

УДК 543.866

ВОЗМОЖНОСТИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ГЕКСАМОЛИБДЕНОВЫХ КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АМИТРИПТИЛИНА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ ИММУНОСЕНОРАМИ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Д. В. Брусницын^{a,*}, Э. П. Медянцева^a, А. Н. Рамазанова^a,
А. В. Прыткова^a, Э. Р. Каримова^b, Ю. Г. Елистратова^c,
А. Р. Мустафина^c, М. Н. Соколов^d, С. А. Еремин^e,
Л. И. Мухаметова^e

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

^bМежрегиональный клинико-диагностический центр
ул. Карбышева, 12а, Казань, 420101 Россия

^cИнститут органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, Федеральный исследовательский центр
“Казанский научный центр” Российской академии наук
ул. Ак. Арбузова, 8, Казань, 420088 Россия

^dИнститут неорганической химии им. А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук
просп. Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090 Россия

^eМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*E-mail: brussman@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 24.10.2023 г.

Разработан способ определения амитриптилина как представителя трициклических антидепрессантов иммуносенсорами с использованием супрамолекулярных систем на основе гексамолибденовых кластерных комплексов в моче человека. Данные комплексы обладают электрохимической активностью и дают стабильный аналитический сигнал, что использовано при разработке амперометрических иммуносенсоров. Для доказательства образования супрамолекулярной системы самоорганизованных гексамолибденовых наночастиц и молекул хитозана применили методы люминесценции и динамического рассеяния света. Разработан композитный материал на основе гексамолибденовых кластерных комплексов в сочетании с восстановленным оксидом графена. Рабочий диапазон концентраций амитриптилина при определении амперометрическим иммуносенсором составил 1×10^{-9} – 1×10^{-4} М, нижняя граница определяемых содержаний лежит на уровне 5×10^{-10} М, содержание амитриптилина в образцах мочи – на уровне $(n - 7) \times 10^{-8}$ М. Сопоставление результатов анализа амперометрическим иммуносенсором и поляризационным флуоресцентным иммуноанализом показало отсутствие значимых систематических погрешностей. Возможность определения амитриптилина в биологических жидкостях позволяет подобрать оптимальную терапевтическую дозу лекарственного препарата, т.е. разработать подходы к созданию персонифицированной медицины.

Ключевые слова: кластерные комплексы молибдена, иммуносенсор, антитела, трициклические антидепрессанты.

DOI: 10.31857/S0044450224060092, EDN: ttrizi

Для определения лекарственных веществ чаще всего применяют хроматографические методы анализа, в частности газовую или высокоэффективную жидкостную хроматографию, капиллярный электрофорез, tandemную масс-спектрометрию в сочетании с хроматографией [1–10]. Данные варианты требуют проведения определенной пробоподготовки, что увеличивает продолжительность анализа, поэтому, на наш взгляд, более предпочтительно использовать иммунохимические методы анализа [11, 12].

В связи с большим количеством стрессовых ситуаций, ухудшением экологической обстановки и высокими темпами урбанизации каждый год растет число депрессивных расстройств у человека. Лечение таких заболеваний необходимо проводить в условиях строгого контроля содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях. Для этих целей требуется разработка высокочувствительных, селективных, экспрессных иммунохимических методов анализа, которые в отдельных случаях позволяют проводить мониторинг лекарственных веществ, в частности трициклических антидепрессантов, *in situ*.

Восстановленный оксид графена — один из перспективных углеродных материалов для создания сенсоров [13–17]. За счет его применения достигнуто улучшение электрохимических характеристик разрабатываемых устройств, в частности электропроводности подложки, и увеличение удельной площади поверхности используемых трансдьюсеров [18–20].

Особое внимание исследователей в настоящее время привлекают супрамолекулярные системы на основе кластерных комплексов переходных металлов. Необходимо отметить, что области применения кластерных комплексов переходных металлов довольно разнообразны: их применяют в качестве люминесцентных и теплоизоляционных материалов, при создании датчиков кислорода, электрооптических устройств, используют для биовизуализации тканей, фотокатализа, в качестве антибактериальных и противоопухолевых фотодинамических агентов [21]. Публикации об использовании кластерных комплексов переходных металлов, в частности гексамолибденовых кластерных комплексов, а также их сочетаний с восстановленным оксидом графена в составе биосенсоров отсутствуют.

