

УДК 543.553.4

АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ТИРОЗИНАЗНЫЕ БИОСЕНСОРЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОМАТЕРИАЛАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ, ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИКЛОФЕНАКА

© 2021 г. Р. М. Бейлинсон^а, А. А. Явишева^а, Э. П. Медянцева^а*, Г. К. Будников^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А. М. Бутлерова
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

*e-mail: emedyant@gmail.com

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

Разработаны амперометрические биосенсоры для определения диклофенака на основе планарных платиновых электродов, модифицированных углеродными нанотрубками в хитозане, фуллереном C₆₀ в Voltorn H20, наночастицами золота в хитозане, и иммобилизованного фермента тирозиназы. Установлено, что диклофенак является обратимым ингибитором тирозиназы, что позволяет определять его с помощью соответствующих биосенсоров, модифицированных наноматериалами, в диапазоне концентраций от 10 пМ до 1 мкМ с c_n 5 пМ. Кинетические исследования реакции ферментативного превращения фенола показали, что в присутствии диклофенака на тирозиназном биосенсоре наблюдается неконкурентное ингибирование. Апробированы методики определения диклофенака с помощью предлагаемых биосенсоров в коровьем молоке.

Ключевые слова: тирозиназный биосенсор, диклофенак, углеродные нанотрубки, фуллерен C₆₀, наночастицы золота.

DOI: 10.31857/S0044450221050078

В настоящее время нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты (НПВП) часто применяют в качестве анальгезирующих и противовоспалительных средств при воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата. Препараты данного класса обладают большим спектром побочных действий, которые по статистике проявляются у 10% больных. Пострадать от приема НПВП могут самые разнообразные органы и системы: пищеварительная, центральная и периферическая нервная система, органы кроветворения, мочеполовая система. Нестероидные противовоспалительные препараты используются в ветеринарии для лечения крупного рогатого скота и, следовательно, могут содержаться в молочной продукции. По этой причине содержание НПВП в пищевых продуктах следует строго контролировать.

Один из часто применяемых препаратов этого класса – диклофенак (натриевая соль 2-(2,6-дихлорфениламино)фенилуксусной кислоты) (схема 1) [1]. Диклофенак обладает выраженным обезболивающим, противовоспалительным и средним жаропонижающим эффектом [2].

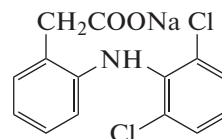


Схема 1. Структурная формула диклофенака.

Разработаны хроматографические [3, 4], оптические [5, 6], электрохимические методы [7, 8] и биосенсорные устройства [9, 10] для обнаружения диклофенака. Несмотря на многообразие имеющихся методов, поиск новых простых, экспрессных, экономичных способов определения лекарственных препаратов по-прежнему актуален.

Один из современных подходов к определению лекарственных соединений, выявлению фальсифицированной продукции заключается в использовании биосенсоров, обеспечивающих требуемую чувствительность и, в отдельных случаях, селективность определений. В этом плане определенные преимущества (доступность биологического материала, низкая стоимость и т.д.) могут иметь биосенсоры на основе тканей растений и животных.

Современный подход к созданию новых и совершенствованию существующих амперометри-

ческих биосенсоров связан с использованием разнообразных способов модификации поверхности первичных преобразователей для придания им определенных свойств. Применение наноматериалов, например углеродных нанотрубок (УНТ), обладающих исключительными электронными свойствами, перспективно для разработки миниатюрных биосенсорных устройств [11].

Фуллерен представляет собой наноразмерные полициклические структуры сферической формы, состоящие из атомов углерода, связанных в пяти- и шестичленные циклы. Фуллерены выделяются среди модификаторов высокой химической устойчивостью и могут рассматриваться как перспективные материалы для увеличения аналитического сигнала в биосенсорах [12].

Модификация наночастицами золота (НЧ Au) приводит к улучшению физических, электрохимических свойств поверхности электродов, их высокой проводимости [13]. Использование наночастиц металлов и углеродного наноматериала дает возможность контролировать плотность заряда, что позволяет напрямую воздействовать на чувствительность сенсора и сохранять его высокую электроактивность. Этот подход перспективен для улучшения характеристик поверхности используемых первичных преобразователей. Особый интерес представляет создание амперометрических биосенсоров на основе сочетания свойств наноматериалов и иммобилизованных ферментов для определения диклофенака.

