

ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ГЕКСАЦИАНОРУТЕНАТОМ (III) КОБАЛЬТА (II)

**Л.Г. Шайдарова, И.А. Челнокова, Г.Ф. Махмутова,
А.В. Гедмина, М.А. Дегтева, Г.К. Будников**

*Казанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Россия
LarisaShaidarova@mail.ru*

Поступила в редакцию 06 февраля 2013 г.,
после исправления – 25 февраля 2013 г.

Сопоставлено электрохимическое поведение инсулина на стеклоуглеродном электроде, модифицированном углеродными нанотрубками с иммобилизованной пленкой гексацианорутената (III) кобальта (II) или гексацианокобальтата (III) рутения (III). Определены условия регистрации максимального каталитического тока в стационарном режиме и в условиях проточно-инжекционного анализа. Предложена методика проточно-инжекционного определения инсулина на композитном электроде на основе углеродных нанотрубок и гексацианорутената (III) кобальта (II). Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации инсулина наблюдается в интервале от 2.5 мкмоль до 5 ммоль.

Ключевые слова: химически модифицированный электрод, гексацианометаллаты, углеродные нанотрубки, проточно-инжекционный анализ, инсулин.

Шайдарова Лариса Геннадиевна – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета.

Область научных интересов – электроаналитическая химия.

Количество публикаций – 95.

Челнокова Ирина Александровна – к.х.н., научный сотрудник кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета.

Область научных интересов – электроаналитическая химия.

Количество публикаций – 28.

Махмутова Гузель Фаргатовна – аспирант кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета.

Область научных интересов – электроаналитическая химия.

Количество публикаций – 3.

Гедмина Анна Владимировна – к.х.н., научный сотрудник кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета.

Область научных интересов – электроаналитическая химия.

Количество публикаций – 33.

Дегтева Марина Андреевна – студент 5 курса Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета.

Область научных интересов – электроаналитическая химия.

Количество публикаций – 2.

Будников Герман Константинович – д.х.н., профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета.

Область научных интересов – электроаналитическая химия.

Количество публикаций – 600.

В последние десятилетия особое внимание уделяется разработке экспрессных и высокочувствительных способов определения инсулина в биологических жидкостях и фармацевтических препаратах. Инсулин – полипептидный гормон, вырабатываемый β -клетками панкреатических островков поджелудочной железы, участвующий в регуляции метаболизма углеводов и поддержании постоянного уровня глюкозы в крови [1]. Определение инсулина в крови проводят для диагностики различных форм сахарного диабета, гипогликемических состояний, ожирения, для выбора лекарственного препарата и подбора оптимальной терапии при лечении больных.

Для определения инсулина чаще всего используют радиоиммунологический и иммуноферментный методы [2]. Но эти методы сложны в исполнении, являются дорогостоящими и продолжительны по времени. Известен также вольтамперометрический метод определения инсулина на ртутном каплюющем электроде [3]. Недостатком этого метода является токсичность ртути и низкая чувствительность. Именно поэтому представляют интерес электрохимические методы анализа, основанные на использовании химически модифицированных электродов (ХМЭ) с электрокаталитическими свойствами [4, 5]. Данные методы отличаются высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, точностью и экспрессностью определений. Электрокаталитические свойства ХМЭ достигаются за счет иммобилизации в объеме или на поверхности электродов редокс-медиаторов, которые способствуют переносу электрона между электродом и субстратом, понижая потенциал окислительно-восстановительной реакции и существенно ускоряя ее, что, в результате, приводит к повышению чувствительности, а иногда и селективности определения органических соединений [5, 6].

В качестве модификаторов широко используют гексацианометаллаты (ГЦМ), которые хорошо зарекомендовали себя в качестве катализаторов многих электрохимических реакций [7]. В последнее время привлекают внимание углеродные наноматериалы, например, углеродные нанотрубки (УНТ), которые обладают высокой удельной поверхностью и электропроводностью [8]. Часто УНТ используют в качестве подложки для различных модификаторов [9]. Такие композиты имеют высокую каталитическую активность, а ХМЭ на их основе – высокую стабильность электрохимического отклика [9].