Следует отметить, что проведение анализа мочи на присутствие в ней лекарственных веществ требует от исследователей определенных навыков работы со сложными системами, в которых могут присутствовать вещества, обладающие электрохимической активностью в области рабочих потенциалов при амперометрических измерениях.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке амперометрических иммуносенсоров на основе планарных графитовых элект-

родов, модифицированных супрамолекулярной системой на основе гексамолибденовых кластерных комплексов в сочетании с восстановленным оксидом графена в хитозане, для определения трициклических антидепрессантов в моче человека на примере amitriptilina.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве первичного преобразователя сигнала использовали графитовые печатные (планарные) электроды конструкции три в одном. Более подробно их устройство описано в работе [22]. Электрохимическую стабилизацию и очистку поверхности планарных электродов проводили согласно методике [23].

Для проведения вольтамперометрических измерений использовали потенциостат/гальваностат 204 (Autolab, Нидерланды).

Правильность полученных результатов проверяли на многофункциональном планшетном анализаторе PolarStarOmega (BMGLabtech, Германия) в режиме поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Более подробное описание прибора и метода приведены в работе [24].

Обработку вольтамперных кривых проводили с помощью программного обеспечения для потенциостата/гальваностата Nova 2013 версии 1.10.19, построение градуировочных графиков — в наборе пакетных программ Origin 2018 версии 9.50.00, схему функционирования иммуносенсора строили в наборе пакетных программ ChemOffice 2018 версии 18.0.

Измеряли динамическое рассеяние света (DLS) и определяли электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) с помощью анализатора размера наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25°C. Значения электрокинетических потенциалов рассчитывали по уравнению Гельмгольца—Смолуховского. Размер частиц определяли трижды для каждого образца.

Спектры люминесценции получали на спектрофлуориметре Hitachi F-7100 с использованием кварцевых кювет толщиной 10 мм. Длина волны возбуждения составляла 380 нм, величину люминесценции регистрировали в диапазоне 400–750 нм при напряжении 500 В, размеры щели составляли 10 мм.

Поверхность планарных электродов модифицировали, используя дисперсии восстановленного оксида графена (Sigma Aldrich, США) и гексамолибденовых кластерных комплексов в хитозане марки х. ч. (раствор хитозана готовили в 2%-ной уксусной кислоте марки х. ч.).

Октаэдрический кластерный комплекс молибдена с апикальным лигандом трифторацетатом $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ был синтезирован в Институте неорганической химии

им. А.В. Николаева Сибирского отделения РАН по методике [25].

Методика получения наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$. Навеску кластера растворяли в 0.2 мл ацетонитрила и доводили водой до 5 мл ($c_0 = 2 \times 10^{-4}$ М). $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ ($c_1 = 3.5 \times 10^{-5}$ М) смешивали с 1 мл хитозана ($c = 0.05$ М) и подвергали УЗ-диспергированию в течение 10 мин при температуре воды $25 \pm 2^\circ\text{C}$. После этого отделяли полученные наночастицы путем центрифугирования (15 000 об/мин при 4°C в течение 15 мин). Супернатант анализировали на спектрофлуориметре.

Концентрация дисперсии комплекса $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$ составляла 3.5×10^{-6} М, а восстановленного оксида графена — 2 мг/мл.

В ходе приготовления рабочего раствора лекарственного вещества амитриптилин применяли центрифугу MiniSpin (Eppendorf, Германия).

Ацетатные буферные растворы с pH 4.5–5.5, фосфатные буферные растворы с pH 6.0–7.5 и боратные буферные растворы с pH 8.0–11.0 готовили из препаратов х. ч. и ч. д. а (ЗАО “Лаверна”, Россия).

В качестве биочувствительного компонента применяли поликлональные антитела (Ar) против трициклических антидепрессантов фирмы MicroPharm Ltd (Великобритания). Приготовление и последующее нанесение смеси для иммобилизации Ат на поверхность электрода осуществляли по методике, описанной в работе [26].

Образцы мочи человека, включающей амитриптилин, были предоставлены МСЧ КФУ (Казань, Россия).

Объект анализа: лекарственное вещество амитриптилин (Sigma-Aldrich, США) и содержащий его фармацевтический препарат “Амитриптилин” (ЗиО-Здоровье, Подольск, Россия). Серию стандартных растворов лекарственного вещества в рабочем диапазоне концентраций готовили по точной навеске.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве композитного модификатора использовали $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$ и $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$ в сочетании с восстановленным оксидом графена (ВГО) в хитозане для создания высокочувствительных и селективных иммуносенсоров.

