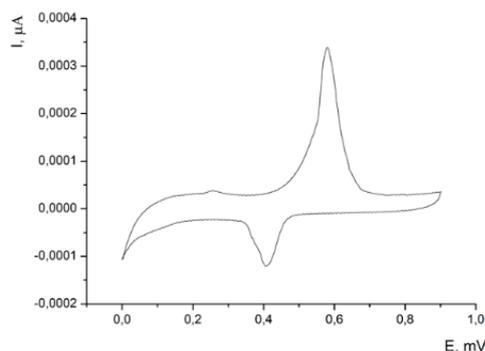


Рис. 2. Вольтамперограмма графитового печатного электрода в 0.5 М растворе Na_2SO_4 , модифицированного наноструктурированным материалом МУНТ/НЧ Au, V 100 мВ/с

гомогенного раствора при температуре 30 °С. Полученную суспензию наночастиц золота в МУНТ в хитозане охлаждали до комнатной температуры. Суспензия имела фиолетовую окраску, что указывает на образование наночастиц золота [16–21].

Полученный наноструктурированный материал – МУНТ/НЧ Au – наносили на поверхность графитового электрода и сушили при комнатной температуре в течение суток.

На вольтамперограммах такого электрода в растворе Na_2SO_4 наблюдается пара анодно-катодных пиков при потенциалах 580 и 420 мВ (рис. 2), которые, согласно литературным данным, относятся к окислению наночастиц золота [22]. Размер наночастиц, по литературным данным, составляет 20 нм.

Электрохимическое получение наночастиц золота.

а) Получение наночастиц золота методом циклической вольтамперометрии.

Электрохимическое получение наночастиц золота осуществлялось с использованием HAuCl_4 и HClO_4 . Электрод, модифицированный МУНТ ($C_{\text{МУНТ}} = 1$ мг/мл), помещали в раствор, содержащий тетрахлороаурат(III) водорода ($C_{\text{HAuCl}_4} = 5 \cdot 10^{-4}$ М), который растворяли в хлорной кислоте ($C_{\text{HClO}_4} = 0.05$ М). Нанесение наночастиц золота [23] осуществлялась методом циклической вольтамперометрии (28 циклов при V 50 мВ/с в диапазоне E 0–1000 мВ). На вольтамперограмме обнаруживается пара анодно-катодных пиков при потенциалах 250 и 50 мВ. Получаемые методом циклической вольтамперометрии наночастицы золота имеют размер, отличный от наночастиц золота (согласно литературным данным 60 нм), получаемых в суспензии МУНТ [22].

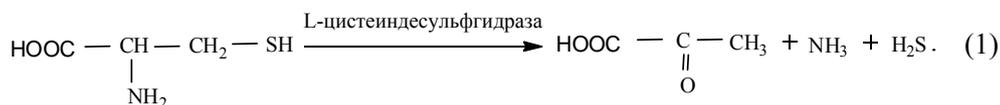
б) Получение наночастиц золота [17, 24] методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА).

Электрод, модифицированный МУНТ ($C_{\text{МУНТ}} = 2$ мг/мл), помещали в раствор HAuCl_4 в хлорной кислоте ($C_{\text{HClO}_4} = 0.05$ М). Нанесение наночастиц золота осуществлялось в растворе HAuCl_4 ($C_{\text{HAuCl}_4} = 5 \cdot 10^{-4}$ М) в хлорной кислоте в режиме ИВА при E –180 мВ и времени накопления 240 с.

2.2. Природа формирования аналитического сигнала цистеиндисульфгидразных биосенсоров. L-цистеиндисульфгидраза – фермент класса лиаз (КФ 4.4.1.1), который содержится, согласно литературным данным, в гомогенатах

растительного материала [25], катализирует процесс превращения L-цистеина до пируват-иона, аммиака и сероводорода. Функционирование биосенсора основано на сочетании биокаталитической реакции (уравнение (1)) и электрохимического окисления цистеина до дисульфидов при потенциале 0.65 В (уравнение (2)) (рис. 3, кривая 2).

Биокаталитическая реакция:



Электрохимическая реакция окисления цистеина до дисульфидов:



где $\text{R} = -\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COO}^-$.

