

ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ АЛМАЗОПОДОБНЫМИ ПЛЕНКАМИ

Введение

В настоящее время актуальной и практически важной проблемой является разработка сенсоров для медицинских применений.

Исследование пигментного обмена в организме является необходимой процедурой с точки зрения определения одного из компонентов распада эритроцитов – билирубина [1]. Основными причинами разрушения эритроцитарного состава, с последующим увеличением концентрации билирубина в организме являются определенные инфекционные заболевания, патологии печени и желчевыводящих путей, болезни, связанные с недостаточным синтезом альбумина или глюкуроновой кислоты в организме человека.

Нейротоксичность билирубина проявляется, в частности, смертоносной билирубиновой энцефалопатией (ядерной желтухой), которая сопровождается дальнейшими поражениями мозга у новорожденных [2].

Наиболее частое определение билирубина проводится прямыми спектроскопическими или калориметрическими методами [3], а также с использованием методов предварительного разделения [4]. Но эти методы имеют ряд недостатков, таких, как высокий порог определения, большой объем пробы и сложность предварительной подготовки. Использование электрохимических методов для определения билирубина сопровождается определенными трудностями, связанными с практическим отсутствием электрохимической активности билирубина в водных растворах на традиционных электродных материалах. Поэтому для электрохимического определения билирубина в водных растворах применяют разные виды модификации электродов-сенсоров, косвенное электрохимическое окисление и другие вспомогательные меры [5].

Проблема определения билирубина в водных растворах также дополнительно отягчается его низкой растворимостью и химической нестойкостью в растворах, связанной с довольно быстрым окислением и активными фотохимическими процессами. Также актуальной является разработка новых методов определения билирубина.

Цель работы

Проводится разработка системы определения билирубина в водных растворах посредством ЭХЛ на электродах, модифицированных АПП.

Выбор метода детектирования

При медицинских анализах биопроб с целью диагностики регуляторных патологий ключевыми проблемами являются: сложность работы с малыми объемами, разделение пробы на составляющие, регистрация аналитического сигнала. В существующих системах большое число компонент в биопробе приводят к тому, что аналитический сигнал представляет сплошной шум и не несет полезной информации. Разработка системы, которая обладает значительно большей чувствительностью, минимально возможным временем анализа и высокой селективностью является наиболее перспективной. Существенным при этом является использование ЭХЛ анализа [6]. Его высокая селективность и высокий предел обнаружения при определении конкретных органических веществ, делает этот метод весьма привлекательным для применения в лабораторном анализе. Но такой тип анализа имеет и недостатки, которые тесно связаны со старением и деградацией электродов используемых ячеек или

сенсоров, в связи с чем актуальным является модификация электродных поверхностей различными материалами.

Взвесив все достоинства и недостатки алмазоподобных пленок [7], увидим их значительное превосходство по сравнению с другими электродными материалами, даже при сравнении с благородными металлами. А если еще учесть экспоненциальный рост популярности использования алмазоподобных структур ввиду их характеристик, можно с уверенностью сказать, что стоимость алмазоподобных пленок будет ничтожной, а доступность этого материала станет сравнима с доступностью графита. Следовательно, для решения этой проблемы перспективно использовать систему с электродами, модифицированными АПП. Применение электродов с алмазоподобными покрытиями позволяет уменьшить фоновые токи электролиза, расширить потенциальное окно в водных средах, увеличить срок службы устройства, а применение электрохемилюминесцентного принципа детектирования позволит определять наномолярные концентрации.

Схема реакций, протекаемых в ЭХЛ ячейке

Приведенные в литературе сведения о довольно легком химическом окислении билирубина [8] дали возможность предположить, что билирубин может химически окисляться электрогенерированными на аноде катион радикалами органолюминофоров. Также известно, что восстановленная форма билирубина перестраивается в уробилиноген, который является довольно сильным восстановителем, и в гомогенной реакции с катион радикалом органолюминофора приведет к ЭХЛ. То есть предположительно билирубин будет сореагентом в ЭХЛ-реакциях. Для экспериментальной проверки этого предположения было решено использовать уже хорошо исследованный на модифицированном АПП стеклоуглеродном электроде бипиридилный комплекс рутения, окисленная форма которого имеет достаточно положительный потенциал для последующего окисления билирубина.