Известно, что октаэдрические кластеры молибдена обладают высокой фотостабильностью, низкой токсичностью, хорошо выраженной люминесценцией в диапазоне 650–750 нм, их электрохимическая активность дает возможность применения в электрохимическом анализе [27]. Кроме того, вариация структуры апикальных лигандов позволяет проводить тонкую настройку люминесцентных и электрохимических характеристик кластеров [27]. Однако введение в структуру кластеров апикальных лигандов с гидрофобными заместителями приводит к плохой растворимости в воде, поэтому для перевода нерастворимых в воде кластерных солей в диспергируемые в воде формы наночастиц использовали метод наноосаждения [19], который представляет собой одностадийный процесс, известный также как метод замещения растворителя. На первом этапе кластеры растворяли в органическом растворителе, затем органический раствор кластера медленно добавляли в водную фазу. В результате получили коллоидно-устойчивые Mo_6 -наночастицы размером 234 нм, обладающие отрицательным дзета-потенциалом (ζ -потенциал = -35 мВ), которые модифицировали хитозаном. Модификация хитозаном приводит к перезарядке поверхности Mo_6 -наночастиц и увеличению размера полученных наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$ (табл. 1).

Таким образом, методы люминесценции и динамического рассеяния света позволили выявить образование супрамолекулярной системы на основе самоорганизованных Mo_6 -наночастиц и молекул хитозана.

Степень перехода кластерных блоков в наночастицы $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$ составляет 81%; такую оценку получили люминесцентным анализом супернатантов после фазового отделения наночастиц. Спектры люминесценции на рис. 1 иллюстрируют уменьшение интенсивности люминесценции наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ вследствие их перехода в $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$. Предположительно, взаимодействие наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ с хитозаном осуществляется за счет электростатических сил, создаваемых отрицательным поверхностным зарядом $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ наночастиц (ζ -потенциал = -35 мВ) и положительным зарядом протонированных аминогрупп хитозана, что приводит к перезарядке поверхности

Таблица 1. Характеристика супрамолекулярных систем

Соединение	d, нм	PDI (индекс полидисперсности)	ζ -потенциал, мВ
Наночастицы Mo_6	234	0.341	-35
$(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]@\text{хитозан}$	658	0.431	+67

$(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$. По данным динамического рассеяния света, ζ -потенциал приобретает значение +67 мВ.

При нанесении наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ на поверхность электрода на дифференциальной импульсной вольтамперограмме на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5 наблюдается пик окисления при потенциале $E = 127 \pm 8$ мВ, связанный с окислением кластерного ядра $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}/\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{5+}$ [28].

Изменение поверхности электрода за счет нанесения композитного модификатора (ВГО в сочетании $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозан) приводит к смещению потенциала на 46 мВ в сторону менее положительных потенциалов и увеличению тока окисления более чем в 40 раз (рис. 2). Увеличение тока, возможно, связано с присутствием в составе модификатора хитозана, который является полиэлектролитом, и восстановленного оксида графена, хорошо проводящего электрический ток [29, 30].

Установили, что модификаторы на основе $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозана дают стабильный и воспроизводимый сигнал

на вольтамперной кривой, поэтому в качестве аналитического сигнала амперометрического иммуносенсора выбрали ток окисления $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозана. Это позволило разработать два иммуносенсора для определения амитриптилина (табл. 2). Первый иммуносенсор получили нанесением только наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозан, второй — композита $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозана с оксидом графена.

При разработке иммуносенсора установили, что оптимальным разбавлением Аг, которое обеспечивает получение максимального аналитического сигнала иммуносенсора, является 1 : 50.

Принцип работы иммуносенсора можно представить следующим образом (рис. 3): на поверхность чистого планарного электрода наносят капельным методом ВГО в хитозане. После высыхания наносят $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозан. Затем на полученную модифицированную поверхность наносят иммобилизованную смесь, содержащую Аг против трициклических антидепрессантов, хитозан, глутаровый альдегид и фосфатный буферный раствор с pH 7.5. После высыхания в течение одного дня при комнатной температуре полученный иммуносенсор хранят в холодильнике при 4°C. Для определения антигена (Аг) (амитриптилина) иммуносенсор помещают в электрохимическую ячейку с раствором аналита.

Образование иммунного комплекса Аг–Ат на поверхности планарного модифицированного электрода приводит к изменению (уменьшению) величины аналитического сигнала (рис. 4), что может быть связано со стерическими эффектами на поверхности электрода.

