

УДК 543.253:541.128.13

**ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ
И ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ГЕНТАМИЦИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, ПОКРЫТОМ ПЛЕНКОЙ
ГЕТЕРОВАЛЕНТНОГО ОКСИДА – ЦИАНИДА РУТЕНИЯ**

Л.Г. Шайдарова, Л.Н. Давлетишина, Г.К. Будников

Аннотация

Обнаружена электрокаталитическая активность электрода, покрытого пленкой гетеровалентного оксида – цианида рутения, при электроокислении гентамицина в кислой среде. Электрокаталитический эффект на химически модифицированном электроде (ХМЭ) по сравнению с немодифицированным электродом проявляется в уменьшении перенапряжения и увеличении тока окисления этого соединения. Модифицированный электрод использован для вольтамперометрического определения антибиотика как в стационарных, так и в проточных условиях. Линейная зависимость аналитического сигнала в условиях проточно-инжекционного анализа от концентрации гентамицина наблюдается в широком интервале концентраций: от 0.01 до 5.0 мкмоль. Предел обнаружения составляет 5.0 нмоль.

Введение

Гентамицин является высокоэффективным антибиотиком аминогликозидной группы, используемым для лечения инфекционных заболеваний. Лечебная эффективность антибиотика достигается при концентрации в сыворотке крови 2–12 мкг/мл [1, 2]. Повышенная доза этого препарата способна нарушить нервно-мышечную передачу импульсов и процессы активного всасывания в желудочно-кишечном тракте. Осуществление лекарственного мониторинга обеспечивает выбор оптимальной схемы и дозы применения гентамицина, повышает эффективность и безопасность лечения. В связи с этим появляется необходимость контроля за содержанием гентамицина в лекарственных формах и биологических жидкостях.

В контрольно-аналитической лаборатории подлинность гентамицина устанавливают методом ИК-спектromетрии. Количественное содержание его в лекарственных препаратах определяют с помощью метода жидкостной хроматографии или фотоколориметрическим методом [3]. Последний способ основан на образовании окрашенного комплекса гентамицина с ионом меди(II) в щелочной среде. В последние годы предложено несколько новых способов определения гентамицина: иммунно-ферментный [2], флуоресцентный [4], капиллярный электрофорез [5], ионная [6], жидкостная [7] и высокоэффективная жидкостная хроматография [8, 9] с различными детекторами, такими, как УФ-, флуоресцентный, масс-спектрометрический и электрохимический [6–9]. Из электрохимических методов предложено ионометрическое определение анти-

биотиков аминогликозидного ряда в лекарственных формах и биологических жидкостях [10].

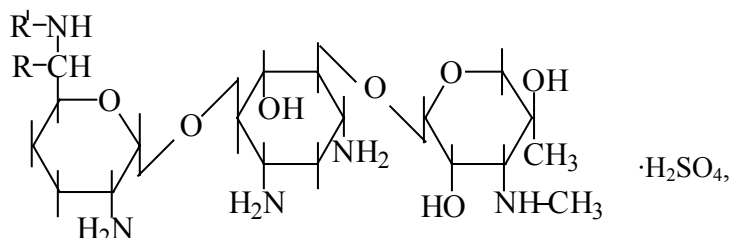
В настоящей работе изучено электрохимическое окисление гентамицина на графитовом электроде, модифицированном неорганической пленкой гетеровалентного оксида – цианида рутения, и разработан способ его вольтамперометрического определения в стационарных и проточно-инжекционных условиях.

1. Экспериментальная часть

Регистрацию постоянноточковых классических и циклических вольтамперограмм проводили на потенциостате ПИ-50-1.1 и ПУ-1 с трехэлектродной ячейкой. В качестве индикаторных электродов использовали электрод из стеклоуглерода (СУ) и химически модифицированный электрод (ХМЭ), электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, анодом – платиновая проволока. Способ изготовления ХМЭ на основе СУ с осажденной неорганической пленкой гетеровалентного оксида – цианида рутения (RuO-RuCN) заключался в следующем: сначала поверхность СУ полировали на фильтровальной бумаге, затем электрод ополаскивали дистиллированной водой и погружали в электрохимическую ячейку, содержащую свежеприготовленный раствор из $1 \cdot 10^{-3}$ М RuCl₃ и $1 \cdot 10^{-3}$ М K₄[Ru(CN)₆] на фоне 0.01 М H₂SO₄ (рН 2), и циклически изменяли потенциал от –0.2 В до 1.1 В со скоростью 100 мВ/с.