Исходя из указанных предположений реакции будут протекать в следующей последовательности.

После ввода пробы происходит диффузионное перемешивание среды (рис. 1).

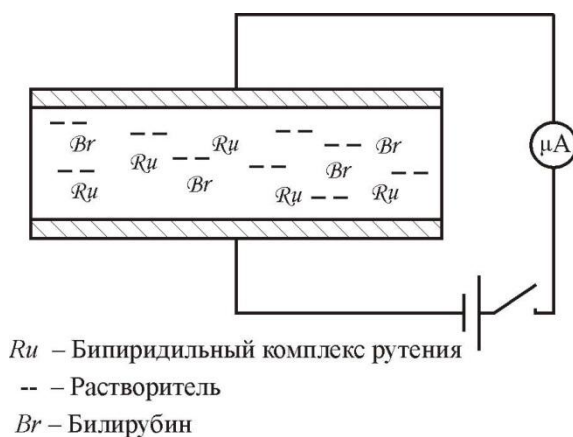


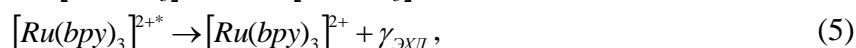
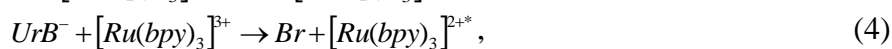
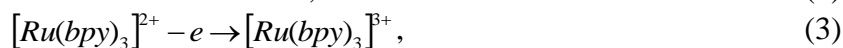
Рис. 1. Состояние системы после ввода пробы

Следующим шагом является подача фиксированного напряжения на электроды, что приводит к прохождению фарадеевских процессов. На катоде происходит восстановление билирубина и его перестройка до уробилиногена, а на аноде окисление бипиридилного комплекса рутения. Поскольку частицы оказываются одинаково заряжены по отношению к электродам, то они начинают движение в противоположном направлении. При встрече в объеме противоположно заряженных частиц, происходит их рекомбинация с выделением световой энергии $\gamma_{\text{ЭХЛ}}$ которая представляет собой аналитический сигнал (рис. 2).



Рис. 2. Процессы, происходящие в системе при подаче напряжения на электроды

Данные процессы можно описать следующими уравнениями реакций:



В работе [9] растворимость билирубина изучалась в водном буфере Бриттона – Робинсона при разных pH (6 – 8,5) в темноте при постоянных значениях ионной силы и температуры 37°C. Было выявлено, что логарифм растворимости менялся линейно с pH (наклон кривой составлял 1,72). Так, при pH = 7,5 растворимость составляла 10 нМ, а при pH = 8,5 – около 900 нМ.

Экспериментальные исследования

Все электрохимические и ЭХЛ-исследования проводились на установке «ЭЛАН-3d», разработанной в лаборатории «Аналитической оптохемотроники» Харьковского национального университета радиоэлектроники (рис. 3).