В зависимости от модификатора (МУНТ или МУНТ/НЧ Au), используемого при разработке ЦДГ-биосенсоров, изменяется потенциал окисления цистеина. Для электрода, модифицированного МУНТ/ЦДГ, потенциал окисления цистеина составляет 650 мВ. Потенциал окисления цистеина для электрода, модифицированного МУНТ/НЧ Au/ЦДГ, равен 635 мВ, что указывает на некоторое облегчение процесса окисления цистеина до дисульфида.

2.3. Изучение влияния антидепрессантов на каталитическую активность иммобилизованных ферментов. При изучении влияния используемых антидепрессантов на каталитическую активность иммобилизованной цистеиндесульфгидразы (ИЦДГ) показано, что имипрамин, как типичный представитель трициклических антидепрессантов, оказывает ингибирующее действие не только на моноаминоксидазу, но и на ИЦДГ (рис. 3), причем в этом случае, исходя из специфики фермент-субстратной системы и электроокисления субстрата, не подвергнувшегося ферментативному превращению, наблюдается увеличение тока при потенциале 0.635 В (рис. 3, кривая 3). Ранее такие эффекты для ЦДГ не наблюдались [26, 27].

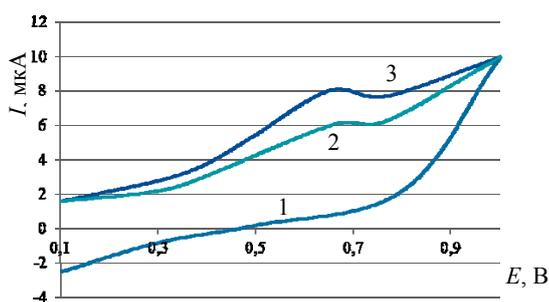


Рис. 3. Вольтамперограммы, полученные на L-цистеиндесульфгидразном биосенсоре на основе МУНТ/НЧ Au: 1) фосфатный буферный раствор (рН 7.5 и $C = 0.067$ М); 2) фосфатный буферный раствор в присутствии цистеина ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л); 3) фосфатный буферный раствор в присутствии цистеина ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и имипразиона ($C = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

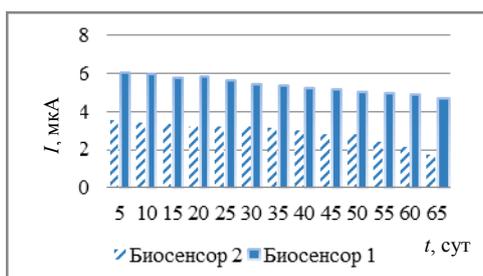


Рис. 4. Динамика изменения величины аналитического сигнала от времени хранения биосенсора. Биосенсор 1 – биосенсор на основе МУНТ/НЧ Au; биосенсор 2 – биосенсор, не модифицированный МУНТ

Табл. 1

Сопоставление аналитических возможностей предлагаемых ЦДГ-биосенсоров в определении имипрамина

Лекарственное соединение	Область рабочих концентраций моль/л	Уравнение градуировочной зависимости			c_n , моль/л	
		$I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \lg C$	$A \pm \delta$	$B \pm \delta$		R^2
Биосенсор на основе МУНТ/НЧ Au (биосенсор 1)	$1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-9}$	$I^* = (3.8 \pm 0.1) + (2.53 \pm 0.01) \lg C$	3.8 ± 0.1	2.53 ± 0.01	0.9988	$9 \cdot 10^{-10}$
Биосенсор, не модифицированный МУНТ (биосенсор 2)	$1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-7}$	$I^* = (1.1 \pm 0.7) + (0.58 \pm 0.09) \lg C$	1.1 ± 0.7	0.58 ± 0.09	0.9826	$3 \cdot 10^{-8}$

$I^* = (I_1/I_0) \cdot 100\%$, где I_1 – ток реакции окисления цистеина с ингибитором, I_0 – ток окисления цистеина в отсутствие ингибитора.

Следует отметить, что модификация поверхности электродов наноструктурированным материалом МУНТ/НЧ Au (биосенсор 1) для биосенсоров на основе ИЦДГ привела к получению более четко выраженных вольтамперных кривых (рис. 4), улучшению коэффициента корреляции и увеличению коэффициента чувствительности (табл. 1) по сравнению с биосенсором, не модифицированным МУНТ (биосенсор 2).