ХМЭ с каталитическим откликом находят применение при разработке различных сенсоров или амперометрических детекторов в проточных методах анализа, например, в условиях проточно-инжекционного анализа (ПИА). Сочетание гетерогенного электрокатализа с техникой ПИА позволяет значительно расширить аналитические возможности ХМЭ [7].

Поэтому цель работы – разработка способа проточно-инжекционного определения инсулина на ХМЭ на основе многослойных УНТ с иммобилизованными неорганическими пленками из ГЦМ, в качестве которых использовали гексацианорутенат (III) кобальта (II) (ГЦР Со) или гексацианокобальтат (III) рутения (III) (ГЦК Ru).

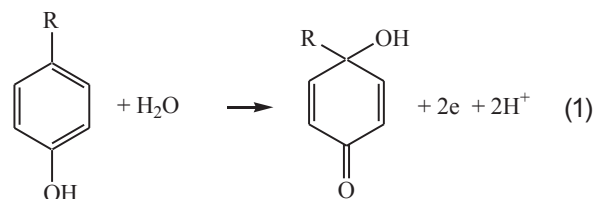
Циклические и линейные вольтамперограммы регистрировали с помощью вольтамперометрического анализатора «Экотест-ВА» (ООО «ЭКОНИК-ЭКСПЕРТ», Россия). При регистрации вольтамперограмм применяли скорость наложения потенциала (v), равную 20 мВ/с.

В работе использовали трехэлектродную ячейку. В качестве рабочего электрода применяли электрод из СУ с видимой поверхностью 0.10 см² и ХМЭ на его основе. Электродом сравнения служил хлоридсеребряный, вспомогательным – платиновая проволока. ХМЭ на основе УНТ получали путем нанесения суспензии многослойных УНТ с диаметром 110-170 нм и длиной 5-9 мкм фирмы Aldrich в 0.5 % водном растворе природного полимера хитозана на поверхность СУ с последующим испарением растворителя на воздухе. Неорганические полимерные пленки ГЦР Со и ГЦК Ru на поверхности СУ получали в результате потенциодинамического электролиза в растворах, содержащих $1 \cdot 10^{-3}$ М гексацианокобальтат калия ($K_3[Co(CN)_6]$) и хлорид рутения ($RuCl_3$) или гексацианорутенат калия ($K_3[Ru(CN)_6]$) и хлорид кобальта фирмы Aldrich. Композитные электроды получали в две стадии: сначала на поверхность СУ наносили УНТ, потом осаждали ГЦМ.

Растворы инсулина готовили путем растворения точно взятых объемов стандартного раствора ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ М) в буферных растворах с pH = 6.86.

Измерения в условиях ПИА проводили на установке, включающей перистальтический насос, инжектор, проточную электрохимическую ячейку и регистрирующее устройство [10]. Инъекцию осуществляли микрошприцем через уплотнительную мембрану.

В нейтральной среде инсулин окисляется на немодифицированном СУ в далекой области потенциалов при $E > 0.80$ В и с плохой воспроизводимостью вольтамперных характеристик (рис. 1, а; крив. 1-3). При этом в молекуле инсулина окисляются фенольные группы в тирозиновом фрагменте [11]:



Линейная зависимость тока пика окисления инсулина от его концентрации наблюдается в узком интервале концентраций: от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ М. Использование ХМЭ с электрокаталитическими

