

УДК 543.544, 517.958, 681.586

ЕЛЕКТРОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНА СЕНСОРИКА ЖОВЧНИХ ПІГМЕНТІВ

К. М. Музыка

Харківський національний університет радіоелектроніки,
лаб. Аналітичної оптихемотроніки,
61166, Україна, м. Харків, пр. Леніна, 14
E-mail: mkm@kture.kharkov.ua, rzh@kture.kharkov.ua

ЕЛЕКТРОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНА СЕНСОРИКА ЖОВЧНИХ ПІГМЕНТІВ

К. М. Музыка

Анотація. У роботі вперше продемонстровано можливість використання електрохемилюмінесцентного (ЕХЛ) методу детектування в сенсоріці жовчного пігменту білірубину у водному розчині. Показаний співреагентний характер участі білірубину у гомогенних ЕХЛ-реакціях з електрогенерованими іон-радикалами трисбіпіридила рутенію ($\{Ru(bpy)_3\}^{+3}$). Досліджено електрохімічну поведінку та режими електрохімічного збудження ЕХЛ тестових розчинів з білірубіном з використанням скловуглецевого електрода з алмазоподібним покриттям, вплив на аналітичний сигнал величини рН та концентрації пігменту.

Ключові слова: білірубін, жовчний пігмент, гіпербілірубінемія, електрохемилюмінесценція, буферний розчин, трисбіпіридил рутенію, співреагент, алмазоподібне покриття

ELECTROCHEMILUMINESCENT SENSORICS OF BILE PIGMENTS

К. М. Музыка

Abstract. For the first time the possibility of electrochemiluminescent (ECL) method using for the bile pigment, namely bilirubin, detection in aqueous solution was demonstrated. The coreactant nature of the involvement of bilirubin in the homogeneous ECL reactions with electrogenerated ion radicals trisbipyridine ruthenium ($\{Ru(bpy)_3\}^{+3}$) was shown. Electrochemical behavior and modes of electrochemical excitation of ECL in model solutions with bilirubin using glassy carbone electrode with a diamond-like coating and influence of pH and concentration of pigment on the analytical signal were investigated.

Keywords: bilirubin, bile pigment, hyperbilirubinemia, electrogenerated chemiluminescence, buffer solution, trisbipyridil ruthenium, coreactant, diamond-like carbon coating

ЭЛЕКТРОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ СЕНСОРИКА ЖЕЛЧНЫХ ПИГМЕНТОВ

Е. Н. Музыка

Аннотация. В работе впервые продемонстрирована возможность использования электрохемилюминесцентного (ЭХЛ) метода детектирования в сенсорике желчного пигмента билирубина в водном растворе. Показан сореагентный характер участия билирубина в гомогенных ЭХЛ-реакциях с электрогенерированными ион-радикалами трисбипиридила рутения ($\{Ru(bpy)_3\}^{+3}$). Исследованы электрохимическое поведение и режимы электрохимического возбуждения ЭХЛ тестовых растворов с билирубином с использованием стеклоглеродного

электрода с алмазоподобным покрытием, влияние на аналитический сигнал величины рН и концентрации пигмента.

Ключевые слова: билирубин, желчный пигмент, гипербилирубинемия, электрохемилюминесценция, буферный раствор, трисбипиридил рутения, соррегент, алмазоподобное покрытие

Вступ

Проблема гіпербілірубінемії немовлят, незважаючи на тривалий період вивчення цього захворювання, зберігає свою актуальність і гостроту. Вільний незв'язаний білірубін (біля 20 мг/дл) є нейротоксичним, що проявляється, зокрема, смертоносною ядерною жовтянкою, яка супроводжується подальшим мозковим ушкодженням у новонароджених [1]. Істотною роллю у забезпеченні успішного лікування гіпербілірубінемії немовлят відіграє своєчасна постановка діагнозу. Однак слід зазначити, що існуючі методи визначення білірубину мають недостатню межу виявлення (більш ніж 20 мкмоль/л). Це не дає можливості детектування діагностично значущої кількості жовчних пігментів у дуже малому об'ємі (для запобігання утворення гематом) зразка, що береться на аналіз, а, отже, відслідковувати патологію на ранніх стадіях і проводити її моніторинг. Тому очевидна необхідність контролю рівня жовчних пігментів, зокрема, білірубину у немовлят і розробки надійного та ефективного метода їх визначення у лімітованій кількості зразка, що береться на аналіз.