Оценили аналитические характеристики разработанных иммуносенсоров при определении амитриптилина. Для иммуносенсора 1 диапазон рабочих концентраций составляет 1×10^{-9} – 1×10^{-5} М, нижняя граница определяемых содержаний — на уровне 8×10^{-10} М. Лучшие аналитические характеристики при определении амитриптилина достигнуты для иммуносенсора 2: более широкий диапазон рабочих концентраций

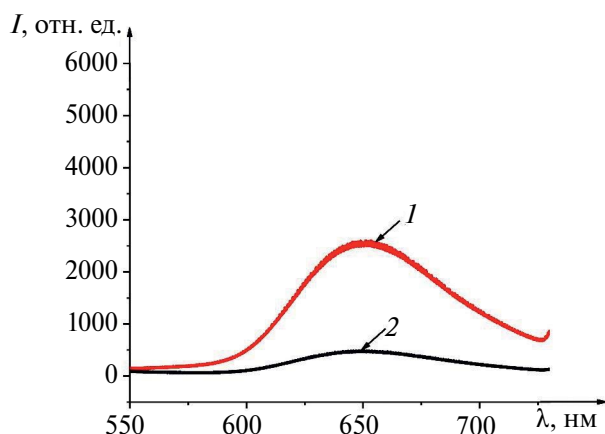


Рис. 1. Спектры люминесценции $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ (1) и супернатанта после отделения наночастиц $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозан (2). $\lambda_{\text{ex}} = 380$ нм.

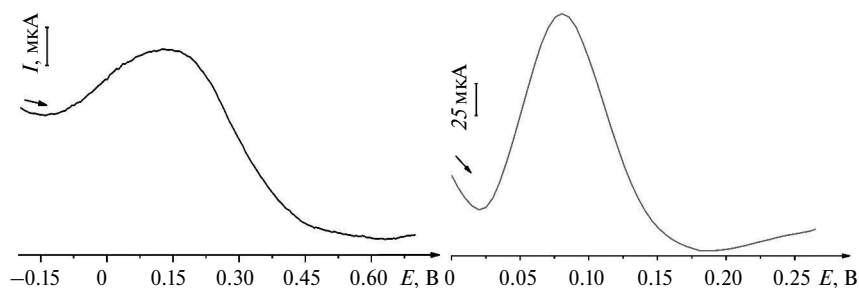


Рис. 2. Дифференциальные импульсные вольтамперограммы планарных электродов, модифицированных супрамолекулярными системами на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5: (а) $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозан; (б) ВГО–хитозан / $(n\text{-Bu}_4\text{N})_2[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{CF}_3\text{COO})_6]$ @ хитозан.

Таблица 2. Аналитические характеристики амперометрических иммуносенсоров при определении амитриптилина (разведение антител 1 : 50, $n = 5$, $P = 0.95$)

Область рабочих концентраций, М	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg c)$			c_n , М
	$A \pm \delta$	$B \pm \delta$	r	
Иммуносенсор 1 ((n-Bu ₄ N) ₂ [{Mo ₆ I ₈ }(CF ₃ COO) ₆]@хитозан)				
$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$	130 ± 10	$-(5.3 \pm 0.5)$	0.9915	8×10^{-10}
Иммуносенсор 2 (ВГО-хитозан/(n-Bu ₄ N) ₂ [{Mo ₆ I ₈ }(CF ₃ COO) ₆]@хитозан)				
$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-4}$	245 ± 12	$-(16.5 \pm 0.8)$	0.9957	5×10^{-10}

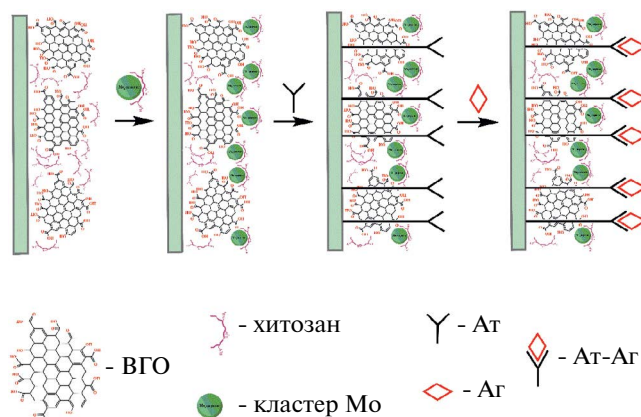
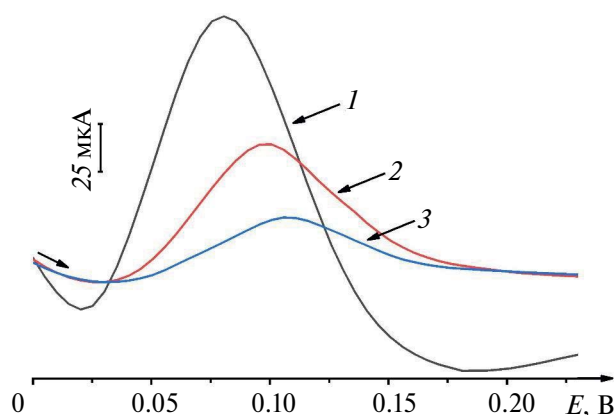
* $I^* = ((I_{At} - I_K)/I_{At}) \times 100\%$, где I_{At} – величина аналитического сигнала (ток) в присутствии At, I_K – величина аналитического сигнала (ток) при образовании иммунного комплекса At–Ag.