Для проведения проточно-инжекционного анализа (ПИА) использовали установку, содержащую перистальтический насос, инжектор, проточную электрохимическую ячейку и регистрирующее устройство [11]. Инъекцию осуществляли микрошприцем через уплотнительную мембрану.

В качестве объекта исследования использовали гентамицин, который является смесью гентамицинов C₁, C₂, C_{1A} и имеет следующую структурную формулу:



(C₁: R и R' – CH₃, C₂: R – CH₃ и R' – H, C_{1A}: R и R' – H).

Раствор исследуемого антибиотика гентамицина готовили путем растворения его навески в водном растворе 0.01 М H₂SO₄. рН растворов контролировали с помощью рН-метра типа рН-150.

2. Результаты и их обсуждение

Электроокисление гентамицина на немодифицированном СУ протекает в далекой анодной области потенциала при $E_n = 1.43$ В (табл. 1). Необратимый характер электродного процесса установлен по форме циклической вольтамперограммы, то есть по отсутствию обратимого катодного пика, а также по накло-

Табл. 1

Вольтамперные характеристики окисление гентамицина на СУ и ХМЭ на основе пленки RuO-RuCN ($C = 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, $v = 100$ мВ/с)*

E_S , В	I_S , мкА	$E_{\text{мед}}$, В	$I_{\text{мед}}$, мкА	$E_{\text{кат}}$, В	$I_{\text{кат}}$, мкА	$I_{\text{кат}} / I_{\text{мед}}$
1.43	70	0.80	30	0.80	120	4.0
		1.05	64	1.05	80	1.25

* E_S , I_S и $E_{\text{кат}}$, $I_{\text{кат}}$ – потенциалы и токи пика окисления субстрата на СУ и ХМЭ;
 $E_{\text{мед}}$ и $I_{\text{мед}}$ – потенциал и ток окисления медиатора.

ну волны, регистрируемой на классической вольтамперограмме при $v = 5$ мВ/с ($\text{tg } \beta = 90$ мВ).

Электродная реакция с участием антибиотика на ХМЭ на основе гексацианометаллатов (ГЦМ) протекает при меньших анодных потенциалах [12]. Наиболее изученными являются гексацианоферраты, в частности берлинская лазурь, для которой характерна гранецентрированная кубическая кристаллическая решетка. Среди ХМЭ на основе неорганических пленок ГЦМ наибольший интерес для электроанализа представляют электроды, на поверхности которых электрохимически генерируются оксидные центры металлов [13]. Получаемые таким образом ХМЭ обладают свойствами и берлинской лазури, и оксидов металлов. Именно такими свойствами обладает неорганическая пленка, получаемая из гексацианорутенатов металлов [14]. Отличительной особенностью этой пленки является повышенная стабильность высоких степеней окисления рутения [15]. Механизм стабилизации рутения в высоких степенях окисления включает образование кислородных мостиков между атомами металлов (рис. 1).

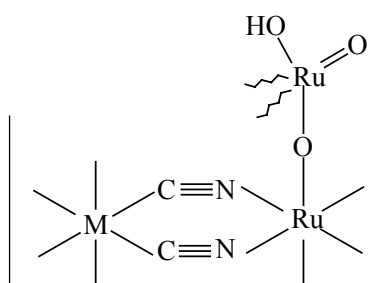


Рис. 1. Структура кристаллической решетки гексацианорутенатов металлов [14]

Для неорганической пленки гетеровалентного оксида – цианида рутения принято обозначение – RuO-RuCN.

Вольтамперограмма, полученная на СУ, модифицированном пленкой RuO-RuCN, представлена рис. 2 (кривая 1). На вольтамперной кривой, регистрируемой при $E > 0.60$ В, наблюдаются две пары хорошо выраженных анодных и катодных пиков, которые обычно относят к окислению частиц Ru(III) и Ru(IV), связанных с оксо- и цианогруппами, до более высоких степеней окисления [16, 17].

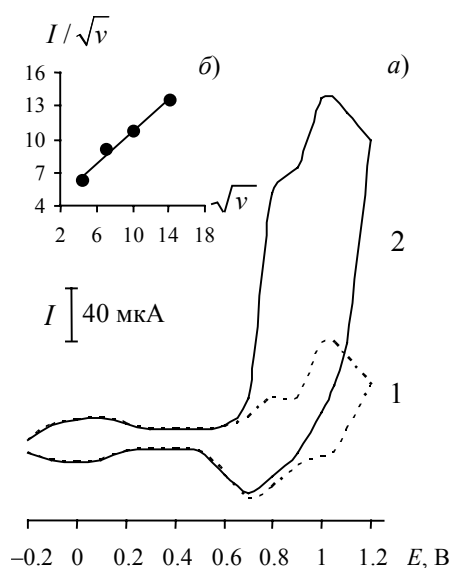


Рис. 2. а) Циклические вольтамперограммы, полученные на ХМЭ на основе пленки RuO-RuCN в отсутствие (1) и в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л гентамицина (2) на фоне 0.01 М H_2SO_4 ; б) зависимость I/\sqrt{v} от \sqrt{v} при окислении гентамицина на ХМЭ

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 H_2SO_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 к уменьшению токов анодных и катодных пиков. В щелочных растворах пленка ГЦМ разрушается.