Найчастіше детектування білірубину проводиться прямими *спектроскопічним* чи *калориметричним* методами [2, 3], а також із застосуванням методів попереднього розділення [4, 5]. Визначення загального білірубину прямим *фотометричним* методом надзвичайно просте, зручне, не вимагає венепункції (досліджується капілярна кров), може повторюватися неодноразово протягом доби. Недоліком методу є неможливість розпізнавати фракції білірубіна, менша точність при вираженому гемолізі.

Найбільш точним методом визначення концентрації білірубину є *біохімічний*. Однак його недоліком є необхідність забору венозної крові для дослідження.

Варто прагнути до того, щоб для визначення білірубіна, як і для інших методів дослідження, використовувалися мікрометоди. Цього можна

досягнути вибором високочутливих методів детектування.

До одного з найчутливіших методів аналізу належить електрохемилюмінесцентний (ЕХЛ) метод, тому *метою* даної роботи є дослідження можливості використання явища ЕХЛ у сенсоріці жовчного пігменту білірубину.

Матеріали і методи

Для експериментального визначення білірубину у роботі досліджувався розроблений спільно з Національним науковим центром «Харківський фізико-технічний інститут», Інститут фізики твердого тіла, матеріалознавства та технологій НАН України сенсорний елемент з алмазоподібним покриттям (АПП) на скловуглецевому електроді.

В якості органічного електрохемилюмінофору використовувався трисбіпіридилний комплекс рутенію ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) (Sigma-Aldrich) і білірубін (Fluka).

Дослідження білірубину здійснювалось електрохімічним і ЕХЛ-методом, враховуючи їх спорідненість. Циклічна вольтамперометрія (ЦВАМ) проводилась у модельному розчині (0.1M LiClO_4 , $2.7 \cdot 10^{-5}\text{M}$ трис(2,2'-біпіридил) рутенію (III) в фосфатному буфері (рН8,5)) в діапазоні потенціалів 0 – 0.55 В (відн. електрода з Ag/AgCl) за різних концентрацій білірубину з використанням комплексу для електрохімічних та ЕХЛ-досліджень ЕЛАН-2м.

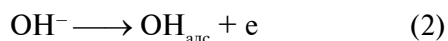
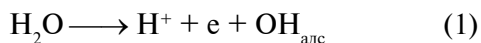
Характер впливу рН

Проблема визначення білірубину у водних розчинах також додатково обтяжується його низькою розчинністю та хімічною нестійкістю, пов'язаною з досить швидким окисненням та активними фотохімічними процесами. В роботі [6] розчинність білірубину вивчалась у водному буфері Бріттона-Робінсона за різних значень рН (6÷8,5) без дії світла за постійних значень іонної сили і температури (37°C). Було виявлено, що логарифм розчинності змінював-

ся лінійно з рН (нахил кривої становив 1,72). Так, за рН=7,5 розчинність становила 10нМ, а за рН=8,5 — близько 900 нМ.

Електрохімічне дослідження білірубину

Використання електрохімічних методів для визначення жовчних пігментів супроводжується певними труднощами, пов'язаними з відсутністю електрохімічної активності білірубину у водних розчинах на традиційних електродних матеріалах. З помітною швидкістю окислення білірубину відбувається тільки на електродах каталізаторах з металів платинової групи. Останні мають велику здатність до хемосорбції, що призводить до деструкції адсорбованих молекул, наприклад дегідруванням, тобто розривом зв'язків С—Н. Хемосорбція супроводжується розривом хімічних зв'язків всередині органічної молекули, і, як наслідок, сприяє утворенню нових зв'язків із поверхнею платинового електрода і полегшує окислення (гідроксилювання) органічної молекули. Останнє часто відбувається за участю адсорбованих радикалів $\text{OH}_{\text{адс}}$, що утворюються на поверхні електрода в результаті протікання електрохімічного процесу розряду молекул води чи іонів OH^- , тобто:



Білірубін щільно хемосорбується на поверхні платинового електрода, тому швидкість електроокислення білірубину є функцією не об'ємної, а поверхневої концентрації хемосорбованих часток, тому за досягнення останньої граничного межового значення швидкість електроокислення є незалежною від об'ємної концентрації.