Цель настоящей работы – разработка амперометрических биосенсоров на основе платиновых планарных электродов, модифицированных УНТ, фуллереном C_{60} , НЧ Au, и иммобилизованного фермента тирозиназы для определения диклофенака, оценка их аналитических возможностей, сравнение результатов анализа, полученных на немодифицированных и модифицированных сенсорах, а также использование полученных результатов для контроля содержания диклофенака в пищевых (в частности, молочных) продуктах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и аппаратура. В качестве основы разрабатываемых биосенсоров выбрана планарная система, состоящая из рабочего электрода, электрода сравнения и вспомогательного электрода (BVT Technologies, Брно, Чехия).

Рабочий электрод, на которой иммобилизовали фермент, изготовлен из платиносодержащей пасты. Вспомогательный электрод также изготовлен из платины. Электродом сравнения служил “псевдохлоридсеребряный” электрод, представляющий собой серебряную проволоку в 0.1 М растворе KCl. Рабочая ячейка системы имеет объем 250 мкл. Измерения на описанных выше элект-

тродах проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора “МЕВ” с компьютеризированным управлением [14]. Для приготовления суспензии УНТ, фуллерена C_{60} , НЧ Au использовали ультразвуковую ванну (Wise-Clean модель WUC-A03H, DAIHAN Scientific-Co. Ltd., Корея), частота 40 кГц.

Фенол марки х. ч. использовали в качестве субстрата. Его растворы готовили по точной навеске. В качестве растворителя применяли рабочий буферный раствор с pH 7.6. Срок хранения указанного раствора не превышал трех часов.

В качестве матричного материала для иммобилизации ферментов на платиновые электроды использовали аминокислотные производные на платформе ГРПО Boltorn H20-NH₂, которые были получены на кафедре неорганической химии КФУ (Казань, Россия).

Использовали 1%-ный раствор глутарового альдегида (ICN, США) и бычий сывороточный альбумин (Reanal, Венгрия). Для получения НЧ Au использовали цитрат натрия х. ч., HCl х. ч., $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$ х. ч., $SnCl_2$ ч., полиэтиленгликоль (PEG-3000) (Sigma-Aldrich, США).

В качестве модификаторов поверхности электродов применяли фуллерен C_{60} , функционализированный гидроксильными группами (Sigma-Aldrich, США), УНТ со следующими геометрическими параметрами: внешний диаметр 10–15 нм, внутренний диаметр 2–6 нм, длина 0.1–10 мкм (Sigma-Aldrich, США).

Использовали хроматографически чистый препарат диклофенак (Sigma-Aldrich, США). Применяли фосфатный буферный раствор (pH 7.60 ± 0.05). Значения pH водных растворов определяли pH-метром pH-150 со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

Подготовка углеродных нанотрубок для модификации электродов. Перед модификацией поверхности электродов смешивали УНТ с 0.5%-ным (по массе) раствором хитозана в 0.05 М уксусной кислоте. Солюбилизацию этой смеси проводили в ультразвуковой ванне при комнатной температуре до получения однородного раствора. Концентрация дисперсии УНТ составила 1 мг/мл. Для поддержания однородности используемых для модификации растворов УНТ периодически (не менее раза в месяц) обрабатывали их ультразвуком.

Получение тирозиназы из гомогената грибов. 10 г мелконарезанного и предварительно замороженного растительного материала (грибов шампиньонов *Agaricus bisporus*) доводили до пастообразной текстуры в замороженной ступке. После этого к гомогенату прибавляли 10 мл фосфатного буферного раствора с pH 7.6 и перемешивали маг-

нитной мешалкой. Отделяли жидкую фракцию фильтрованием через двойной марлевый слой. Фильтрат является прямым источником тирозиназы [15].

Для определения каталитической активности тирозиназы использовали смесь, содержащую фосфатный буфер с рН 7.0, раствор фенола с концентрацией 1 мМ и аликвоту гомогената тирозиназы [16, 17].

Оптическую плотность измеряли при 280 нм в течение примерно 20 мин. Единицу активности фермента определяли как увеличение оптической плотности при 280 нм за определенное время при данных условиях опыта. По спектрофотометрическим данным каталитическая активность тирозиназы составила 165 ± 8 U/ml для образцов из грибов.