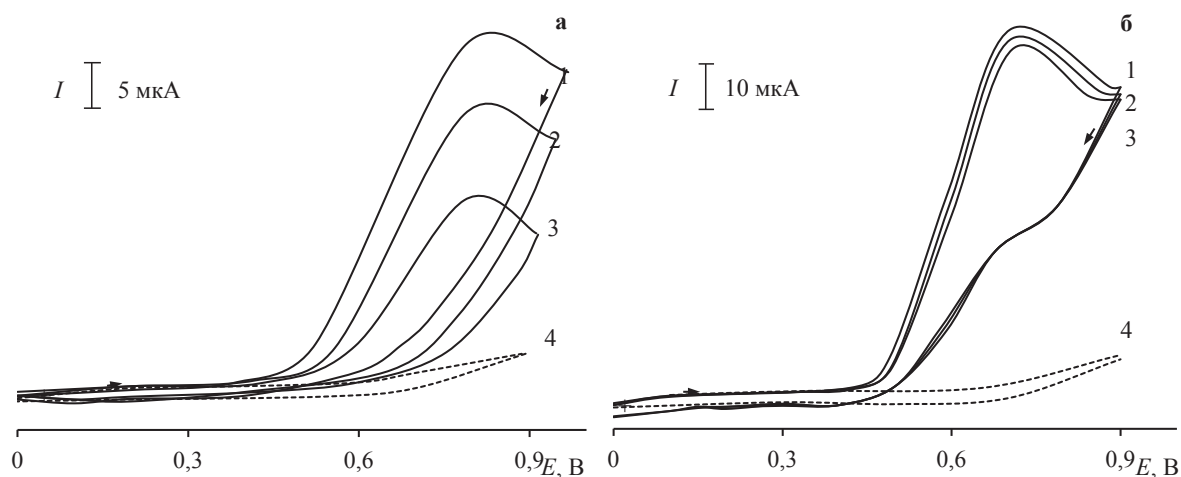


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, полученные на немодифицированном (а) и модифицированном УНТ (б) электроде из СУ после многократного воспроизведения в присутствии (1-3) и в отсутствие (4) инсулина ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М) на фоне фосфатного буферного раствора с рН = 6.86

свойствами позволяет снизить перенапряжение и повысить чувствительность определения этого соединения.

Сопоставлено электрохимическое поведение инсулина на СУ, покрытом УНТ, неорганической пленкой ГЦР Со или ГЦК Ru или композитами на их основе.

На СУ, модифицированном УНТ, перенапряжение окисления инсулина уменьшается. Каталитическое действие УНТ проявляется в уменьшении потенциала пика окисления инсулина на 100 мВ и в увеличении тока в этом пике. Кроме того, для этого электрода характерна лучшая воспроизводимость отклика (рис. 1, б; крив. 1-3).

На циклической вольтамперограмме, полученной на СУ, покрытом пленкой ГЦК Ru (**ГЦК Ru-СУ**) на фоне фосфатного буферного раствора с рН = 6.86, наблюдаются три максимума тока (рис. 2, а). Первый пик, вероятно, связан с окислением внутрисферного кобальта и соответствует пере-

ходу $\text{Co(II)CN}_6^{4-} \rightarrow \text{Co(III)CN}_6^{3-}$, два следующих пика связаны с окислением оксо-частиц рутения $\text{Ru(III)} \rightarrow \text{Ru(IV)}$ и $\text{Ru(IV)} \rightarrow \text{Ru(VI)}$ [12].

На анодной ветви вольтамперограммы, полученной на ХМЭ на основе СУ с пленкой ГЦР Со (**ГЦР Со-СУ**), в рассматриваемой области потенциалов, наблюдаются три максимума (рис. 2, б). Наблюдаемые электрохимические сигналы, вероятно, связаны с переходами $\text{Ru(II)} \rightarrow \text{Ru(III)}$, $\text{Ru(III)} \rightarrow \text{Ru(IV)}$ и $\text{Ru(IV)} \rightarrow \text{Ru(VI)}$ [12].

При получении пленок ГЦК Ru и ГЦР Со на электроде, модифицированном УНТ, на вольтамперных кривых наблюдается увеличение анодно-катодных пиков окисления / восстановления модификатора (рис. 2), что связано с более развитой поверхностью УНТ по сравнению с СУ при одинаковых геометрических размерах электродов.

