

УДК 543.253:541.128.13

## ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ ПЛЕНКОЙ ГЕТЕРОВАЛЕНТНОГО ОКСИДА – ЦИАНИДА РУТЕНИЯ

Л.Г. Шайдарова, Л.Н. Давлетишина, Д.В. Егорова, Г.К. Будников

### Аннотация

Исследовано электрохимическое поведение инсулина на графитовом электроде, модифицированном неорганической пленкой из гексацианорутената (II) рутения (III). Установлена электрокаталитическая активность гетеровалентного оксида – цианида рутения при окислении пептида. Найдены вольтамперные и гидродинамические параметры регистрации максимального каталитического тока в условиях проточно-инжекционного анализа (ПИА). Предложен способ амперометрического детектирования инсулина. Предел обнаружения инсулина на модифицированном электроде в условиях ПИА составляет 0.02·нмоль.

### Введение

В последние годы наблюдается повышенный интерес к поиску новых методов определения инсулина. Эти исследования имеют большое значение для биологии, медицины и фармакинетики. Обычно для определения инсулина используют иммуно-, радиоиммуноанализ и спектрофотометрию [1]. Эти методы имеют ограничения, в частности, при динамических измерениях на уровне одной клетки. Известны электрохимические методы определения инсулина, основанные на его восстановлении на ртутном электроде [2] или на окислении на химически модифицированных электродах (ХМЭ) [3]. Для определения биологически активных веществ (БАВ) в режиме “*in vivo*” используют амперометрические сенсоры. Для создания сенсоров часто применяют электроды с иммобилизованными редокс-медиаторами [3–8], в качестве которых используют различные металлы, их оксиды или комплексы, в частности, гексацианометаллаты, из которых наиболее широкое применение получили гексацианоферраты и гексацианорутенаты. Основное отличие в электрохимических характеристиках гексацианорутената (II) рутения (III), электроосажденного на поверхности графитового электрода, по сравнению с другими гексацианометаллатами состоит в том, что рутений может подвергаться окислению до более высоких степеней окисления, чем 3+. Полагают, что стабилизация рутения в высоких степенях окисления происходит за счет образования кислородных мостиков между атомами металлов [9, 10]. Поэтому частицы рутения в высоких степенях окисления обозначают как оксо-частицы, например, -Ru(VI)O или -Ru(IV)O, для полученного соединения на поверхности электрода принято обозначение



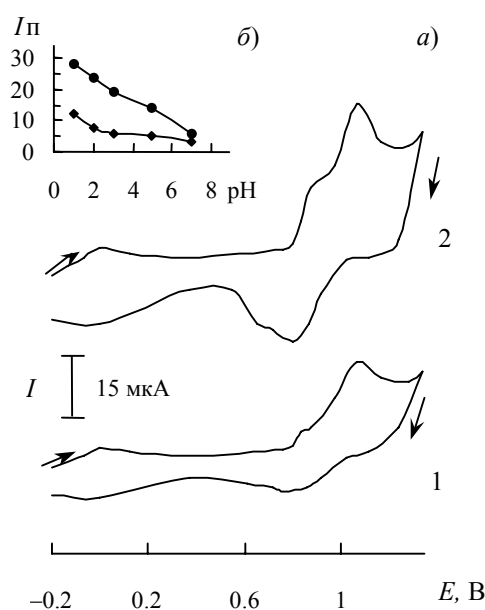


Рис. 1. *a*) Вольтамперограммы, полученные на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN в растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с pH=2 (1) и 4 (2); *б*) зависимость величины тока пика ( $I_p$ ) окисления медиатора при  $E_p = 0.80$  В (1) и 1.05 В (2) от pH раствора

рутения, связанных с оксо- и цианогруппами, до более высоких степеней окисления [15–17]. Наблюдаемые ступени окисления можно отнести к следующим электрохимическим реакциям:



Полученные пленки RuO-RuCN отличаются высокой химической и электрохимической устойчивостью, о чем свидетельствует хорошая воспроизводимость вольтамперограмм, полученных при циклическом изменении потенциала на фоне 0.01 М раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в течение нескольких недель ( $S_r < 8\%$ ). Однако устойчивость пленок RuO-RuCN проявляется только в кислой среде. Увеличение pH приводило к ухудшению формы пиков и уменьшению токов анодных и катодных пиков (рис. 2, *a*, кривая 1). Как видно из рис. 1, *б*, изменение pH от 1 до 7 приводит к резкому уменьшению величины тока пиков ( $I_p$ ) при  $E_p = 0.80$  (кривая 1) и 1.05 В (кривая 2). В щелочных растворах пленка вообще не образуется, так как осадок ГЦМ разрушается в результате гидролиза металлокомплекса.