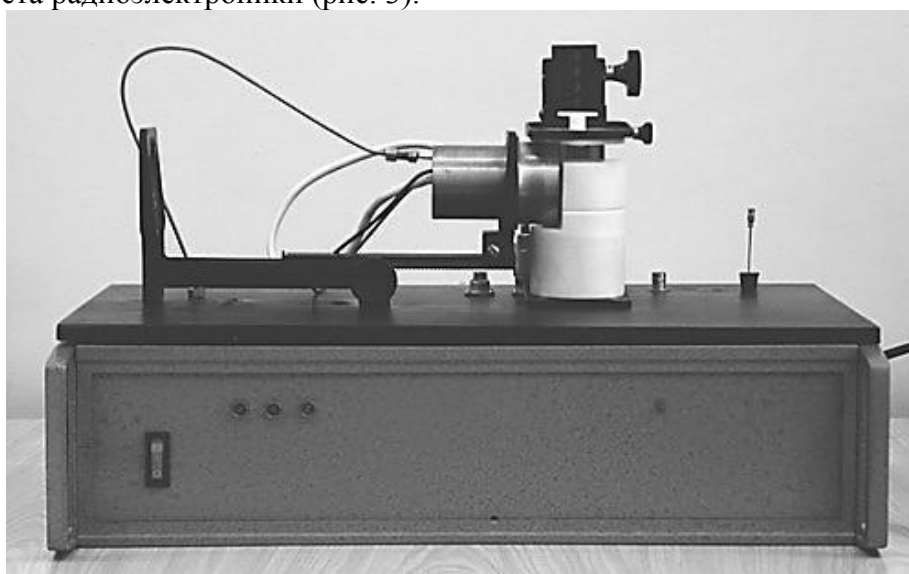


Рис. 3. Комплекс для электрохимических и ЭХЛ-исследований «ЭЛАН-3d»

Программа развертки потенциалов синтезируется в ПК на основании параметров эксперимента, установленных оператором при помощи программного обеспечения, управляющего комплексом «ЭЛАН-3d». Эта программа в виде дискретных отсчетов поступает в плату ввода-вывода информации Advantech PCI-1711 и через аналоговый выход подается на вход потенциостата, который подает заданный потенциал на электродную систему ячейки и осуществляет потенциостатирование. Управление режимами потенциостата и коммутация выходов на вспомогательный и рабочий электрод, осуществляется посредством потенциостата, при получении соответствующей информации с блока платы ввода-вывода через ее цифровой выход.

Комплекс «ЭЛАН-3d» реализует методику циклической вольтамперометрии. Все параметры эксперимента (напряжение реверса, полярность прикладываемого к рабочему электроду потенциала, скорость развертки потенциала, количество циклов развертки и т.п.) задаются в соответствующем окне программы, управляющей комплексом. На основе заданных параметров программа синтезирует набор выходных данных – программу развертки потенциала рабочего электрода во времени. При начале работы эти данные через заданные интервалы времени посредством платы Advantech PCI-1711 преобразуются в аналоговый сигнал и поступают на потенциостат, обеспечивающий подачу соответствующего напряжения между рабочим и вспомогательным электродами ЭХЛ ячейки. Одновременно с посылкой данных, управляющих потенциалом рабочего электрода, осуществляется оцифровка и запись сигналов электрохимического тока через рабочий электрод и фототока ФЭУ. Полученные данные отображаются как функция управляющего напряжения (так называемая циклическая вольтамперограмма) в реальном режиме времени.

Для демонстрации электрохимической активности билирубина были проведены исследования диметилформамидных (ДМФА) растворов, где билирубин лучше растворяется и демонстрирует электрохимическую активность. На рис. 4 приведенная циклическая вольтамперограмма окисления билирубина. Из рисунка видно, что билирубин электроокисляется до биливердина, который также окисляется при более положительных потенциалах. Модификация электрода АПП не приводит к заметным изменениям в процессе. Процессы окисления билирубина в ДМФА не сопровождаются эмиссией ЭХЛ. Подкисление ДМФА приводит к уменьшению растворимости билирубина с соответствующим уменьшением пиков токов окисления. Создание щелочной среды в ДМФА существенно увеличивает растворимость билирубина, но делает его электрохимически неактивным.

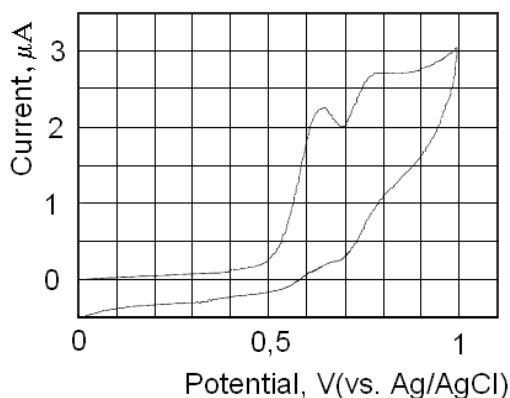


Рис. 4. Циклическая вольтамперограмма окисления 0,2 мМ билирубина в ДМФА на фоне 0,1 М NaClO₄ на стеклоглеродном электроде ($V=100$ мВ/с)

Добавка воды к ДМФА уменьшает амплитуду пиков токов, и когда воды в смеси становится больше 50 %, билирубин полностью перестает окисляться.