При окислении гентамицина на ХМЭ наблюдается увеличение тока пика окисления модификатора при $E = 0.80$ В, характерного для редокс-пары Ru(IV)/Ru(III) (рис. 2, кривая 2), ток пика зависит от концентрации субстрата. При изучении зависимости тока (I) пика окисления гентамицина от скорости наложения потенциала (v) получен положительный наклон зависимости I/\sqrt{v} от \sqrt{v} , что указывает на адсорбционную природу тока (рис. 2, б).

Таким образом, можно допустить, что на ХМЭ органическое соединение подвергается медиаторному окислению в адсорбционном состоянии. В роли катализатора в этом случае выступают электрогенерированные частицы Ru(IV). Механизм электроокисления можно представить следующей схемой: частицы Ru(III) участвуют в обратимом электронном переносе с образованием частиц Ru(IV) в структуре модификатора, которые вступают в химическую реакцию с аналитом А, регенерируя частицы Ru(III) и образуя продукты реакции Р:

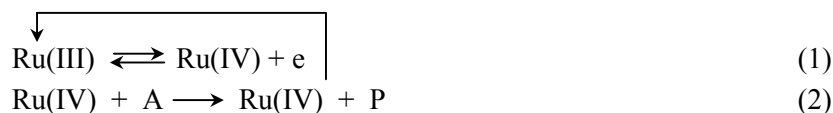


Табл. 2

Аналитические характеристики вольтамперометрического определения гентамицина на ХМЭ на основе пленки RuO-RuCN на фоне 0.01 М H₂SO₄

Условия Определения	Диапазон концентраций	Уравнение регрессии $I = a + bc,$		R
		$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	
Стационарная система, C, моль/л	$3 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	50.9 ± 0.9	$(6.1 \pm 0.3) \cdot 10^3$	0.9992
Проточная система, C, мкмоль	0.01 – 5.0	$(1.05 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$(13.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$	0.9995

Таким образом, использование ХМЭ на основе неорганической пленки RuO-RuCN приводит к уменьшению потенциала окисления аналита и к увеличению тока окисления медиатора: разность потенциалов окисления гентамицина (при $C = 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) на СУ (E_S) и ХМЭ ($E_{кат}$) составляет $E_S - E_{кат} = 0.63$ В, отношение каталитического тока окисления органического соединения ($I_{кат}$) и тока окисления медиатора ($I_{мед}$) равно $I_{кат} / I_{мед} = 4.0$ (табл. 1).

На основании полученных результатов разработана методика вольтамперометрического определения гентамицина по электрокаталитическому отклику ХМЭ на основе пленки RuO-RuCN.

Методика определения гентамицина на графитовом электроде, модифицированном пленкой RuO-RuCN. В мерную колбу на 10 мл вносили определенный объем раствора гентамицина и доводили до метки 0.01 М раствором H₂SO₄. 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 $E = 0.80$ В. Концентрацию аналита находили по градуировочному графику. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации гентамицина наблюдается в интервале от $3 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-2}$ М. Интервалы линейной зависимости тока пика от концентрации аналита и уравнение регрессии для этой зависимости приведены в табл. 2.

Результаты оценки правильности и воспроизводимости определения гентамицина в искусственных смесях приведены в табл. 3. Стандартное отклонение не превышает 5% во всем диапазоне определяемых концентраций.

Химически модифицированный электрод с электроосажденной пленкой RuO-RuCN использовали для амперометрического детектирования гентамицина в условиях ПИА. При проведении ПИА электрокаталитический сигнал регистрировали в потенциостатическом режиме. По зависимости тока пика от потенциала (рис. 3, а) выбрано значение потенциала $E = 1.00$ В, при котором измеряли токи окисления антибиотика в потоке (однако измерения можно проводить и при меньших потенциалах, например, при $E = 0.90$ В).