Наилучшие аналитические характеристики наблюдаются для биосенсора на основе наноструктурированного материала МУНТ/НЧ Au (см. табл. 2). Из таблицы видно, что линейная зависимость между величиной тока и концентрацией антидепрессанта устанавливается в пределах $1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-9}$ моль/л. Нижняя граница определяемых содержаний лежит на уровне $6 \cdot 10^{-10}$ моль/л.

Правильность определения антидепрессантов подтверждена методом «введено – найдено», S_r не больше 0.095 (табл. 3).

L-Цистеиндесульфгидраза относится к малоизученным ферментам, поэтому рассмотрение кинетики действия этого фермента в присутствии и в отсутствие ингибиторов представляет интерес для выбора условий их определения. Согласно значениям кинетических параметров (константы Михаэлиса $K_{m(\text{каж})}$ и максимальной скорости ферментативной реакции V_{\max}), для фермент-субстратной системы ЦДГ – цистеин в присутствии имипрамина и афобазола реализуется двухпараметрически согласованное (смешанное) ингибирование [28] (табл. 4).

Табл. 2

Аналитические возможности различных типов биосенсоров при определении ингибиторов ЦДГ. Субстрат – цистеин ($n = 5$; $P = 0.95$)

№	Лекарственное соединение	Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости			c_H , моль/л
			$I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \lg C$			
			$A \pm \delta$	$B \pm \delta$	R^2	
Биосенсор на основе МУНТ/НЧ Au						
1	Имипрамин	$1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-9}$	3.8 ± 0.1	2.53 ± 0.01	0.9988	$9 \cdot 10^{-10}$
2	Моклобемид	$1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-9}$	5.92 ± 0.09	4.1 ± 0.1	0.9829	$6 \cdot 10^{-10}$
Биосенсор на основе МУНТ						
3	Имипрамин	$1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-8}$	2.42 ± 0.1	1.13 ± 0.01	0.9814	$2 \cdot 10^{-9}$
4	Моклобемид	$1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-8}$	3.15 ± 0.08	2.2 ± 0.1	0.9802	$4 \cdot 10^{-9}$

$I^* = (I_1/I_0) \cdot 100\%$, где I_1 – ток реакции окисления цистеина с ингибитором, I_0 – ток окисления цистеина в отсутствие ингибитора.

Табл. 3

Результаты определения антидепрессантов амперометрическим биосенсором на основе МУНТ/НЧ Au ($n = 5$, $P = 0.95$)

Антидепрессант	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
Имипрамин	$5 \cdot 10^{-8}$	$(4.9 \pm 0.4) \cdot 10^{-8}$	0.085
	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.84 \pm 0.05) \cdot 10^{-7}$	0.063
Моклобемид	$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.3 \pm 0.5) \cdot 10^{-8}$	0.095
	$1 \cdot 10^{-7}$	$(0.95 \pm 0.06) \cdot 10^{-7}$	0.065

Табл. 4

Кинетические параметры ИЦДГ в составе биосенсора с использованием модификатора МУНТ/НЧ Au ($n = 5$, $P = 0.95$)

Название соединения	Концентрация, моль/л	$K_m^{(каж.)}$, $\times 10^5$ моль/л	$\times 10^7 V_{max}$, моль/л·с	Соотношение параметров K_m и V_{max}	K_i , $\times 10^7$ моль $^{-1}$
Моклобемид	0	4.2 ± 0.1	22.5 ± 0.2	$K'_m > K_m$ $V'_{max} < V_{max}$	1.80 ± 0.05
	10^{-6}	10.45 ± 0.05	0.12 ± 0.05		
	10^{-7}	18.5 ± 0.1	1.24 ± 0.1		
Имипрамин	10^{-6}	14.43 ± 0.03	2.47 ± 0.04		
	10^{-7}	44.4 ± 0.02	0.17 ± 0.06		7.00 ± 0.05

Примечание: K_m – константа Михаэлиса в присутствии ингибитора; V'_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции в присутствии ингибитора; K_i – константа ингибирования.