По форме вольтамперограммы окисления инсулина на электродах ГЦК Ru-СУ и ГЦР Со-СУ

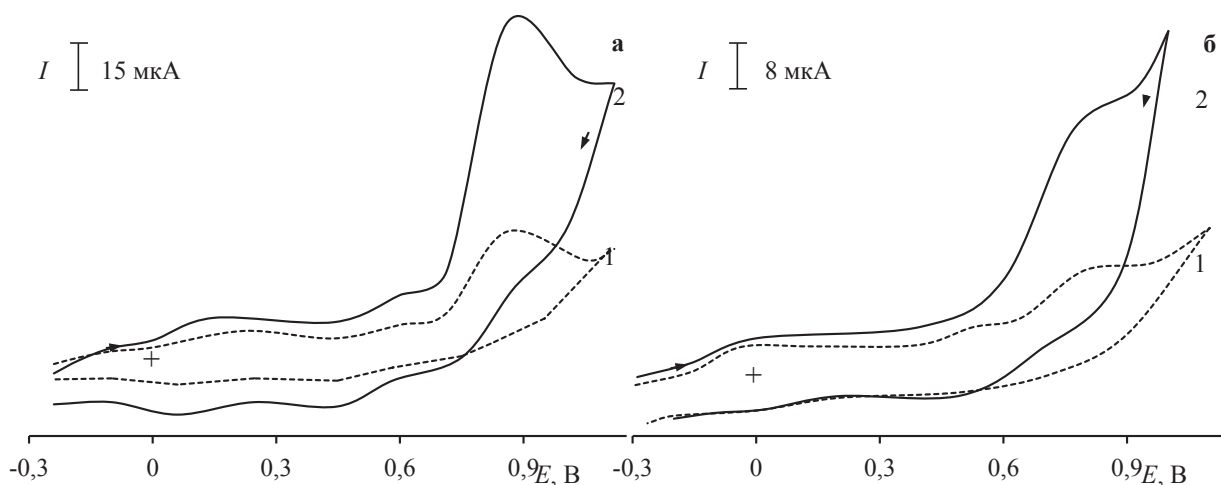


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы, полученные на немодифицированном (1) и модифицированном УНТ (2) стеклогуглеродном электроде с электроосажденными пленками ГЦК Ru (а) и ГЦР Со (б) на фоне фосфатного буферного раствора с рН = 6.86