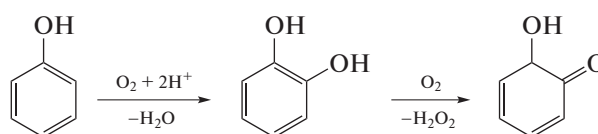
Получение биочувствительной части амперометрического тирозиназного биосенсора на основе печатного платинового электрода. Биочувствительной частью биосенсоров являлась иммобилизованная на поверхности рабочего электрода тирозиназа, полученная из грибов. Для ее получения готовили смесь, состоящую из раствора фермента, дистиллированной воды, фосфатного буферного раствора с рН 7.5, раствора Voltorn H20 и 1%-ного раствора глутарового альдегида. Последний компонент прибавляли в последнюю очередь. Смесь интенсивно перемешивали, после чего на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные данным образом биосенсоры помещали на ночь в закрытую чашку Петри при $+4^\circ\text{C}$. Через 12 ч биосенсоры промывали водой и высушивали. В дальнейшем их хранили в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ литературы показал, что на сегодняшний день отсутствуют амперометрические тирозиназные биосенсоры для определения диклофенака в пищевых продуктах. Фермент тирозиназа может оказаться весьма эффективным для определения возможных эффекторов этого фермента различной природы, учитывая доступные и простые методы получения ферментного препарата из плодовых тел грибов *Agaricus bisporus*. Вследствие этого для создания новых амперометрических биосенсоров для определения диклофенака применяли иммобилизованную тирозиназу, полученную указанным выше способом.

Известно [16], что при действии фермента тирозиназы фенол подвергается биокаталитическому окислению, в ходе которого образуется хинон по схеме 2:

Ферментативная реакция:



Электрохимическая реакция:

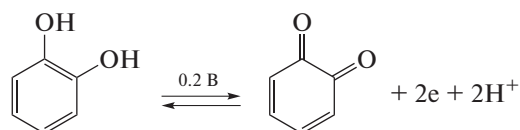
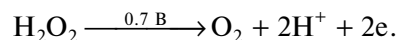


Схема 2. Биокаталитическое и электрохимическое окисление фенола.

В области потенциалов 0.65–0.70 В на циклической вольтамперограмме, полученной с помощью тирозиназного биосенсора, наблюдается дополнительный пик, который относится к окислению пероксида водорода (рис. 1). В соответствии с данными [17] электрохимическое окисление пероксида водорода протекает по схеме:



Пик при потенциале 0.20 В обусловлен, вероятно, электрохимическим окислением фенола до хинона.

При использовании в качестве среды фосфатного буферного раствора с рН 7.60 ± 0.05 [18] каталитическая активность фермента максимальна, поэтому в дальнейшем этот буферный раствор применяли в качестве фонового электролита для выполнения измерений на тирозинажном биосенсоре. Используемая концентрация фенола – субстрата тирозиназы 1 мМ.

Действие диклофенака на каталитическую активность иммобилизованной тирозиназы. Исследование действия диклофенака на иммобилизованную тирозиназу в составе биочувствительной части амперометрического биосенсора показало, что величина аналитического сигнала уменьшается в диапазоне концентраций 1–1000 нМ. Таким образом, впервые сделан вывод о том, что диклофенак является ингибитором ферментативного превращения фенола (рис. 2). Линейная зависимость отношения токов от логарифма концентрации описывается уравнением: $I^* = (-13 \pm 6) + (8.5 \pm 0.8)(-\lg c)$, где $I^* = I_p/I_0 \times 100$ (I_p – ток в присутствии ингибитора, I_0 – ток в отсутствие ингибитора). Разработанный тирозиназный биосенсор позволяет определять концентрации диклофенака от c_n до 0.8 нМ.

Максимальная степень ингибирования составляет для диклофенака в изученной области концентраций при действии на фермент-субстратную систему тирозиназа–фенол $61 \pm 1\%$.

Кинетические параметры реакции ферментативного превращения фенола в присутствии диклофенака. Для выявления закономерностей действия

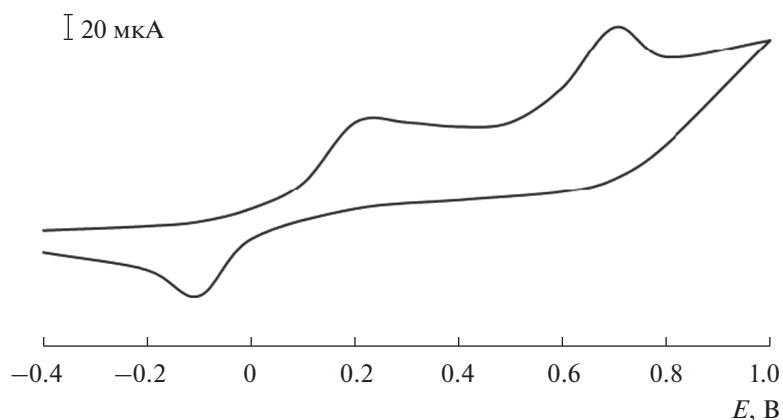


Рис. 1. Циклическая вольтамперограмма продуктов реакции ферментативного превращения фенола в присутствии тирозиназного биосенсора. Концентрация фенола 1 мМ, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с рН 7.6.