$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-4}$ М и более низкая нижняя граница определяемых содержаний на уровне 5×10^{-10} М, более высокий коэффициент чувствительности, чем для иммуносенсора 1 (табл. 2).

Методика определения амитриптилина в моче человека. Образцы мочи разбавляли в 10 раз фосфатным буферным раствором с pH 7.5 (объем пробы от 5 до 50 мл), добавляли тот же буферный раствор до объема 2 мл (электрохимическая ячейка объемом 2 мл), опускали иммуносенсор в ячейку, содержащую раствор аналита (время инкубации 5 мин). Затем регистрировали иммуносенсором токи окисления при потенциале $E = 130 \pm 8$ мВ. В растворах образца мочи человека, принимавшего амитриптин, происходит уменьшение тока окисления модификатора ВГО–хитозан/(n-Bu₄N)₂[(Mo₆I₈)(CF₃COO)₆]@хитозан, что указывает на присутствие Ag. По градуировочному графику рассчитывали концентрацию амитриптилина в моче (табл. 1). В образцах мочи человека, не использующего амитриптин в терапевтических целях, подобного изменения аналитического сигнала не наблюдали.

Ранее нами доказано [23], что ни лекарственные соединения других классов, ни компоненты искусственной и натуральной мочи не влияют на эффективность взаимодействия антитело–амитриптин.

Сопоставление результатов, полученных с помощью амперометрического иммуносенсора 2 и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, по t - и F -критериям показало, что они равнозначны и вклад систематической погрешности незначим. Погрешность определения не превышает 0.068 (табл. 3). Подробное

**Рис. 3.** Схема функционирования иммуносенсора.**Рис. 4.** Дифференциальные импульсные вольтамперограммы планарных электродов, модифицированных супрамолекулярными системами ВГО–хитозан / (n-Bu₄N)₂[(Mo₆I₈)(CF₃COO)₆]@хитозан на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5 в присутствии At (1), 1×10^{-7} М амитриптилина (2), 1×10^{-5} М амитриптилина (3).**Таблица 3.** Результаты определения амитриптилина в моче ($t_{\text{табл}} = 2.78$, $F_{\text{табл}} = 6.39$, $n = 5$, $P = 0.95$)

Метод	Найдено, М	s_r	$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
Амперометрический иммуносенсор 2	$(7.15 \pm 0.45) \times 10^{-8}$	0.065	1.32	2.17
Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ	$(7.25 \pm 0.48) \times 10^{-8}$	0.068		

описание получения трейсера для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа приведено в работе [24].