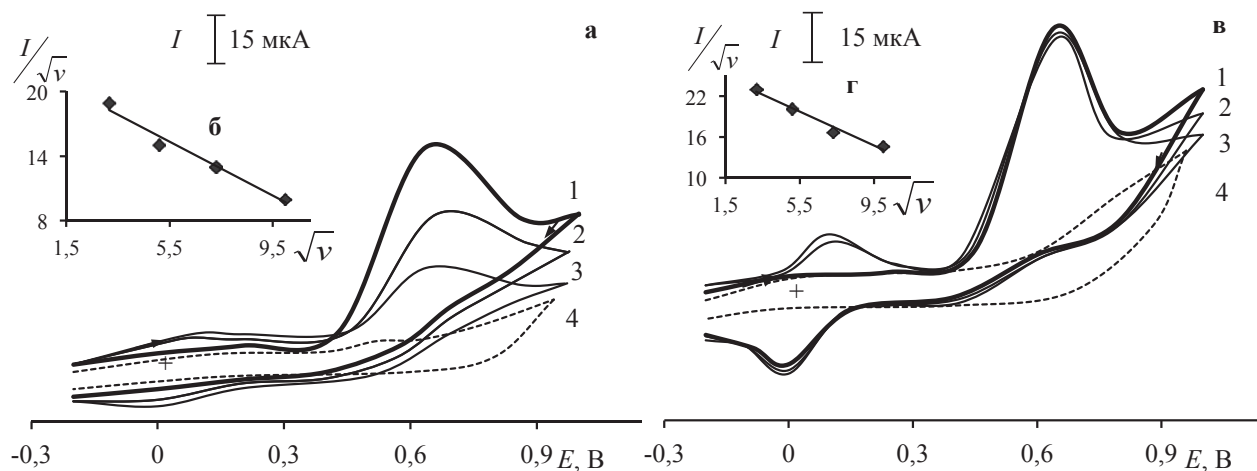


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы, полученные на электродах ГЦР Co-CU (а) и ГЦР Co-УНТ-CU (в) после многократного воспроизведения в присутствии (1-3) и в отсутствие (4) инсулина ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М) на фоне фосфатного буферного раствора с $pH = 6.86$; зависимости отношения $I/\sqrt{v}$ от $\sqrt{v}$ (б, г)

похожи. В качестве примера на рис. 3, а приведена вольтамперограмма окисления инсулина на электроде ГЦР Co-CU. На анодной ветви наблюдается одна ступень, имеющая форму пика (рис. 3, а; крив. 1), высота которой зависит от концентрации гормона. При повторной регистрации вольтамперограммы появляется дополнительный максимум тока при $E_p \sim 0.10$ В, который, вероятно, связан с окислением адсорбированных продуктов электрохимического окисления инсулина (рис. 3, а; крив. 2, 3).

Изучена зависимость величины тока (I) при $E_p = 0.70$ В от скорости наложения потенциала (v). Установлено, что зависимость $I/\sqrt{v}$ от $\sqrt{v}$ имеет отрицательный наклон (рис. 3, б), что свидетельствует об электродном процессе, осложненном химической реакцией.

Использование ХМЭ ведет к уменьшению перенапряжения окисления инсулина и увеличению тока его окисления по сравнению с током окисления модификатора ($I_{\text{МОД}}$) и субстрата (I_s) (табл. 1). Разность потенциалов окисления субстрата на ХМЭ ($E_{\text{КАТ}}$) и СУ (E_s) ($E_{\text{КАТ}} - E_s$) составляет 100 мВ (табл. 1). Для электрода ГЦР Co-CU наблюдается большее значение каталитического эффекта, рассчитанного как отношение каталитического тока окисления субстрата ($I_{\text{КАТ}}$) и тока окисления модификатора ($I_{\text{КАТ}}/I_{\text{МОД}}$), по сравнению с электродом ГЦК Ru-CU (табл. 1). Таким образом, при окислении инсулина

Таблица 1

Вольтамперные характеристики электроокисления инсулина ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М) на ХМЭ, фон – фосфатный буферный раствор с $pH = 6.86$, при $E_s = 0.80$ В, $I_s = 3.6$ мкА

Модификатор	$E_{\text{КАТ}}$, В	$I_{\text{КАТ}}$, мкА	$I_{\text{КАТ}}/I_{\text{МОД}}$
УНТ	0.70	14.8	–
ГЦР Со	0.70	60.0	27.3
ГЦР Со-УНТ	0.65	90.0	30.0
ГЦК Ru	0.70	51.8	14.8
ГЦК Ru-УНТ	0.65	98	24.5

на электродах ГЦК Ru-CU и ГЦР Co-CU наблюдается катализ по току и по потенциалу. Облегчение окисления этого соединения происходит за счет участия в электрохимической реакции медиаторных частиц, в роли которых, вероятно, выступают электрогенерированные оксо-формы металлов.

При переходе на композитные электроды на основе УНТ и ГЦМ наблюдается рост каталитического тока (рис. 3, в) и каталитического эффекта (табл. 1). Возможно в этом случае проявляется суммарный каталитический эффект УНТ и ГЦМ. Как видно из табл. 1, наибольшее значение каталитического эффекта наблюдается на СУ, модифицированном УНТ с иммобилизованной пленкой из ГЦР Со (ГЦР Со-УНТ-CU).