Предлагаемые биосенсоры имеют ряд преимуществ по сравнению с биосенсорами на основе немодифицированных первичных преобразователей (табл. 1): в частности, большой по величине аналитический сигнал, лучшие операционные характеристики (сохранение большей величины каталитической активности в течение более длительного времени, погрешность параллельных измерений меньше) (рис. 4).

Табл. 5

Результаты определения антидепрессантов в лекарственных препаратах ($n = 5$, $P = 0.95$)

Фармпрепарат (таблетки)	Нормируемое содержание, мг	Найдено, мг	S_r
«Мелипрамин»	25	25.5 ± 0.9	0.038
«Аурорикс»	15	15.8 ± 0.8	0.055

Методика определения терапевтически активного компонента в лекарственных препаратах «Аурорикс» и «Мелипрамин»

Таблетку препарата растирали в ступке до однородного мелкодисперсного состояния. Добавляли небольшое количество этилового спирта (5 мл) и примерно 10 мл дистиллированной воды, перемешивали полученный раствор и центрифугировали 15 мин при скорости оборотов 7000 об/мин. Получившийся прозрачный раствор переносили в мерную колбу на 25 мл. Нерастворившийся осадок обрабатывали 10 мл дистиллированной воды и еще раз центрифугировали при тех же условиях. Прозрачный раствор опять переносили в мерную колбу и добавляли воду до метки.

Из этого раствора брали аликвоту 5 мкл, добавляли 40 мкл раствора цистеина ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ М) и фосфатный буферный раствор (рН 7.5 и $C = 0.067$ М) до объема 2 мл (объем электрохимической ячейки). В электрохимическую ячейку помещали ЦДГ-биосенсор и через 8 мин снимали вольтамперограмму в области потенциалов от 0 до 0.9 В относительно хлорид-серебряного электрода при скорости наложения потенциала V 100 мВ/с. Концентрацию активного компонента препарата «Аурорикс» находили по градуировочному графику для определения моклобемида (табл. 2, позиция 2), концентрацию активного компонента препарата «Мелипрамин» находили по градуировочному графику для определения имипрамина (табл. 2, позиция 1).

Следует отметить, что компоненты, входящие в состав лекарственных препаратов «Мелипрамин» и «Аурорикс», не влияют на электрохимическое поведение основного действующего вещества и показания биосенсора.

Полученные результаты определения активного компонента – моклобемида в лекарственном препарате «Аурорикс» и имипрамина в «Мелипрамине» – приведены в табл. 5.

Заключение

Разработаны способы определения активного компонента в лекарственных препаратах с антидепрессивным действием: «Мелипрамин», «Аурорикс» – с S_r не более 0.04–0.06.

Применяемые биосенсоры на основе наноструктурированного материала МУНТ/НЧ Au имеют большой по величине аналитический сигнал и лучшие операционные характеристики по сравнению с биосенсорами на основе немодифицированных первичных преобразователей (табл. 1).

Полученные результаты показывают, что разрабатываемые биосенсоры весьма перспективны (недороги, удобны в эксплуатации, подходят для скрининговых исследований) и могут найти применение для контроля как остаточных

количеств лекарственных соединений в биологических жидкостях, учитывая их высокую чувствительность (табл. 2), так и основного вещества в лекарственных формах.