определяемого эффектора на иммобилизованную тирозиназу необходимо исследовать кинетические параметры ферментативной реакции (скорость ферментативной реакции, константы Михаэлиса). Кроме того, информацию о характеристических кинетических параметрах и типе ингибирования можно применить для подбора условий, гарантирующих предельный аналитический сигнал при определении малых количеств эффекторов.

Для определения кинетических характеристик, таких как максимальная скорость ингибирования V_{\max} , константа ингибирования K_I и кажущаяся константа Михаэлиса $K_{m \text{ каж}}$, применяли интегральный анализ полной кинетической кривой действия иммобилизованной тирозиназы на фенол в присутствии и в отсутствие эффекторов

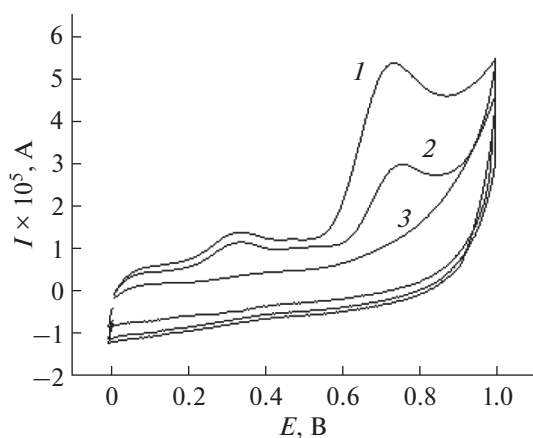


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления хинона и пероксида водорода на тирозинажном биосенсоре в отсутствие диклофенака (1) и в присутствии 1 мкМ диклофенака (2); фосфатного буферного раствора с рН 7.6 (3).

этого фермента [19]. Для определения скорости реакций использовали начальный участок этой кривой.

Результаты кинетического исследования изменения каталитической активности иммобилизованного фермента, входящего в состав тирозиназного биосенсора, при разном содержании диклофенака показали, что имеет место неконкурентный тип ингибирования (табл. 1). Можно предположить, что причиной ингибирования является взаимодействие молекул диклофенака с липофильными участками, находящимися непосредственно у активного центра фермента, в периферийном фрагменте молекулы, вследствие чего образуются стерические препятствия для подхода молекул субстрата к каталитическим сайтам фермента.

Влияние наноструктурированных материалов на аналитические характеристики разрабатываемых биосенсоров. Углеродные нанотрубки – одни из наиболее популярных модификаторов поверхности электродов на сегодняшний день. Значительно реже для модификации применяют фуллерены и их производные. В то же время актуальна проблема как поддержки, так и направленного изменения основных свойств наноуглеродных материалов, входящих в состав сенсоров. Например, при использовании разных стабилизирующих веществ или их сочетаний в составе модификаторов образуются устойчивые дисперсии, сохраняется наноразмерность материалов, что и оказывает положительное влияние на свойства биосенсоров [20].

Для нанесения модификаторов на поверхность планарных электродов применяли метод капельного испарения дисперсии фуллерена в Boltorn H20, УНТ в хитозане или НЧ Au в хитозане. Далее на уже модифицированной поверхности рабочего электрода иммобилизовали раствор тирозиназы.

Таблица 1. Кинетические параметры реакции тирозиназного превращения фенола в присутствии диклофенака ($c_{\text{фенола}} = 1 \text{ мМ}$, $\text{pH } 7.0$, $n = 3$)

Концентрация диклофенака, нМ	$K_m \times 10^4$, моль/л	V_{max} , моль/(л с)	Соотношение параметров K_m и V_{max}	Тип ингибирования	K_I , моль ⁻¹
0	6.9 ± 0.3	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-9}$	$K'_m \approx K_m$	Неконкурентное ингибирование	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^{-9}$
10	7.3 ± 0.3	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-11}$	$V'_{\text{max}} < V_{\text{max}}$		

Особый интерес представляло изучение морфологии поверхности рабочих электродов, модифицированных наноматериалами различной природы. Исследование распределения фуллерена C_{60} на поверхности электрода методом атомно-силовой микроскопии продемонстрировало более однородную поверхность с меньшей шероховатостью по сравнению с поверхностью электрода, модифицированного УНТ (рис. 3, 4). Ниже приведены характеристики детализации структуры поверхности электрода, модифицированного углеродными наноматериалами (S_z – шероховатость поверхности (десять точек по высоте), d – преимущественный размер наноматериалов):