Следует отметить отсутствие воспроизводимости вольтамперных характеристик при окислении инсулина на электродах ГЦК Ru-CU и ГЦР Co-CU при повторной регистрации вольтамперограмм, что ухудшает метрологические характеристики электрода (рис. 3, а; крив. 1-3). В отличие от этих электродов на ХМЭ на основе УНТ с ГЦМ регистрируются воспроизводимые по форме вольтамперограммы при многократном циклировании потенциала (рис. 3, в; крив. 1-3).

Итак, среди рассматриваемых ХМЭ лучшими каталитическими свойствами при окислении инсулина в нейтральной среде обладает композит на основе УНТ и ГЦР Со, поэтому этот ХМЭ был использован для разработки способа определения инсулина в потоке. Изучена возможность амперометрического детектирования инсулина на электроде ГЦР Со-УНТ-CU в условиях ПИА. Измерения проводили в потенциостатическом режиме. Как видно из рис. 4, а, максимальный аналитический сигнал на фоне фосфатного буферного раствора с $pH = 6.86$ регистрируется при $E = 0.80$ В. При определении гидродинамических параметров определения инсулина установлено, что максимальная величина ПИА-сигнала наблюдается при объеме инъектируемой пробы (V), равном 0.50 мл (рис. 4, б) и скорости потока (u), равной 16.7 мл/мин (рис. 4, в).

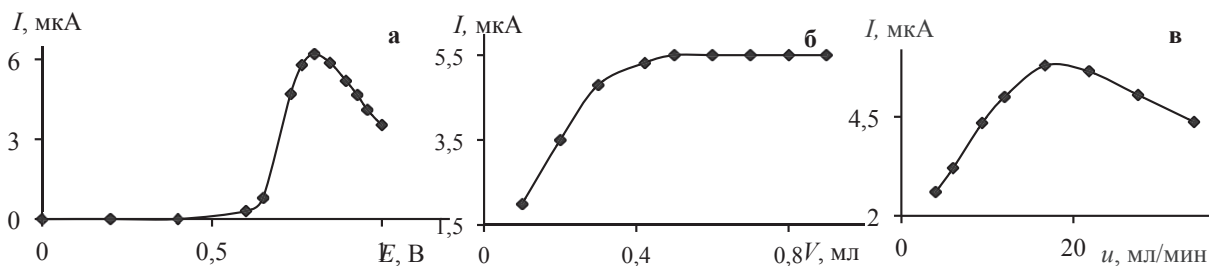


Рис. 4. Зависимость тока окисления инсулина ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М) на электроде, модифицированном композитом ГЦР Со-УНТ, на фоне фосфатного буферного раствора с $pH = 6.86$ от налагаемого потенциала (а), объема пробы (б) и скорости потока (в)

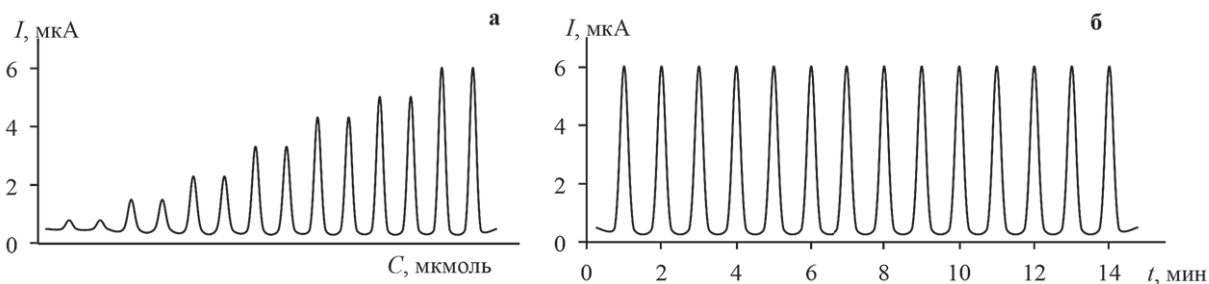


Рис. 5. Зависимость тока окисления инсулина ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ М) на электроде, модифицированном композитом ГЦР Со-УНТ, на фоне фосфатного буферного раствора с $pH = 6.86$ от концентрации аналита (а) и от количества воспроизведений (б)