Табл. 3

Результаты определения гентамицина на ХМЭ на основе пленки RuO-RuCN; $n = 6$, $P = 0.95$

Условия Определения	Введено, мМ (мкмоль для ПИА)	Найдено, мМ (мкмоль для ПИА)	Показатель правильности, %	S_r
Стационарная система	0.100	0.096 ± 0.004	96.0	0.04
	0.50	0.52 ± 0.01	104	0.02
	1.00	0.92 ± 0.002	92.0	0.02
Проточная система	0.050	0.049 ± 0.001	98.0	0.03
	0.030	0.031 ± 0.001	103	0.04
	0.018	0.017 ± 0.0003	94.4	0.02

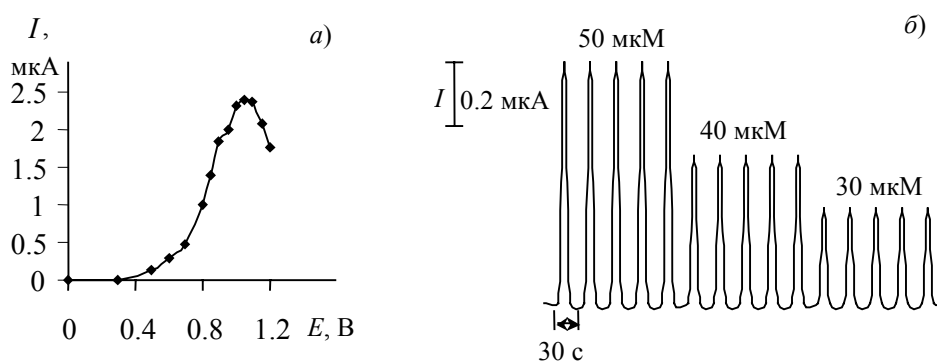


Рис. 3. Зависимость величины ПИА сигнала от накладываемого потенциала (а) и концентрации гентамицина (б)

Изучена зависимость электрокаталитического отклика ХМЭ в проточных системах при концентрации антибиотика, равной $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, от гидродинамических параметров – скорости потока (u) и объема инжектируемой пробы (V). Установлено, что зависимость каталитического тока от скорости потока проходит через максимум при $u = 4.0$ мл/мин (рис. 4, а), при изменении объема инжектируемой пробы величина тока практически не изменяется при $V > 0.5$ мл (рис. 4, б). Поэтому измерение аналитического сигнала в условиях ПИА проводили при $E = 1.00$ В, $u = 4.0$ мл/мин и $V = 0.5$ мл.

Исследовано изменение величины дисперсии от скорости потока. Коэффициент дисперсии определяли по отношению концентрации исходного раствора к величине концентрации в максимуме пика в условиях ПИА, приведенных к одинаковой размерности. Максимальная найденная величина, равная 3.5 при скорости потока $u = 4.0$ мл/мин, свидетельствует о том, что при выбранных условиях реализуется система с относительно малой дисперсией, то есть физическое разбавление пробы в потоке не слишком велико. Воспроизводимость контура и высоты ПИА-сигнала вполне удовлетворительна ($S_r < 5\%$). На рис. 3, б в качестве иллюстрации представлены ПИА-сигналы окисления гентамицина на ХМЭ с пленкой RuO-RuCN при разной концентрации. Ширина пиков составляет ~ 30 с. Использование электрокаталитического отклика ХМЭ в ПИА-условиях позволяет обеспечить теоретическую производительность до 120 проб/ч.

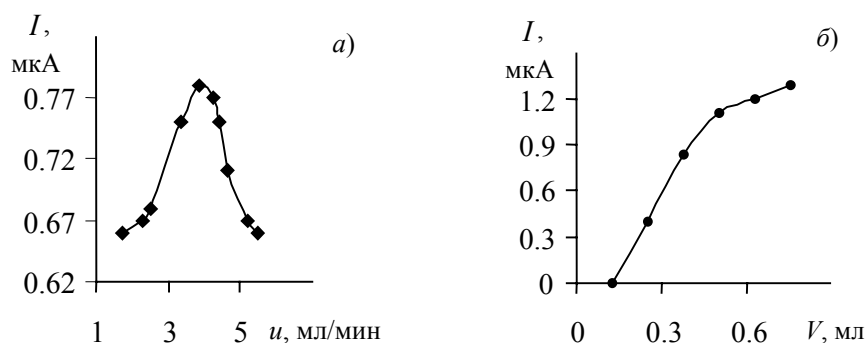


Рис. 4. Зависимость величины ПИА сигнала от скорости потока (а) и от объема инжестируемой пробы (б)

Аналитические характеристики амперометрического определения гентамицина на ХМЭ на основе пленки RuO-RuCN в условиях ПИА представлены в табл. 2. Зависимость величины ПИА-сигнала от концентрации аналита линейна в интервале 0.01 ÷ 5.0 мкМоль. Предел обнаружения составляет 5.0 нмоль (при отношении сигнал / шум, равном 3 [18]). Правильность методики оценена методом «введено-найдено» (табл. 3). Относительное стандартное отклонение (S_r) не превышает 5%.