Таким образом, проведенными опытами было выяснено, что в водных растворах у билирубина полностью отсутствует электрохимическая активность как на платиновом или стеклоглеродном электродах, так и на модифицированном АПП стеклоглеродном электроде.

На рис. 5, а приведены циклическая вольтамперограмма в положительном участке потенциалов и соответствующая эмиссия ЭХЛ модельной аналитической системы без добавления билирубина, которые были получены в сенсорном устройстве с модифицированным АПП электродом. Была зафиксирована незначительная фоновая ЭХЛ, которая лишь немного превышала уровень шумов фототока. После добавления билирубина в количестве, которое обеспечило его концентрацию в модельном растворе около 5 нМ, эмиссия ЭХЛ возросла в десять раз (рис. 5, б). Таким образом, предположение о возможности использования билирубина как сорреагента в ЭХЛ реакциях с электрогенерированными ионами-радикалами $\{Ru(bpy)_3\}^{+3}$ полностью подтвердилось. Дополнительным подтверждением гомогенного механизма химических реакций $\{Ru(bpy)_3\}^{+3}$ с билирубином служит близкая к экспоненциальной кинетика затухания люминесценции во время обратного хода развертки потенциала, когда ионы-радикалы $\{Ru(bpy)_3\}^{+3}$ не генерируются на электроде (исключительно хемилюминесцентный процесс).

Для увеличения растворимости билирубина модельный раствор готовили на фосфатном буфере с pH=8,5. Данные для буферизованного модельного раствора с концентрацией билирубина в 0,4 мкМ, которые приведены на рис. 6, свидетельствуют о росте интенсивности ЭХЛ более чем в 100 раз по отношению к модельному раствору без билирубина. То есть эмиссия ЭХЛ увеличивается пропорционально концентрации билирубина в модельном растворе.

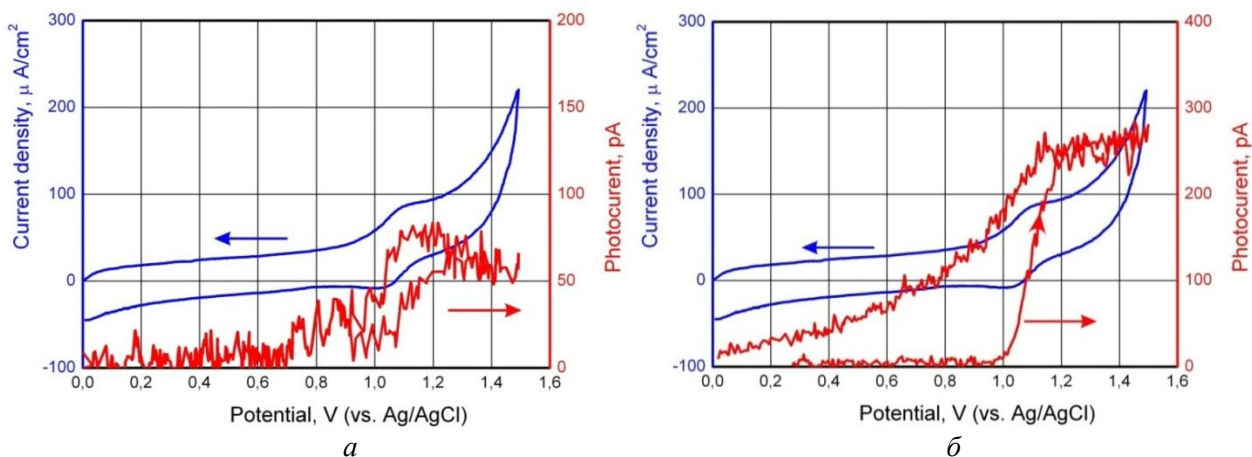


Рис. 5. Циклическая вольтамперограмма и соответствующая эмиссия ЭХЛ модельной системы а – без добавления билирубина ($H_2O + 0,1M NaClO_4 + 40\mu M Ru(bpy)_3Cl_2$); $V=100mB/c$; б – при добавлении билирубина ($H_2O + 5нМ$ билирубина + $0,1M NaClO_4 + 40\mu M Ru(bpy)_3Cl_2$); $V=100mB/c$