В условиях классической вольтамперометрии на графитовых электродах инсулин не окисляется. На вольтамперограмме, полученной при окислении инсулина на СУ на фоне 0.01 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , не зафиксировано никаких изменений по сравнению с фоновой кривой в области потенциалов от 0.0 до 1.3 В (рис. 2, *a*, кривая 1). В условиях вольтамперометрии на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN инсулин окисляется. Окисление пептида, как и цистина [18] происходит с разрывом -S-S-связи.

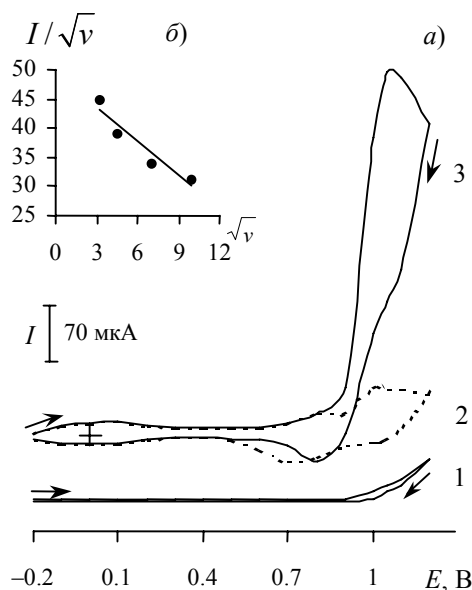
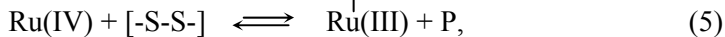
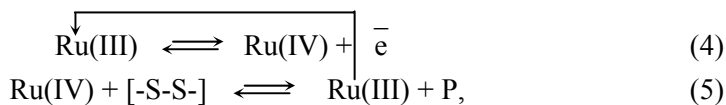


Рис. 2. *a*) Циклические вольтамперограммы, полученные на СУ (1) и ХМЭ с пленкой RuO-RuCN (2, 3) в отсутствие (2) и в присутствии (1, 3)  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л инсулина на фоне 0.01 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; *б*) зависимость  $I/\sqrt{v}$  от  $\sqrt{v}$  при окислении инсулина на ХМЭ

При окислении инсулина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN на вольтамперограмме регистрируется рост тока пика при  $E = 1.05$  В, то есть при потенциале окисления модификатора, характерного для редокс-пары Ru(IV)/(VI) (рис. 2, *a*, кривая 3). Ток пика линейно увеличивается с ростом концентрации субстрата и многократно превышает величину тока окисления модификатора (рис. 2 *a*, кривая 2). При изучении зависимости величины тока пика ( $I$ ) окисления инсулина от скорости наложения потенциала ( $v$ ) получен отрицательный наклон линейной зависимости  $I/\sqrt{v}$  от  $\sqrt{v}$  (рис. 2, *б*), что указывает на кинетический характер тока [19]. На основании полученных результатов можно предположить, что на этом ХМЭ происходит электрокаталитическое окисление инсулина по следующей схеме:



где  $[-\text{S-S-}]$  – дисульфидные мостики инсулина, P – продукты реакции.

Установлено, что использование ХМЭ на основе неорганической пленки RuO-RuCN позволяет уменьшить перенапряжение и увеличить величину тока окисления субстрата по сравнению с модификатором в 10 раз (табл. 1).

Другими словами, при окислении инсулина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN наблюдается катализ и по току, и по потенциалу.

На основании полученных результатов разработан вольтамперометрический способ определения инсулина по каталитическому отклику ХМЭ с пленкой RuO-RuCN. Предложена методика определения инсулина на этом ХМЭ.