Исследовано изменение величины дисперсии от скорости потока. Коэффициент дисперсии определяли по отношению концентрации исходного раствора к величине концентрации, рассчитанной по величине аналитического сигнала в условиях ПИА. Максимальная найденная величина, равная 3.0, при скорости потока $u = 16.7$ мл/мин, свидетельствует о том, что при выбранных условиях реализуется система с относительно малой дисперсией, то есть физическое разбавление пробы в потоке не значительно.

Таким образом, были найдены условия проведения ПИА: $E = 0.80$ В, $V = 0.50$ мл, $u = 16.7$ мл/мин. В этих условиях удается достигнуть производительности ПИА до 100 проб/ч. На основании полученных результатов предложена методика определения инсулина в ПИА-условиях по электрокаталитическому отклику электрода ГЦР Со-УНТ-СУ.

Методика проточно-инжекционного определения инсулина на электроде ГЦР Со-УНТ-СУ. По силиконовым трубкам с внутренним диаметром 2 мм, герметично соединенным с проточной электрохимической ячейкой, содержащей ХМЭ, вспомогательный и хлоридсеребряный электроды, пропускали поток носителя, в качестве которого

использовали фосфатный буферный раствор с $pH = 6.86$, со скоростью $u = 16.7$ мл·мин⁻¹. Регистрацию ПИА-сигнала проводили при $E = 0.80$ В после инъецирования пробы объемом $V = 0.50$ мл. Линейная зависимость ПИА-сигнала от концентрации инсулина наблюдается в интервале от 2.5 мкмоль до 5 пмоль (рис. 5а). Уравнение регрессии имеет вид:

$$\lg I = (4.1 \pm 0.2) + (55 \pm 3) \lg C; \quad (I, \text{мкА}; C, \text{моль}); R = 0.9979. \quad (2)$$

При оценке метрологических характеристик методики проводили сопоставление сходимости результатов ПИА-определений. Установлено, что при длительном использовании ХМЭ в проточной ячейке без обновления поверхности электрода воспроизводимость ПИА-сигнала практически не изменяется (рис. 5, б). Рассчитанные значения S_r для тока окисления инсулина не превышают 2 % (при $n = 20$, $C = 1 \cdot 10^{-4}$ М).

Разработанный способ определения инсулина на ХМЭ использовали при анализе некоторых фармпрепаратов. Содержание инсулина находили по градуировочным графикам, построенным по методу добавок. Результаты определения инсулина в фармпрепаратах представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты вольтамперометрического определения инсулина в фармпрепаратах на электроде ГЦР Со-УНТ-СУ; $n = 6$, $P = 0.95$, $t_{\text{табл}} = 2.57$

Фармпрепарат	Регламентированное содержание, мг/мл	Найдено, мкг/мл	Показатель правильности, %	S_r	$t_{\text{расч}}$
Хумулин Регуляр	4.6	4.5 ± 0.2	97.8	0.04	0.68
Хумалог	4.6	4.6 ± 0.2	100.0	0.05	0.53
Хоморап 40	1.82	1.85 ± 0.07	101.6	0.04	0.99
Хумулин НПХ	4.6	4.6 ± 0.1	100.0	0.03	0.36

Получены высокие метрологические характеристики проточно-инжекционного определения инсулина в фармпрепаратах. Это связано с тем, что в потоке жидкости удается избежать адсорбции на поверхности ХМЭ матричных компонентов и продуктов электродных реакций. Статистическая оценка результатов с использованием величины t -критерия свидетельствует об отсутствии значимой систематической погрешности: $t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$ (табл. 2).