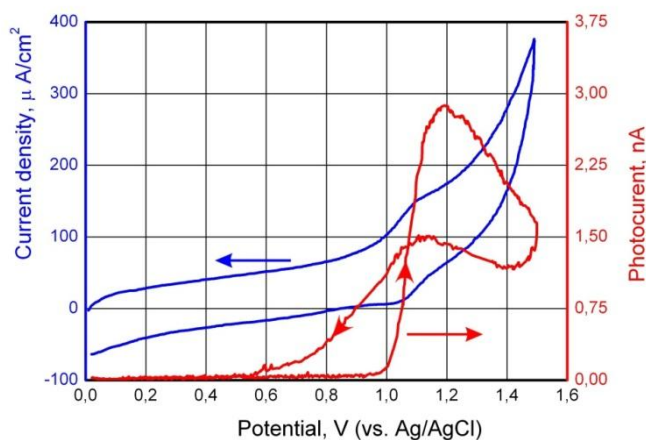


Рис. 6. Циклическая вольтамперограмма и соответствующая эмиссия ЭХЛ модельной аналитической системы при добавлении билирубина (фосфатный буфер с pH=8,5 + 0,4мкМ билирубина + $0,1M NaClO_4 + 40\mu M Ru(bpy)_3Cl_2$); $V=100mB/c$

Выводы

На модельной системе экспериментально подтверждена возможность определения билирубина в водных растворах посредством электрохемилюминесценции на электродах из стеклоуглерода, модифицированных алмазоподобными пленками. Предложены уравнения реакций, протекающих на электродах в процессе окисления, восстановления и рекомбинации. Аналитические системы, построенные по этому принципу, могут быть успешно использованы для ранней диагностики заболеваний связанных с разрушения эритроцитарного состава, с последующим увеличением концентрации билирубина.

Список литературы: 1. *Березов Т.Т, Коровкин Б. Ф.* Биологическая химия : учебник / Под ред. акад. АМН СССР С. С. Дебова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1990. – 528 с. 2. *Manju Mamtani, Archana Patel, et al* Prognostic Value of Direct Bilirubin in Neonatal Hyperbilirubinemia // *Indian Journal of Pediatrics*, Volume 74-September, 2007. 3. *Johnson, L., Blutani, V. K.*, *Clin. Perinatol.* 1998, 25, pp. 555–560 4. *Zhou Nie, Ying Sing Fung* Microchip capillary electrophoresis for frontal analysis of free bilirubin and study of its interaction with human serum albumin // *Electrophoresis* 2008, 29. 5. *Cong Wang, Guangfeng Wang, Bin Fang* Electrocatalytic oxidation of bilirubin at ferrocenecarbox-amide modified MWCNT–gold nanopocomposite electrodes // *Microchim Acta* (2009) 164: pp. 113–118. 6. *Рожницкий Н.Н., Бых А.И., Красноголовец М.А.* Электрохимическая люминесценция. – Харьков : ХТУРЕ, 2000. – 320с. 7. *Семеней А.М., Рожницкий Н.Н.* Алмазоподобные покрытия в электроаналитике // *Восточно-Европейский журнал передовых технологий.* – 2009. – 4/10 (40). – С. 21-24. 8. *Thomas R. Koch* Feasibility of Measuring Free and Total Bilirubin Electrochemically in Serum // *CLIN. CHEM.* 27/7, pp. 1295-1299(1981). 9. *Baizhao Zeng and Xingyao Zhou* Indirect determination of bilirubin by linear sweep polarography // *Fresenius J Anal Chem* (1993) 347: pp.382-387.

*Харьковский национальный
университет радиоэлектроники*

Поступила в редколлегию 10.06.2013