Табл. 1

Вольтамперные характеристики окисления инсулина на СУ и на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN, ( $C = 1 \cdot 10^{-4}$ )

Субстрат	$E_{\text{МОД}}$ , В	$I_{\text{МОД}}$ , мкА	$E_{\text{КАТ}}$ , В	$I_{\text{КАТ}}$ , мкА	$I_{\text{КАТ}}/I_{\text{МОД}}$
Инсулин	0.80	18	0.80	18	–
	1.05	14.4	1.10	144	10.0

**Методика определения инсулина на электроде, модифицированном пленкой RuO-RuCN.** В мерную колбу на 10 мл вносили определенный объем раствора инсулина и доводили до метки 0.01 М раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Раствор переносили в электрохимическую ячейку, затем в раствор погружали ХМЭ, вспомогательный и хлоридсеребряный электроды и регистрировали циклическую вольтамперограмму в интервале от  $-0.2$  В до  $+1.2$  В, на которой измеряли величину тока пика электроокисления при  $E = 1.10$  В. Концентрацию аналита находили по градуировочному графику. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации инсулина наблюдается в интервале от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Интервалы линейной зависимости тока пика от концентрации аналита и уравнение регрессии для этой зависимости приведены в табл. 2.

Табл. 2

Аналитические характеристики вольтамперометрического определения инсулина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN на фоне 0.01 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Условия Определения	Диапазон концентраций	Уравнение регрессии $I = a + bc$		R
		$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	
Стационарная система, С, моль/л	$1 \cdot 10^{-7} \div 1 \cdot 10^{-4}$	$(1.02 \pm 0.06) \cdot 10^{-2}$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^6$	0.9974
Проточная система, С, мкмоль ( $V_{\text{ячейки}} = 0.5$ мл)	0.00005 – 0.5	$(1.86 \pm 0.09) \cdot 10^{-3}$	$8.8 \pm 0.3$	0.9961

Правильность методик оценена методом введено-найдено (табл. 3). Относительное стандартное отклонение ( $S_r$ ) не превышает 5%.

Химически модифицированный электрод на основе СУ с электроосажденной пленкой RuO-RuCN использовали для амперометрического детектирования инсулина в условиях ПИА.

Электродокаталитический отклик ХМЭ в ПИА регистрировали в потенциостатических условиях. Изучена зависимость величины тока от наложенного потенциала. Максимальный аналитический сигнал регистрируется при потенциале 1.10 В (рис. 3, кривая *a*).

Существенное влияние на интенсивность аналитического сигнала в условиях ПИА оказывает объем инжектируемой пробы ( $V$ ) и скорость потока ( $u$ ). Изучена зависимость величины каталитического тока от этих гидродинамических параметров при инъекции раствора инсулина с концентрацией, равной  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Величина ПИА-сигнала увеличивается до  $V = 0.5$  мл, а затем из-

Табл. 3

Результаты определения инсулина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN,  $n = 6$ ,  $P = 0.95$

Введено, мМ (мкмоль для ПИА)	Найдено, мМ (мкмоль для ПИА)	Показатель правильности, %	$S_r$
Стационарный режим			
0.100	$0.96 \pm 0.01$	96.0	0.01
0.500	$0.520 \pm 0.005$	104.0	0.01
1.00	$0.092 \pm 0.002$	92.0	0.02
ПИА			
0.0500	$0.0495 \pm 0.0005$	99.0	0.01
0.0300	$0.0306 \pm 0.0009$	102.0	0.03
0.0180	$0.0176 \pm 0.0007$	97.8	0.04

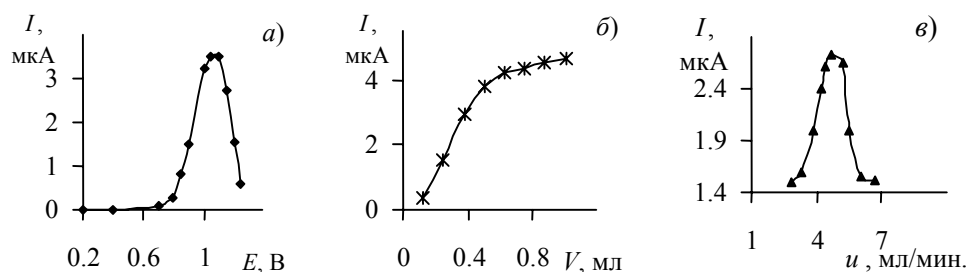


Рис. 3. Зависимость величины ПИА сигнала при окислении инсулина на ХМЭ от потенциала (а), объема инжектируемой пробы (б), скорости потока (в)