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

Литература

1. *Olivas-Armendáriz I., García-Casillas P., Martínez-Sánchez R., Martínez-Villafañe A., Martínez-Pérez C.A.* Chitosan/MWCNT composites prepared by thermal induced phase separation // *J. Alloys Comp.* – 2010. – V. 495, No 2. – P. 592–595.
2. *Xiao-bo L., Xiao-ying J.* Electrostatic layer-by-layer assembled multilayer films of chitosan and carbon nanotubes // *New Carbon Mater.* – 2010. – V. 25, No 3. – P. 237–240.
3. *Раков Э.Г.* Нанотрубки и фуллерены. – М.: Унив. кн., 2006. – 235 с.
4. *Liu Y., Tang J., Chen X., Xin J.H.* Decoration of carbon nanotubes with chitosan // *Carbon.* – 2005. – V. 43, No 15. – P. 3178–3180.
5. *Wu Z., Feng W., Feng Y., Liu Q., Xu X., Sekino T., Fujii A., Ozaki M.* Preparation and characterization of chitosan-grafted multiwalled carbon nanotubes and their electrochemical properties // *Carbon.* – 2007. – V. 45, No 6. – P. 1212–1218.
6. *Yuna Y.H., Dongb Zh., Shanovc V.N., Doepked A., Heinemand W.R., Halsall H.B., Bhattacharyab A., Wonge D.K.Y., Schulza M.J.* Fabrication and characterization of carbon nanotube array electrodes with gold nanoparticle tips // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2008. – V. 133, No 1. – P. 208–212.
7. *Li C., Yang K., Zhang Y., Tang H., Yan F., Tan L., Xie Q., Yao S.* Highly biocompatible multi-walled carbon nanotube–chitosan nanoparticle hybrids as protein carriers // *Acta Biomater.* – 2011. – V. 7, No 8. – P. 3070–3077. – doi: 10.1016/j.actbio.2011.05.005.
8. *Peng F., Pan F., Sun H., Lu L., Jiang Z.* Novel nanocomposite pervaporation membranes composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan-wrapped carbon nanotube // *J. Membrane Sci.* – 2007. – V. 300, No 1–2. – P. 13–19.
9. *Hou S., Ou Z., Chen Q., Wu B.* Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol–gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – V. 33, No 1. – P. 44–49. – doi: 10.1016/j.bios.2011.12.014.
10. *Sharma S., Gupta N., Srivastava S.* Modulating electron transfer properties of gold nanoparticles for efficient biosensing // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – V. 37, No 1. – P. 30–37. – doi: 10.1016/j.bios.2012.04.027.
11. *Брусницын Д.В., Медянцева Э.П., Варламова Р.М., Байбатарова М.А.* Новые амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе модифицированных многослойными и однослойными углеродными нанотрубками электродов для определения антидепрессантов // *Вестн. Казан. технол. ун-та.* – 2012. – № 13. – С. 125–128.
12. *Медянцева Э.П., Брусницын Д.В., Сафарова Л.М., Варламова Р.М., Тарасова Е.Ю., Сахапова Г.Р., Бабкина С.С., Будников Г.К.* Аналитические возможности новых амперометрических биосенсоров в определении лекарственных препаратов разного терапевтического действия // *Новые химико-фармацевтические технологии: Сб. науч. тр.* – М., 2012. – Вып. 184. – С.143–148.
13. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства: в 2 т. – М.: Новая Волна, 2002. – Т. 1. – 540 с.