Таким образом, разработаны способы изготовления ХМЭ на основе УНТ с электроосажденными неорганическими пленками из ГЦК Ru и ГЦР Со. Большой каталитический эффект получен при электроокислении инсулина на электроде, модифицированном композитом на основе УНТ и ГЦР Со. Каталитический отклик этого ХМЭ отличается высокой стабильностью и воспроизводимостью. Установлена возможность использования такого ХМЭ в качестве амперометрического детектора в условиях ПИА с пределом обнаружения на уровне пикомоль. Разработанная методика проточно-инжекционного определения инсулина на ХМЭ на основе УНТ и ГЦР Со отличается простотой, экспрессностью и высокой чувствительностью. Методика апробирована при анализе фармпрепаратов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-03-97031-р_поволжье_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000. 469 с.
2. Kaur A., Vema N. Electrochemical biosensor for monitoring insulin in normal individuals and diabetic mellitus patients // Euro. J. Exp. Biol. 2012. V. 2, № 2. P. 389-395.

3. Stancovich M.T., Bard A.J. The electrochemistry of proteins and related substances part II. Insulin // J. Electroanal. Chem. 1997. V.85, № . P.173-183.
4. Будников Г. К., Майстренко В. Н., Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. 592 с.
5. Будников Г. К., Евтюгин Г. А., Майстренко В. Н. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 416 с.
6. Шайдарова Л.Г., Будников Г.К. Химически модифицированные электроды на основе благородных металлов, полимерных пленок или их композитов в органической вольтамперометрии // Журн. аналит. химии. 2008. Т.63, № 10. С. 1014-1037.
7. Шайдарова Л. Г., Будников Г. К. Амперометрические сенсоры с каталитическими свойствами в органической вольтамперометрии // Проблемы аналитической химии. Т.14: Химические сенсоры. / Под ред. Власова Ю.Г. М.: Наука. 2011. С. 203-284.
8. Vairavapandian D., Vichchulada P., Lay M. D. Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 626, № 2. P. 119-129.
9. Agui L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review // Anal. Chem. 2008. V. 622, №. 1-2. P. 11-47.
10. Электрокаталитическое определение оксалат-ионов на химически модифицированных электродах / Л.Г. Шайдарова и [др.] // Журн. приклад. химии. 2001. Т. 74, вып. 5. С. 728-733.
11. Zhang M., Mullens C., Gorski W. Insulin oxidation and determination at carbon electrodes // Anal. Chem. 2005. V. 77, № 19. P. 6396-6401.
12. Electrochemistry of ferric ruthenocyanide (Ruthenium Purple) and its electrocatalysis for proton reduction / T. Abe et [al.] // J. Electroanal. Chem. 2001. V. 510. P. 35-42.

FLOW-INJECTION DETERMINATION OF INSULIN AT THE ELECTRODE MODIFIED BY CARBON NANOTUBES WITH IMMOBILIZED COBALT (II) HEXACYANORUTHENATE (III)

L.G. Shaidarova, I.A. Chelnokova, G.F. Makhmutova, A.V. Gedmina, M.A. Degteva, H.C. Budnikov

*Kazan federal university, Chemical institute of A.M. Butlerova
420008, Kazan, Kremlevskaya St., 18, Russia.*

The electrochemical behavior of insulin on glassy carbon electrode modified by carbon nanotubes with immobilized film of cobalt (II) hexacyanoruthenate (III) or ruthenium (III) hexacyanocobaltate (III) is compared. The conditions for registration of the maximum catalytic current in steady state and flow-injection analysis (FIA) are defined. The method of flow-injection determination of insulin at the composite electrode based on carbon nanotubes and cobalt (II) hexacyanoruthenate (III) is suggested. Linear dependence of the FIA-signal from insulin concentration is observed in the range from 2.5 μmol to 5 μmol .

Key words: chemically modified electrode, hexacyanometallates, carbon nanotubes, flow-injection analysis, insulin.