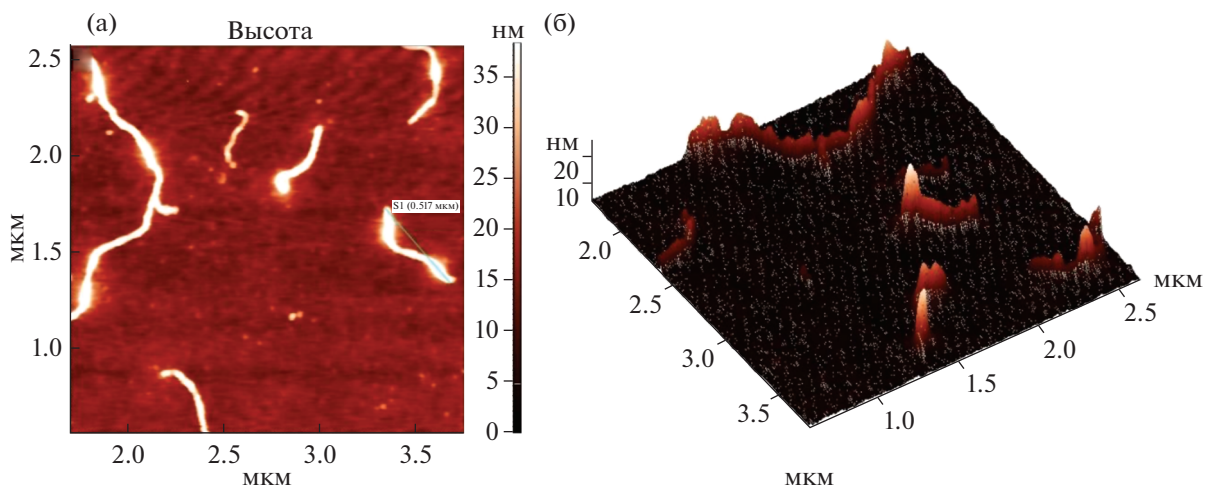
Наноматериал	S_z , нМ	d , нМ
УНТ	19 ± 1	14 ± 2
C_{60} -H20-NH ₂	16 ± 1	39 ± 3

Тирозиназный биосенсор, модифицированный углеродными нанотрубками, фуллереном C_{60} в Voltorn-H20, для определения диклофенака. Предварительные эксперименты показали, что аналитические возможности биосенсоров изменяются при модификации поверхности рабочего электрода.

Исследование влияния диклофенака на иммобилизованную тирозиназу в составе биочувствительной части биосенсора на основе планарных платиновых электродов, модифицированных УНТ или фуллереном C_{60} , показало, что характер его действия не изменился: диклофенак так же ингибирует активность тирозиназы в том же концентрационном диапазоне. Однако модификация поверхности электрода позволила улучшить ряд его аналитических характеристик: увеличить степень ингибирования, повысить коэффициент чувствительности и улучшить коэффициент корреляции (табл. 2).

Наночастицы золота как модификаторы поверхности печатных электродов. В последнее время приобрел популярность прием модификации поверхности электродов наночастицами металлов. Особенно зарекомендовали себя наночастицы золота. Использование нанокompозитов фуллерен C_{60} /НЧ металла или УНТ/НЧ металла – один из современных подходов в биосенсорных технологиях, позволяющий варьировать свойства и улучшать аналитические характеристики биосенсоров.

Синтез НЧ Au в настоящей работе осуществляли путем восстановления золотохлористоводородной кислоты хлоридом олова(II) [21]. Для по-

**Рис. 3.** Изображения в режиме топографии в 2D (а) и 3D (б) проекциях поверхности электрода, модифицированного углеродными нанотрубками в хитозане, размер $2 \times 2 \text{ мкм}$.