* * *

Таким образом, установлено, что гексамолибденовые кластерные комплексы, нанесенные на поверхность графитовых печатных электродов, обладают электрохимической активностью и дают стабильный сигнал в виде пика на вольтамперограммах на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.5. Совместное нанесение восстановленного оксида графена и гексамолибденовых кластерных комплексов приводит к значительному увеличению тока пика и смещению потенциала на вольтамперограмме в менее положительную область. Данные модификаторы использовали при разработке амперометрических иммуносенсоров при определении трициклического антидепрессанта амитриптилина, в том числе следовых количествах. Применение композитных материалов в составе иммуносенсоров позволило расширить диапазон определяемых концентраций, снизить нижнюю границу определяемых содержаний и улучшить коэффициент чувствительности (табл. 2). Разработанный иммуносенсор апробировали при определении амитриптилина в образцах мочи человека. Результаты определения амитриптилина амперометрическим иммуносенсором и поляризационным флуоресцентным иммуноанализом равноточны и вклад систематической погрешности незначим, что указывает на правильность разработанного способа определения трициклических антидепрессантов в образцах мочи человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Межрегионального клинико-диагностического центра (Казань, Россия) № 134 от 15 августа 2023 г. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tarley C.R.T., Gorla F.A., Oliveira de F.M., Nascentes C.C., Ferreira P. do M., Costa da F.M., Segatelli M.G. Investigation of the performance of cross-linked poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) as efficient adsorbents in SPE columns for simultaneous preconcentration of tricyclic antidepressants in water samples // *Anal. Methods*. 2022. V. 14. № 48. P. 5100. <https://doi.org/10.1039/D2AY01520J>
2. Farajzadeh M.A., Barazandeh S., Pezhhanfar S., Mogaddam A.R.M. Facile Preparation of graphene-modified magnetic nanoparticles and their application in the analysis of four anti-depressant drugs in plasma and urine // *ImmunoAnalysis*. 2023. V. 3. № 4. <https://doi.org/10.34172/ia.2023.04>
3. Zhao L.-Y., Zhao L.-L., You X.-Y., Zheng X.-X., Du Y., Tang Q.-D. Development and evaluation of a simple and easy high-performance liquid chromatography–ultraviolet system simultaneously suitable for determination of 24 anti-epileptic drugs in plasma // *J. Sep. Sci.* 2022. V. 45. № 13. P. 2161. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200246>
4. Haiyan L., Binbin C., Xiangzhen X., Chunyan Z., Chunling M., Yu D., et al. Rapid simultaneous determination of 14 antidepressants and 13 antipsychotics in human plasma by using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with dynamic multiple reaction monitoring and its application to therapeutic drug monitoring // *Ther. Drug Monit.* 2021. V. 43. № 4. P. 577. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000839>
5. Guzinski M., Lindner E., Pendley B., Chaum E. Electrochemical sensor for tricyclic antidepressants with low nanomolar detection limit: Quantitative determination of amitriptyline and nortriptyline in blood // *Talanta*. 2022. V. 239. Article 123072. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123072>
6. Oliveira de M.F., Scheel L.G., Augusti R., Tarley T.R.C., Nascentes C.C. Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1106. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.061>
7. Oenning L.A., Birk L., Eller S., Oliveira de F.T., Merib J., Carasek E. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography – mass spectrometry detection // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020. V. 1143. Article 122069. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122069>
8. Zaher El A.A., Kady El F.E., Messiry EL M.H., Ghwas El E.H., Houssini El M.O. Synchronous LC-MS/MS determination of pantoprazole and amitriptyline in rabbit plasma: Application to comparative in vivo pharmacokinetic study of novel formulated effervescent granules with its marketed tablet dosage