Разработанный способ проточно-инжекционного определения гентамицина на ХМЭ с каталитическими свойствами отличается простотой и высокой чувствительностью. Определению антибиотика мешают соединения, проявляющие электрохимическую активность в рассматриваемой области потенциалов, а также участвующие в реакции гетерогенного электрокатализа на ХМЭ. Для селективного определения гентамицина в сложных по составу объектах необходимо их предварительное разделение, которое, например, достигается в условиях жидкостной хроматографии. Однако при анализе объектов, не содержащих мешающих определению аналита компонентов, возможно и прямое определение рассматриваемого антибиотика.

Summary

L.G. Shaidarova, L.N. Davletshina, H.C. Budnikov. Electrocatalytic oxidation and flow-injection determination of gentamicin at electrode covered by mixed-valent ruthenium oxide – ruthenium cyanide film.

Electrocatalytic activity of electrode covered by mixed-valent ruthenium oxide – ruthenium cyanide film during gentamicin oxidation in acid medium is found. Electrocatalytic effect at modified electrode is displayed in the decrease of overvoltage and the increase of peak current of this compound oxidation in comparison with bare electrode. Modified electrode was used for voltammetric determination of antibiotic in static and flow conditions. For flow-injection conditions the linear dependence of the analytic signal from the concentration of gentamicin is observed in a wide range: from 0.01 to 5.0 μmol . The detection limit is about 5.0 nmol.

Литература

1. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. – М.: ООО «Изд-во Новая волна», 2002. – Т. 2. – 608 с.
2. *Колосова А.Ю., Блинецов А.Н., Самсонова Ж.В., Егоров А.М.* Разработка твердофазного иммуноферментного анализа гентамицина в сыворотке крови человека // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 2. – С. 9–13.
3. *Глущенко Н.Н., Плетенева Т.В., Попков В.А.* Фармацевтическая химия. – М.: Академия, 2004. – 384 с.
4. *Gubernator J., Drulis-Kawa Z., Kozubek A.* A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions // Inter. J. of Pharmaceutics. – 2006. – V. 327, No 1–2. – P. 104–109.
5. *Flurer C.L., Wolnik K.A.* Quantitation of gentamicin sulfate in injectable solutions by capillary electrophoresis // J. of Chromatography A. – 1994. – V. 663, No 2. – P. 259–263.
6. *Kaine L.A., Wolnik K.A.* Forensic investigation of gentamicin sulfates by anion-exchange ion chromatography with pulsed electrochemical detection // J. of Chromatography A. – 1994. – V. 674, No 1–2. – P. 255–261.
7. *Kijak P.J., Jackson J., Shaikh B.* Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection // J. of Chromatography B. – 1997. – V. 691, No 2. – P. 377–382.
8. *Al-Amoud A.I., Clark B.J., Chrystyn H.* Determination of gentamicin in urine samples after inhalation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatisation with o-phthalaldehyde // J. of Chromatography B. – 2002. – V. 769, No 1. – P. 89–95.
9. *Clarot I., Chaimbault P., Hasdenteufel F., Netter P., Nicolas A.* Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection // J. of Chromatography. – 2004. – V. 1031, No 1–2. – P. 281–287.
10. *Кулапина Е.Г., Барагузина В.В., Кулапина О.И.* Экспрессное ионометрическое определение аминогликозидных антибиотиков в лекарственных формах и биологических жидкостях // Журн. аналит. хим. – 2005. – Т. 60, № 6. – С. 592–597.
11. *Шайдарова Л.Г., Зарипова С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К., Фицев И.М.* Электрокаталитическое определение оксалат-ионов на химически модифицированных электродах // Журн. приклад. химии. – 2001. – Т. 74, Вып. 5. – С. 728–733.
12. *Будников Г.К., Майстренко В.Н., Муринов Ю.И.* Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрoэлектродами. – М.: Наука, 1994. – 239 с.
13. *Cox J.A., Jaworski R.K.* Electroanalysis with electrodes modified by inorganic films // Electroanalysis. – 1991. – V. 3, No 9. – P. 869–877.
14. *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.
15. *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.
16. *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.

17. *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.
18. *Чарыков А.К.* Математическая обработка результатов химического анализа: Методы обнаружения и оценки ошибок. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.

Поступила в редакцию
28.12.06

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 – кандидат химических наук, сотрудник кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

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

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*