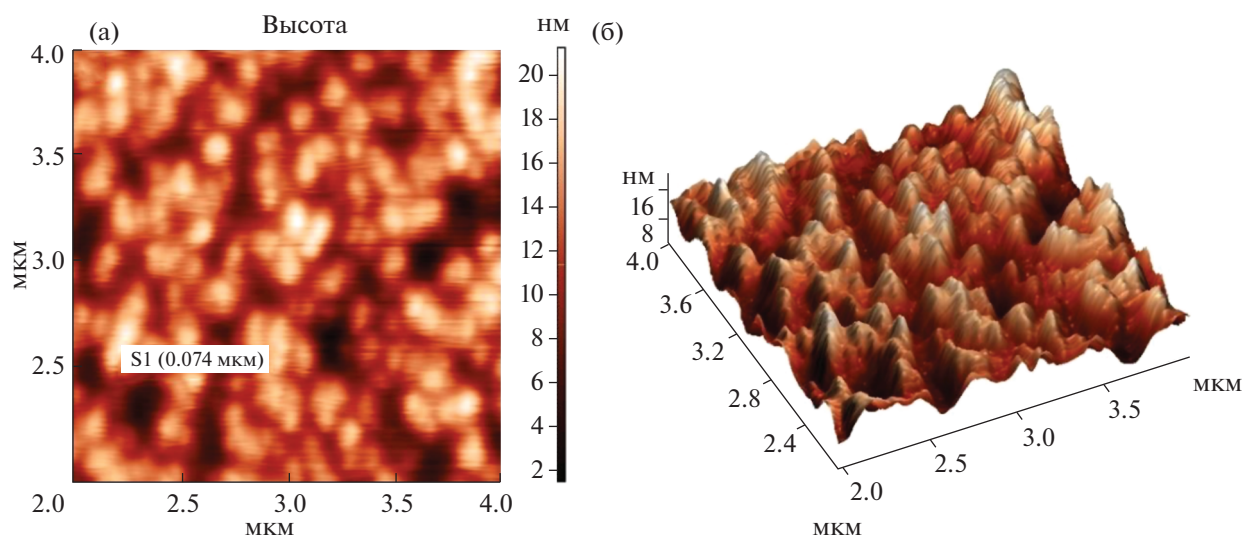


Рис. 4. Изображения в режиме топографии в 2D (а) и 3D (б) проекциях поверхности электрода, модифицированного фуллереном C_{60} в Voltorn H20-NH₂, размер 2.0×2.0 мкм.

лучения дисперсий наночастиц использовали растворы $SnCl_2$ (9500 мг/л), полиэтиленгликоля (10 мг/л) и $HAuCl_4$ (1×10^{-4} мг/л). Стабилизатором выступал хитозан (0.75 мг/л). Для получения суспензии НЧ Au смесь помещали в ультразвуковую ванну для диспергирования на 1 ч. Далее эту суспензию наносили на поверхность рабочего электрода и высушивали в течение суток.

Подтверждением присутствия в растворах НЧ Au конкретного размера служат соответствующие оптические спектры. На оптическом спектре выделяются плазмонные полосы поглощения с максимумом при 580 нм, характерным для поглощения НЧ Au сферической формы, что соответствует размеру наночастиц ~ 50 нм.

Влияние модификации поверхности электродов нанокompозитами УНТ/НЧ Au, фуллереном C_{60} /НЧ Au на аналитические характеристики тирозиназного биосенсора. Исследование влияния диклофенака на модифицированный УНТ, фуллереном C_{60} и НЧ Au тирозиназный биосенсор показало, что диклофенак оказывает ингибирующее действие на тирозиназу в области концентраций

0.01–1000 нМ в случае УНТ/НЧ Au и 0.1–1000 нМ в случае фуллерен C_{60} /НЧ Au (табл. 3). Использование нанокompозитных модификаторов позволило почти на порядок уменьшить c_n и улучшить коэффициент корреляции.

Правильность определения диклофенака в указанных диапазонах концентраций с помощью тирозиназного биосенсора оценивали способом введено-найденно (табл. 4). Максимальная степень ингибирования при действии на фермент-субстратную систему тирозиназа–фенол составила 77% (УНТ/НЧ Au) и 66% (фуллерен C_{60} /НЧ Au) в изученной области концентраций, что больше, чем для немодифицированного биосенсора (см. табл. 3).

В целом следует отметить, что модификация композитами УНТ/НЧ Au и фуллерен C_{60} /НЧ Au позволила улучшить аналитические характеристики разрабатываемых биосенсоров, в частности, расширить диапазон определяемых концентраций и снизить c_n по сравнению с немодифицированным аналогом.

Таблица 2. Аналитические возможности определения диклофенака тирозиназными биосенсорами, модифицированными углеродными нанотрубками и фуллереном C_{60}

Модификатор поверхности электрода	Область рабочих концентраций, нМ	Градуировочная функция $I^* = A + B(-\lg c)$			c_n , нМ	Максимальная степень ингибирования %
		A	B	R		
УНТ	1–1000	-16 ± 5	8.8 ± 0.6	0.9905	0.5	62 ± 1
Фуллерен C_{60}	1–1000	-18 ± 4	9.0 ± 0.5	0.9937	0.2	63 ± 1

* $I = I_p/I_0 \times 100$, где I_p – ток в присутствии ингибитора, I_0 – ток в отсутствие ингибитора.