14. Davarani S.S., Najarian A.M., Nojavan S., Tabatabaei M.-A. Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 725. – P. 51–56. – doi: 10.1016/j.aca.2012.02.048.
15. Viette V., Guillaume D., Mylonas R., Mauron Y., Fathi M., Rudaz S., Veuthey J.-L. A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography – hybrid tandem mass spectrometry (Part I) // *Clin. Biochem.* – 2011. – V. 44. – P. 32–44. – doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.07.021.
16. Zargoosh K., Chaichi M., Shamsipur M., Hossienkhani S., Asghari S., Qandalee M. Highly sensitive glucose biosensor based on the effective immobilization of glucose oxidase/carbon-nanotube and gold nanoparticle in nafion film and peroxyoxalate chemiluminescence reaction of a new fluorophore // *Talanta.* – 2012. – V. 93. – P. 37–43. – doi: 10.1016/j.talanta.2011.11.029.
17. El Nashar R.M. Flow injection catalase activity measurement based on gold nanoparticles/carbon nanotubes modified glassy carbon electrode // *Talanta.* – 2012. – V. 96. – P. 161–167. – doi: 10.1016/j.talanta.2011.12.018.
18. Li S., Zhu X., Zhang W., Xie G., Feng W. Hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoparticles/thionine/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes–chitosans composite film-modified electrode // *Appl. Surf. Sci.* – 2012. – V. 258, No 7. – P. 2802–2807. – doi: 10.1016/j.apsusc.2011.10.138.
19. Fernandes S.C., Souza de F.D., Souza de B.S., Nome F., Vieira I.C. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2012. – V. 173. – P. 483–490. – doi: 10.1016/j.snb.2012.07.054.
20. Jiang W., Yuan R., Chai Y.-Q., Yin B. Amperometric immunosensor based on multiwalled carbon nanotubes/Prussian blue/nanogold-modified electrode for determination of α -fetoprotein // *Anal. Biochem.* – 2010. – V. 407, No 1. – P. 65–71. – doi: 10.1016/j.ab.2010.07.028.
21. Li X., Wu J., Gao N., Shen G., Yu R. Electrochemical performance of l-cysteine–goldparticle nanocomposite electrode interface as applied to preparation of mediator-free enzymatic biosensors // *Sensor. Actuat. B-Chem.* – 2006. – V. 117, No 1. – P. 35–42. – doi: 10.1016/j.snb.2005.10.044.
22. Cui R., Huang H., Yin Z., Gao D., Zhu J.-J. Horseradish peroxidase-functionalized gold nanoparticle label for amplified immunoanalysis based on gold nanoparticles/carbon nanotubes hybrids modified biosensor // *Biosens. Bioelectron.* – 2008. – V. 23, No 11. – P. 1666–1673. – doi: 10.1016/j.bios.2008.01.034.
23. Ragupathy D., Gopalan A.I., Lee K.-P. Synergistic contributions of multiwall carbon nanotubes and gold nanoparticles in a chitosan–ionic liquid matrix towards improved performance for a glucose sensor // *Electrochem. Commun.* – 2009. – V. 11, No 2. – P. 397–401. – doi: 10.1016/j.elecom.2008.11.048.
24. Kang X., Mai Z., Zou X., Cai P., Mo J. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes // *Anal. Biochem.* – 2007. – V. 369, No 1. – P. 71–79.
25. Тернер Э. Биосенсоры: основы и приложения. – М.: Мир, 1992. – 614 с.
26. Alacam S., Timur S., Telefoncu A. A novel biosensor based on L-homocysteine desulfhydrase enzyme immobilized in eggshell membrane // *J. Mol. Catal. B-Enzym.* – 2007. – V. 49, No 1–4. – P. 55–60.
27. Hassana S.S.M., El-Baz A.F., Abd-Rabboh H.S.M. A novel potentiometric biosensor for selective L-cysteine determination using L-cysteine-desulfhydrase producing *Trichosporon jirovecii* yeast cells coupled with sulfide electrode // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – V. 602, No 1. – P. 108–113.

28. *Крупянка В.И.* Векторный метод представления ферментативных реакций. – М.: Наука, 1990. – 144 с.

Поступила в редакцию
01.03.13

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Elvina.Medyantseva@ksu.ru*

Брусницын Даниил Владимирович – аспирант кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *brussman@mail.ru*

Варламова Регина Марковна – кандидат химических наук, заведующий лабораторией кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Regina.Varlamova@ksu.ru*

Байбатарова Марина Алексеевна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*

* * *

AMPEROMETRIC L-CYSTEINDESULFHYDRASE BIOSENSORS BASED ON MODIFIED SCREEN-PRINTED GRAPHITE ELECTRODES FOR THE DETERMINATION OF ANTIDEPRESSANTS

E.P. Medyantseva, D.V. Brusnitsyn, R.M. Varlamova, M.A. Baibatarova, H.K. Budnikov

Abstract

Novel amperometric biosensors based on screen-printed graphite electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), gold nanoparticles (NP Au), and the immobilized enzyme L-cysteinedesulfhydrase are proposed for the determination of antidepressants (moclobemide, imipramine). The response of the proposed biosensor is based on a combination of enzymatic and electrochemical reactions and the inhibition effect of the antidepressants under study. Various methods for the synthesis of gold nanoparticles are proposed: in MWCNTs suspension and by electrochemical deposition. The biosensors can be used to control both the traces of these pharmaceuticals in biological fluids and the content of the active substance in the pharmaceutical formulations. The cysteinedesulfhydrase biosensors based on modified MWCNT / NP Au electrodes allow determination of antidepressants within the linear concentration range of $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l. The lower limits of detection are $6 \cdot 10^{-10}$ and $9 \cdot 10^{-10}$ mol/l for moclobemide and imipramine, respectively.