- form // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 8. Article e07752. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07752>
9. *Vejar-Vivar C., Bustamante L., Lucena R., Ortega C., Valenzuela M., Mardones C.* Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in post-mortem blood // *Microchem. J.* 2021. V. 171. Article 106797. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>
 10. *Yuan J., Huang W., Tong W., Chen Z., Li H., Chen J., Lin Z.* In-situ growth of covalent organic framework on stainless steel needles as solid-phase microextraction probe coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive determination of tricyclic antidepressants in biosamples // *J. Chromatogr. A*. 2023. V. 1695. Article 463955. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463955>
 11. *Krieg K.A., Gauglitz G.* Ultrasensitive label-free immunoassay for optical determination of amitriptyline and related tricyclic antidepressants in human serum // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 17. P. 8845. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b0189>
 12. *Seyfinejad B., Jouyban A.* Overview of therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs: Analytical and clinical practices // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. V. 205. Article 114315. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114315>
 13. *Ahmed A., Singh A., Young Sh.-J., Gupta V., Singh M., Arya S.* Synthesis techniques and advances in sensing applications of reduced graphene oxide (rGO) Composites: A review // *Composites. Part A*. 2023. V. 165. Article 107373. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2022.107373>
 14. *Swetha P.D.P., Nikitha A., Shenoy M.M., Shim Y.-B., Prasad K.S.* Ni/Ni(OH)₂-rGO nanocomposites sensor for the detection of long forgotten mycotoxin, xanthomegnin // *Talanta*. 2023. V. 253. Article 123953. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123953>
 15. *Kalkal A., Pradhan R., Packirisamy G.* Gold nanoparticles modified reduced graphene oxide nanosheets based dual-quencher for highly sensitive detection of carcinoembryonic antigen // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. V. 242. Article 125157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125157>
 16. *Muthu D., Govindaraj R., Manikandan M., Ramasamy P., Haldorai Y., Kumar R.T.R.* Reduced graphene oxide supported monoclinic bismuth vanadate nanoparticles as an electrocatalyst for selective determination of dopamine in human urine samples // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 297. Article 127437. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127437>
 17. *Kumar S., Singh D., Pathania D., Awasthi A., Singh K.* Molybdenum disulphide-nitrogen doped reduced graphene oxide heterostructure based electrochemical sensing of epinephrine // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 297. Article 127446. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127446>
 18. *Alinejadian N., Kazemi S.H., Nasirpour F., Odnevall I.* Electro-deposited nano-Ni/reduced graphene oxide composite film of corrugated surface for high voltammetric sensitivity // *Mater. Chem. Phys.* 2023. V. 297. Article 127288. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.127288>
 19. *Kalyani T., Sangili A., Kotal H., Kaushik A., Chaudhury K., Jana S.K.* Ultra-sensitive label-free detection of haptoglobin using Au-rGO decorated electrochemical sensing platform: Towards endometriosis diagnostic application // *Biosens. Bioelectron.* X. 2023. V. 14. Article 100353. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100353>
 20. *Tan Y.-Y., Tan H.-S., Liu M., Li S.-S.* Electrochemical ratiometric dual-signal immunoassay for accurate detection of carcinoembryonic antigen in clinical serum based on rGO-Pd@Au-Thi and Chi-Fc-Au // *Sens. Actuators B*. 2023. V. 380. Article 133340. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133340>
 21. *Nguyen K.T.N., Lebastard C., Wilmet M., Dumait N., Renaud A., Cordier S., Ohashi N., Uchikoshi T., Grasset F.* A review on functional nanoarchitectonics nanocomposites based on octahedral metal atom clusters (Nb₆, Mo₆, Ta₆, W₆, Re₆): Inorganic 0D and 2D powders and films // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2022. V. 23. № 1. P. 547. <https://doi.org/10.1080/14686996.2022.2119101>
 22. *Медянцева Э.П., Брусницын Д. В., Газизуллина Э.Р., Бейлинсон Р.М., Еремин С.А., Кутырева М.П., Улахович Н.А., Будников Г.К.* Наноразмерные материалы в составе биосенсоров для определения амитриптилина // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. 2021. Т. 87. № 9. С. 20. (*Medyantseva E.P., Brusnitsyn D.V., Gazizullina E.R., Beylinson R.M., Eremin S.A., Kutyreva M.P., Ulakhovich N.A., Budnikov H.K.* Nanoscale materials in the composition of biosensors for the determination of amitriptyline // *Ind. Lab. Diagn. Mater.* 2021. V. 87. № 9. P. 20.) <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-9-20-29>
 23. *Медянцева Э.П., Газизуллина Э.Р., Брусницын Д.В., Зиганшин М.А., Елистратова Ю.Г., Мустафина А.Р., Брылев К.А., Будников Г.К.* Нанокластеры рения как модификаторы иммуносенсоров при определении трициклических антидепрессантов // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 12. С. 1123. (*Medyantseva E.P., Gazizullina E.R., Brusnitsyn D.V., Ziganshin M.A., Elistratova Yu.G., Mustafina A.R., Brylev K.A., Budnikov H.C.* Rhenium nanoclusters as modifiers of immunosensors in the determination of tricyclic antidepressants // *J. Anal. Chem.* 2021. V. 76. № 4. P. 1455.) <https://doi.org/10.31857/S0044450221120070>
 24. *Медянцева Э.П., Газизуллина Э.Р., Брусницын Д.В., Федоренко С.В., Мустафина А.Р., Еремин С.А.* Определение амитриптилина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 9. С. 828. (*Medyantseva E.P., Gazizullina E.R., Brusnitsyn D.V., Fedorenko S.V., Mustafina A.R., Eremin S.A.* Determination of amitriptyline by fluorescence polarization immuno-