Таблица 3. Аналитические характеристики определения диклофенака с помощью тирозиназного биосенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, фуллереном C₆₀ и наночастицами Au (*n* = 5, *P* = 0.95)

Модификатор поверхности электрода	Область рабочих концентраций, нМ	Градуировочная функция $I^* = A + B(-\lg c)$			<i>c</i> _н , пМ	Максимальная степень ингибирования, %
		A	B	R		
Фуллерен C ₆₀ /НЧ Au	0.1–1000	-32 ± 4	10.8 ± 0.4	0.9951	60	66 ± 1
УНТ/НЧ Au	0.01–1000	-62 ± 3	14.0 ± 0.3	0.9983	9	77 ± 1

* $I = I_p/I_0 \times 100$, где I_p – ток в присутствии ингибитора, I_0 – ток в отсутствие ингибитора.

Таблица 4. Результаты определения диклофенака с помощью тирозиназного биосенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, фуллереном C₆₀ и наночастицами Au (*n* = 5, *P* = 0.95)

Модификатор поверхности электрода	Введено	Найдено	<i>s</i> _r	Процент открытия, %
–	40 нМ	40 ± 3 нМ	0.069	98–113
УНТ	50 мкМ	50 ± 3 мкМ	0.059	96–108
Фуллерен C ₆₀	3 мкМ	2.9 ± 0.2 мкМ	0.063	93–103
УНТ/НЧ Au	0.7 нМ	0.72 ± 0.05 нМ	0.070	96–110
Фуллерен C ₆₀ /НЧ Au	6 нМ	5.7 ± 0.4 нМ	0.070	88–102

Определение диклофенака в молоке. Нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак оказывает сильное анальгезирующее и противовоспалительное действие и используется в ветеринарии для лечения крупного рогатого скота и, следовательно, может содержаться в молочной продукции. Содержание этого препарата строго регламентируется нормативными документами Европейского Союза, согласно которым ПДК диклофенака в молоке составляет 0.1 мкг/л.

Пробоподготовка образцов молока (1.5% жирности) для анализа заключалась в разбавлении в 10 раз боратным буферным раствором. Этого достаточно для уменьшения влияния матричных компонентов.

Установлено, что зависимость величины аналитического сигнала от концентрации диклофенака на фоне молока в случае амперометрического тирозиназного биосенсора, модифицированного УНТ/НЧ Au, линейна в той же области концентраций, что и на фоне буферного раствора. Следовательно, можно использовать любой из полученных ранее градуировочных графиков (табл. 3) для определения остаточных количеств лекарственных препаратов в образцах молока.

В образцах молока 1.5%-ной жирности разных производителей (“Каждый день”, ОАО “МК Сарапул-молоко”, Сарапул; “Очень важная корова”, ОА “Зеленодольский молочноперерабатывающий комбинат”, Зеленодольск) диклофенак не обнаружен.

Для оценки правильности полученных с помощью разработанных биосенсоров результатов

определения диклофенака использовали метод поляризации флуоресценции, вариант конкурентного иммуноанализа на основе ПФИА (поляризационный флуоресцентный иммунный анализ) [22]. При этом не требовалась какая-либо сложная предварительная пробоподготовка. Линейный диапазон определяемых концентраций диклофенака составил от 2.2 до 255 мкг/л с процентом открытия от 32 до 196%. Продолжительность анализа варьировалась от 20 до 30 мин.

Данная методика с оптимизированными условиями (разведение антител и трейсера, способ пробоподготовки) апробирована в анализе образцов молока. Предварительные исследования показали, что для получения более воспроизводимых и точных результатов необходимо построение градуировочной зависимости концентрации диклофенака от поляризации флуоресценции на фоне молока.

Правильность определения диклофенака с помощью разработанных методик оценивали способом введено–найдено (табл. 5). Погрешность определения (*s*_r) не превышает 0.072. Полученные результаты сопоставимы (равноточны) с данными метода ПФИА и вклад систематической погрешности незначим (табл. 5).

Аналогичные по назначению иммуносенсоры позволяют в отдельных случаях определять более низкие концентрации диклофенака (предел обнаружения на уровне 10 фМ), однако речь идет об определении лекарственного препарата в более узком диапазоне концентраций и в более простом объекте (вода) [9]. Аптасенсоры работают в дру-

Таблица 5. Результаты (мг/мл) определения содержания диклофенака в образцах молока тирозиназным биосенсором, модифицированным УНТ/НЧ Au, и методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (введено 8×10^{-7} мг/мл диклофенака, $n = 5$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.31$, $F_{\text{табл}} = 6.39$)

Способ определения	Найдено	s_r
Тирозиназный биосенсор	$(8.3 \pm 0.6) \times 10^{-7}$	0.072
ПФИА	$(7.6 \pm 0.5) \times 10^{-7}$	0.066

Примечание. $t_{\text{расч}} = 2.1$, $F_{\text{расч}} = 1.5$.