Keywords: amperometric biosensor, L-cysteinedesulfhydrase, multi-walled carbon nanotubes, gold nanoparticles, antidepressants, moclobemide, imipramine.

References

1. Olivas-Armendáriz I., García-Casillas P., Martínez-Sánchez R., Martínez-Villafañe A., Martínez-Pérez C.A. Chitosan/MWCNT composites prepared by thermal induced phase separation. *J. Alloys Comp.*, 2010, vol. 495, no. 2, pp. 592–595.

2. Xiao-bo L., Xiao-ying J. Electrostatic layer-by-layer assembled multilayer films of chitosan and carbon nanotubes. *New Carbon Mater.*, 2010, vol. 25, no. 3, pp. 237–240.
3. Rakov E.G. Nanotubes and Fullerenes. Moscow, Univ. kniga, 2006. 235 p. (In Russian)
4. Liu Y., Tang J., Chen X., Xin J.H. Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbon*, 2005, vol. 43, no. 15, pp. 3178–3180.
5. Wu Z., Feng W., Feng Y., Liu Q., Xu X., Sekino T., Fujii A., Ozaki M. Preparation and characterization of chitosan-grafted multiwalled carbon nanotubes and their electrochemical properties. *Carbon*, 2007, vol. 45, no. 6, pp. 1212–1218.
6. Yuna Y.H., Dongb Zh., Shanovc V.N., Doepked A., Heinemand W.R., Halsall H.B., Bhattacharyab A., Wonge D.K.Y., Schulza M.J. Fabrication and characterization of carbon nanotube array electrodes with gold nanoparticle tips. *Sens. Actu. B-Chem.*, 2008, vol. 133, no. 1, pp. 208–212.
7. Li C., Yang K., Zhang Y., Tang H., Yan F., Tan L., Xie Q., Yao S. Highly biocompatible multi-walled carbon nanotube–chitosan nanoparticle hybrids as protein carriers. *Acta Biomater.*, 2011, vol. 7, no. 8, pp. 3070–3077. doi: 10.1016/j.actbio.2011.05.005.
8. Peng F., Pan F., Sun H., Lu L., Jiang Z. Novel nanocomposite pervaporation membranes composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan-wrapped carbon nanotube. *J. Membrane Sci.*, 2007, vol. 300, no. 1–2, pp. 13–19.
9. Hou S., Ou Z., Chen Q., Wu B. Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol–gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, vol. 33, no. 1, pp. 44–49. doi: 10.1016/j.bios.2011.12.014.
10. Sharma S., Gupta N., Srivastava S. Modulating electron transfer properties of gold nanoparticles for efficient biosensing. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, vol. 37, no. 1, pp. 30–37. doi: 10.1016/j.bios.2012.04.027.
11. Brusnitsyn D.V., Medyantseva E.P., Varlamova R.M., Baibatarova M.A. Novel amperometric monoaminooxidase biosensors based on electrodes modified with multi-walled and single-walled carbon nanotubes for the determination of antidepressants. *Vestn. Kazan. Tekhnol. Univ.*, 2012, no. 13, pp. 125–128. (In Russian)
12. Medyantseva E.P., Brusnitsyn D.V., Safarova L.M., Varlamova R.M., Tarasova E.Yu., Sakhapova G.R., Babkina S.S., Budnikov G.K. Analytical potential of novel amperometric biosensors in the determination of drugs of different therapeutic action. *Novye khimiko-farmatsevticheskie tekhnologii: Sbornik nauch. trudov* [New chemical-pharmaceutical technologies: Coll. Sci. Papers]. Moscow, 2012, no. 184, pp. 143–148. (In Russian)
13. Mashkovskii M.D. Medicines. Moscow, Novaya Volna, 2002, vol. 1, 540 p. (In Russian)
14. Davarani S.S., Najarian A.M., Nojavan S., Tabatabaei M.-A. Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids. *Anal. Chim. Acta*, 2012, vol. 725, pp. 51–56. doi: 10.1016/j.aca.2012.02.048.
15. Viette V., Guillaume D., Mylonas R., Mauron Y., Fathi M., Rudaz S., Veuthey J.-L. A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography – hybrid tandem mass spectrometry (Part I). *Clin. Biochem.*, 2011, vol. 44, pp. 32–44. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.07.021.
16. Zargoosh K., Chaichi M., Shamsipur M., Hossienkhani S., Asghari S., Qandalee M. Highly sensitive glucose biosensor based on the effective immobilization of glucose oxidase/carbon-nanotube and gold nanoparticle in nafion film and peroxyoxalate chemiluminescence reaction of a new fluorophore. *Talanta*, 2012, vol. 93, pp. 37–43. doi: 10.1016/j.talanta.2011.11.029.
17. El Nashar R.M. Flow injection catalase activity measurement based on gold nanoparticles/carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 2012, vol. 96, pp. 161–167. doi: 10.1016/j.talanta.2011.12.018.
18. Li S., Zhu X., Zhang W., Xie G., Feng W. Hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoparticles/thionine/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes–chitosans composite film-modified electrode. *Appl. Surf. Sci.*, 2012, vol. 258, no. 7, pp. 2802–2807. doi: 10.1016/j.apsusc.2011.10.138.
19. Fernandes S.C., Souza de F.D., Souza de B.S., Nome F., Vieira I.C. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. *Sens. Actu. B-Chem.*, 2012, vol. 173, pp. 483–490. doi: 10.1016/j.snb.2012.07.054.