- assay // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 9. P. 1147.)
<https://doi.org/10.31857/S0044450222070088>
25. *Mikhailov M.A., Brylev K.A., Abramov P.A., Sokolov M.N., Sakuda E., Kitamura N., et al.* Synthetic tuning of redox, spectroscopic, and photophysical properties of $\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}^{4+}$ core cluster complexes by terminal carboxylate ligands // *Inorg. Chem.* 2016. V. 55. № 17. P. 8437.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01042>
 26. *Медянцева Э.П., Газизуллина Э.Р., Брусницын Д.В., Добрынин А.Б., Брылев К.А., Мустафина А.Р., Елистратова Ю.Г.* Амперометрические иммуносенсоры на основе углеродных наноматериалов и кластеров рения для определения трициклических антидепрессантов в последовательной инъекционной системе // *Аналитика и контроль.* 2022. Т. 26. № 4. С. 255.
<https://doi.org/10.15826/analitika.2022.26.4.002>
 27. *Elistratova J.G., Kholin K.V., Nizameev I.R., Khazjeva A.R., Gubaidullin A.T., Voloshina A.D., et al.* Anticancer potential of hexamolybdenum clusters $[\{\text{Mo}_6\text{I}_8\}(\text{L})_6]^{2-}$ ($\text{L} = \text{CF}_3\text{COO}^-$ and $\text{C}_6\text{F}_5\text{COO}^-$) incorporated into different nanoparticulate forms // *J. Mol. Liq.* 2021. V. 343. Article 117601.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117601>
 28. *Kirakci K., Kubát P., Dusek M., Fejfarová K., Šícha V., Mosinger J., Lang K.* A highly luminescent Hexanuclear molybdenum cluster — A promising candidate toward photoactive materials // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012. V. 2012. № 19. P. 3107.
<https://doi.org/10.1002/ejic.201200402>
 29. *Deswal R., Narwal V., Kumar P., Verma V., Dang A.S., Pundir C.S.* An improved amperometric sarcosine biosensor based on graphene nanoribbon/chitosan nanocomposite for detection of prostate cancer // *Sens. Int.* 2022. V. 3. Article 100174.
<https://doi.org/10.1016/j.sintl.2022.100174>
 30. *El-Shafai N.M., Shukry M., Sharshir S.W., Ramadan M.S., Alhadhrami A., El-Mehasse I.* Advanced applications of the nanohybrid membrane of chitosan/nickel oxide for photocatalytic, electro-biosensor, energy storage, and supercapacitors // *J. Energy Storage.* 2022. V. 50. Article 104626.
<https://doi.org/10.1016/j.est.2022.104626>

ORIGINAL ARTICLES

POSSIBILITIES OF A SUPRAMOLECULAR SYSTEM BASED ON HEXAMOLYBDENUM CLUSTER COMPLEXES IN THE DETERMINATION OF AMITRIPTYLINE BY AMPEROMETRIC IMMUNOSENSORS IN HUMAN URINE

D.V. Brusnitsyn^{a,*}, E.P. Medyantseva^a, A.N. Ramazanova^a, A.V. Prytkova^a, E.R. Karimova^b, Y.G. Elistratova^c, A.R. Mustafina^c, M.N. Sokolov^d, S.A. Eremin^e, L.I. Mukhametova^e

^a*Kazan (Volga Region) Federal University, A.M. Butlerov Chemical Institute, 420008 Kazan, Russia*

^b*Interregional Clinical and Diagnostic Center, 420101 Kazan, Russia*

^c*A.E. Arbutov Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center "Kazan Scientific Center" of the Russian Academy of Sciences, 420088 Kazan, Russia*

^d*A.V. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, 630090 Russia*

^e*M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, 119991 Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: brussman@mail.ru

Received September 26, 2023. Revised October 24, 2023. Accepted October 24, 2023

Abstract. A method for the determination of amitriptyline as a representative of tricyclic antidepressants by immunosensors using supramolecular systems based on hexamolybdenum cluster complexes in human urine was developed. These complexes are electrochemically active and give a stable analytical signal, which was utilized in the development of amperometric immunosensors. Luminescence and dynamic light scattering methods were applied to prove the formation of a supramolecular system of self-organized hexamolybdenum nanoparticles and chitosan molecules. A composite material based on hexamolybdenum cluster complexes combined with reduced graphene oxide was developed. The working range of amitriptyline concentrations when determined by amperometric immunosensor was 1×10^{-9} – 1×10^{-4} M, the lower limit of detectable contents lies at the level of 5×10^{-10} M, the content of amitriptyline in urine samples — at the level of $(n - 7) \times 10^{-8}$ M. Comparison of the results of the analysis by amperometric immunosensor and polarization fluorescence immunoassay showed the absence of significant systematic errors. The ability to determine amitriptyline in biological fluids makes it possible to select the optimal therapeutic dose of the drug, i.e., to develop approaches to the creation of personalized medicine.

Keywords: molybdenum cluster complexes, immunosensor, antibodies, tricyclic antidepressants.