гом диапазоне концентраций (до 1–5 мкМ) [10]. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что разработанный тирозиназный биосенсор, модифицированный УНТ/НЧ Au, по своим аналитическим возможностям не уступает известным аналогам, а в некоторых случаях даже превосходит их и может быть использован для контроля качества молока.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eteya M.M., Rounaghi G.H., Deiminiat B. Fabrication of a new electrochemical sensor based on Au–Pt bimetallic nanoparticles decorated multi-walled carbon nanotubes for determination of diclofenac // *Microchem. J.* 2019. V. 144. P. 254.
2. Buer J.K. Origins and impact of the term 'NSAID' // *Inflammopharmacology.* 2014. V. 22. № 5. P. 263.
3. Suenami K., Wah L.L., Toyohide T., Suenami L. L., Sasajima Y., Sato K., Takekoshi Y., Kanno S. Rapid and simultaneous determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by LC–MS with solid-phase extraction // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 384. № 7–8. P. 1501.
4. Igualada C., Moragues F., Pitarch J. Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography–mass spectrometry with ion-trap detector // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 586. № 1–2. P. 432.
5. Jaenicke E., Decker H. Tyrosinases from crustaceans form hexamers // *J. Biochem.* 2003. V. 371. P. 515.
6. Tubino M. Souza R.L. Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry // *Talanta.* 2006. V. 68. P. 776.
7. Oliveira M.C., Bindewald E.H., Marcolino L.H., Jr., Bergamini M.F. Potentiometric determination of diclofenac using an ion-selective electrode prepared from polypyrrole films // *J. Electroanal. Chem.* 2014. V. 732. P. 11.
8. Yilmaz B., Ciltas U. Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by voltammetry and gas chromatography methods // *J. Pharm. Anal.* 2015. V. 5. № 3. P. 153.
9. Nguyna T.T.K., Vub T.T., Anquetina G., Tran H. Enzyme-less electrochemical displacement heterogeneous immunosensor for diclofenac detection // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 97. P. 246.
10. Kashefi-Kheyraadi L., Mehrgardi M.A. Design and construction of a label free aptasensor for electrochemical detection of sodium diclofenac // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 1. P. 184.
11. Штыков С.Н. Проблемы аналитической химии. М.: Наука, 2015. Т. 20. 431 с.
12. Yates C.R., Hayes W. Synthesis and applications of hyperbranched polymers // *Eur. Polym. J.* 2004. V. 40. P. 1257.
13. Tarozaitė R., Juškėnas R., Kurtinaitienė M., Jagminienė A., Vaskelis A. Gold colloids obtained by Au(III) reduction with Sn(II): Preparation and characterization // *Chemija.* 2006. V. 17. № 2–3. P. 1.
14. Варламова Р.М., Медянцева Э.П., Хамидуллина Р.Р., Будников Г.К. Определение пагулина амперометрическими тирозиназными биосенсорами на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками и наночастицами золота // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2016. Т. 158. кн. 3. С. 351.
15. Amjad A., Suhail A., Qayyum H. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support // *Process Biochem.* 2005. V. 40. P. 2379.
16. Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Стойкова Е.Е. Основы биосенсорики: учебное пособие. Казань: Казан. гос. ун-т. 2007. 82 с.
17. Кулис Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс: Мокслас, 1981. 200 с.
18. Zhao Q., Zhuang Q.K. Determination of phenolic compounds based on the tyrosinase- single walled carbon nanotubes sensor // *Electroanalysis.* 2005. V. 17. № 1. P. 85.
19. Березин И.В., Клёсов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Наука, 1976. 320 с.
20. Медянцева Э.П., Брусницын Д.В., Варламова Р.М., Байбатарова М.А., Будников Г.К., Фаттахова А.Н. Определение антидепрессантов амперометрическими моноаминоксидазными биосенсорами на основе графитовых печатных электродов, модифицированных многостенными углеродными нанотрубками // *Хим.-фарм. журн.* 2014. Т. 48. № 7. С. 52.
21. Шапканова О.Ю., Ермолаева Т.Н. Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. Вып. 5. С. 677.
22. Rausyan A., Moerer R., Coesfeld B., Eremin S., Schneider R. Fluorescence polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03058-w>