20. Jiang W., Yuan R., Chai Y.-Q., Yin B. Amperometric immunosensor based on multiwalled carbon nanotubes/Prussian blue/nanogold-modified electrode for determination of α -fetoprotein. *Anal. Biochem.*, 2010, vol. 407, no. 1, pp. 65–71. doi: 10.1016/j.ab.2010.07.028.
21. Li X., Wu J., Gao N., Shen G., Yu R. Electrochemical performance of l-cysteine–goldparticle nanocomposite electrode interface as applied to preparation of mediator-free enzymatic biosensors. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2006, vol. 117, no. 1, pp. 35–42. doi: 10.1016/j.snb.2005.10.044.
22. Cui R., Huang H., Yin Z., Gao D., Zhu J.-J. Horseradish peroxidase-functionalized gold nanoparticle label for amplified immunoanalysis based on gold nanoparticles/carbon nanotubes hybrids modified biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, vol. 23, no. 11, pp. 1666–1673. doi: 10.1016/j.bios.2008.01.034.
23. Ragupathy D., Gopalan A.I., Lee K.-P. Synergistic contributions of multiwall carbon nanotubes and gold nanoparticles in a chitosanionic liquid matrix towards improved performance for a glucose sensor. *Electrochem. Commun.*, 2009, vol. 11, no. 2, pp. 397–401. doi: 10.1016/j.elecom.2008.11.048.
24. Kang X., Mai Z., Zou X., Cai P., Mo J. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. *Anal. Biochem.*, 2007, vol. 369, no. 1, pp. 71–79.
25. Turner A., Wilson G., Kaube I. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford, UK, Oxford Univ. Press, 1987. 770 p.
26. Alacam S., Timur S., Telefoncu A. A novel biosensor based on L-homocysteine desulfhydrase enzyme immobilized in eggshell membrane. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2007, vol. 49, no. 1–4, pp. 55–60.
27. Hassana S.S.M., El-Baz A.F., Abd-Rabboh H.S.M. A novel potentiometric biosensor for selective L-cysteine determination using L-cysteine-desulfhydrase producing *Trichosporon jirovecii* yeast cells coupled with sulfide electrode. *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 602, no. 1, pp. 108–113.
28. Krupyanko V.I. A vector method for presenting an enzymatic reaction. Moscow, Nauka, 1990. 144 p. (In Russian)

Received
March 1, 2013

Medyantseva Elvina Pavlovna – Doctor of Chemistry, Professor, Department of Analytical Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Elvina.Medyantseva@ksu.ru*

Brusnitsyn Daniil Vladimirovich – PhD, Department of Analytical Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *brussman@mail.ru*

Varlamova Regina Markovna – PhD in Chemistry, Head of Laboratory, Department of Analytical Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Regina.Varlamova@ksu.ru*

Baibatarova Marina Alekseevna – Student, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

Budnikov Herman Konstantinovich – Doctor of Chemistry, Professor, Department of Analytical Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*