меняется незначительно (рис. 3, кривая б). Зависимость интенсивности сигнала от скорости потока проходит через максимум в области  $u = 5.0$  мл/мин. (рис. 3, кривая в). Итак, максимальная величина ПИА-сигнала наблюдается при следующих гидродинамических условиях:  $V = 0.5$  мл,  $u = 5.0$  мл/мин. В этих условиях регистрировали зависимость ПИА-сигнала от концентрации инсулина. Аналитические характеристики определения инсулина приведены в табл. 2. Зависимость ПИА-сигнала от концентрации аналита линейна в широком интервале. Предел обнаружения инсулина на ХМЭ составляет  $0.02$  нМоль (при отношении сигнал / шум, равном 3, [20]).

При непрерывном использовании ХМЭ электрокаталитический отклик имеет хорошую воспроизводимость (рис. 4). Рассчитанные значения  $S_r$  для каталитического тока не превышают  $0.05$  (табл. 3). При значительном уменьшении аналитического сигнала проводили обновление поверхности ХМЭ путем циклического изменения потенциала в растворе фонового электролита.

Таким образом, электрод, модифицированный неорганической пленкой RuO-RuCN, может быть использован для вольтамперометрического определения и амперометрического детектирования инсулина. Разработанные методики определения инсулина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN отличаются простотой и высокой чувствительностью. Определению мешают соединения, проявляющие

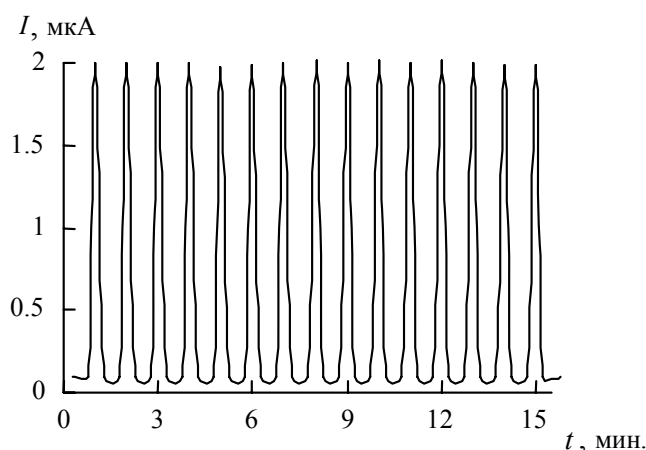


Рис. 4. Зависимость ПИА-сигнала при окислении инсулина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN от времени эксплуатации ХМЭ

каталитическую активность в рассматриваемой области потенциалов, а также участвующие в реакции гетерогенного электрокатализа на ХМЭ. Для селективного определения инсулина в сложных по составу объектах необходимо проводить предварительное разделение, которое, например, достигается в условиях жидкостной хроматографии, или использовать защитные пленки на поверхности ХМЭ, исключающие мешающее влияние матричных компонентов.

Предлагаемая методика может быть использована для определения инсулина в биологических жидкостях и фармпрепаратах.

### Summary

*L.G. Shaidarova, L.N. Davletshina, D.V. Egorova, H.C. Budnikov.* Voltammetric determination of insulin at electrode modified by mixed-valent ruthenium oxide – ruthenium cyanide film.

Electrochemical behaviour of insulin at the graphite electrode modified by inorganic film of hexacyanoruthenate (II) ruthenium (III) has been investigated. Electrocatalytic activity of mixed-valent ruthenium oxide – ruthenium cyanide for insulin oxidation was established. Voltammetric and hydrodynamic conditions of maximal catalytic current for flow injection analysis were found. The method of amperometric detection of insulin using the electrocatalytic response of the graphite electrode modified by hexacyanoruthenate (II) ruthenium (III) film is developed. The detection limit of insulin at modified electrode is estimated about 0.02·nmol.

### Литература

1. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т.Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М.: Мир, 1988. – 446 с.
2. *Stancovich M.T., Bard A.J.* The electrochemistry of proteins and related substances part II. Insulin // *J. Electroanal. Chem.* – 1997. – V. 85, No 1. – P. 173–183.
3. *Будников Г.К., Майстренко В.Н., Вяселев М.Р.* Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир, 2003. – 592 с.

4. Wang J., Musameh M. Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified electrodes // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – V. 511, No 1. – P. 33–36.
5. Pikulski M., Gorski W. Iridium-based electrocatalytic systems for the determination of insulin // *Anal. Chem.* 2000. – V. 72, No 13. – P. 2696–2702.
6. Cox J.A., Gray T.J. Flow injection amperometric detection of insulin based upon its oxidation at a modified electrode // *Anal. Chem.* – 1989. – V. 61, No 21. – P. 2462–2464.
7. Kennedy R.T., Huang L., Aspinwall C.A., Dush P. Amperometric monitoring of chemical secretions from individual pancreatic  $\beta$ -cells // *Anal. Chem.* – 1993. – V. 65, No 14. – P. 1882–1887.
8. Gorski W., Aspiwall C.A., Lakey J.R., Kennedy R.T. Ruthenium catalyst for amperometric determination of insulin at physiological pH // *J. Electroanal. Chem.* – 1997. – V. 425, No 1–2. – P. 191–199.
9. Kumar A.S., Zen J.-M. Organic redox probes for the key oxidation states in mixed valence ruthenium oxide/cyanometallate (ruthenium Prussian blue analogue) catalysts // *Electroanalysis.* – 2004. – V. 16, No 15. – P. 1211–1220.
10. Cataldi T.R.I., De Benedetto G.E. On the ability of ruthenium to stabilize polynuclear hexacyanometallate film electrodes // *J. Electroanal. Chem.* – 1998. – V. 458, No 1–2. – P. 149–154.
11. Cox J.A., Jaworski R.K. Electroanalysis with electrodes modified by inorganic films // *Electroanalysis.* – 1991. – V. 3, No 9. – P. 869–877.
12. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
13. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений. – Казань, 2001. – 376 с.
14. Шайдарова Л.Г., Зиганишина С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К. Электрокаталитическое окисление и проточно-инжекционное определение серосодержащих аминокислот на электроде, модифицированном пленкой из гексацианоферрата рутения // *Журн. аналит. химии.* – 2003. – Т. 58, № 12. – С. 1277–1283.
15. Cataldi T.R.I., Campa C., Centonze D. Electrocatalytic oxidation and amperometric detection of aliphatic and furanic aldehydes at a mixed-valent ruthenium oxide – ruthenium cyanide film on glassy carbon electrodes // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67, No 20. – P. 3740–3745.
16. Cox J.A., Alber K.S., Brockway C.A., Tess M.E., Gorski W. Solid phase extraction in conjunction with solution or solid state voltammetry as a strategy for the determination of neutral organic compounds // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67, No 5. – P. 993–998.
17. Kulesza P.J., Grzybowska B., Malic M. A., Chojak M., Miecznikowski K. Oxidation of methanol at an electrocatalytic film containing platinum and polynuclear oxocyanoruthenium microcenters dispersed within tungsten oxide matrix. // *J. Electroanal. Chem.* – 2001. – V. 512, No 1–2. – P. 110–118.
18. Органическая электрохимия: в 2 кн. / Под ред. М. Бейзера, Х. Лунда. – М.: Химия, 1988. – 469 с.
19. Будников Г.К. Принципы и применение вольтамперной и осциллографической полярографии. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1975. – 197 с.
20. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа: Методы обнаружения и оценки ошибок. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.

Поступила в редакцию  
13.05.06



**Шайдарова Лариса Геннадиевна** – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Larisa.Shaidarova@ksu.ru*

**Давлетшина Лилия Николаевна** – аспирантка кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Liliya.Tikhonova@ksu.ru*

**Егорова Дарья Владимировна** – студентка Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

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