Зауважимо, що для електрохімічного визначення білірубину у воді, крім електродів платинової групи застосовують різні види модифікації електродів, непряме електрохімічне окислення та інші допоміжні заходи [7–11].

Дослідження електрохімічних та ЕХЛ-властивостей білірубину було вирішено почати з диметилформамідних (ДМФА) розчинів, де білірубін краще розчиняється і, головне, демонструє електрохімічну активність. На рис. 1 наведена циклічна вольтамперограма окислення білірубину. Останній електроокислюється до білівердину, який також окислюється при більш позитивних потенціалах. Модифікація елек-

трода АПП не вносить помітних змін у процес. Процеси окислення білірубину в ДМФА не супроводжуються емісією ЕХЛ. Підкислювання ДМФА призводить до зменшення розчинності білірубину та відповідного зменшення піків струмів окислення. Створення лужного середовища в ДМФА суттєво збільшує розчинність білірубину, але робить його електрохімічно неактивним.

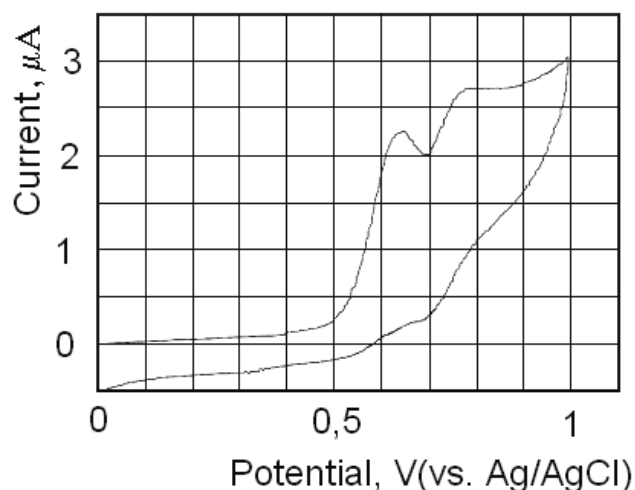


Рис. 1. Циклічна вольтамперограма окислення 0,2 мМ білірубину в ДМФА на фоні 0,1М NaClO_4 на скловуглецевому електроді ($V=100\text{мВ/с}$)

Додавання води до ДМФА зменшує амплітуду піків струмів, і за перевищення вмісту води в суміші 50 %, білірубін зовсім перестає електрохімічно окислюватись.

Таким чином, проведені дослідження показали, що в водних розчинах у білірубину повністю відсутня електрохімічна активність як на платиновому і скловуглецевому електродах, так і на модифікованому АПП скловуглецевому електроді.

Електрохемілюмінесценція біпіридинного комплексу рутенію на скловуглецевому електроді з АПП

Перед ЕХЛ-сенсорикою білірубину було проведено експериментальні дослідження модифікованого АПП скловуглецевого електрода. Унікальні властивості останнього дозволили отримати на ньому (вперше) ЕХЛ класичного рекомбінаційного типу. ЕХЛ з таким механізмом має місце в апротонних розчинниках і добре досліджена, але дотепер класична рекомбінаційна ЕХЛ не була зафіксована у водному розчині без застосування допоміжних заходів,

наприклад, додавання до водного розчинника 20 % ацетонітрила [12], чи використання зустрічноштирьових планарних мікроелектродів зі скловуглецю [13].

Наведені в літературі відомості про досить легке хімічне (гомогенне) окислення білірубину [10] дали змогу досить вірогідно припустити, що білірубін може хімічно окислюватись електрогенерованими на аноді катіон радикалами органоліумінофорів. Вже менш вірогідним було припущення, що якийсь з продуктів такого хімічного окислення білірубину буде досить сильним відновлювачем, який в гомогенній реакції з катіон радикалом органоліумінофору призведе до ЕХЛ. Тобто було зроблено припущення, що білірубін буде співреагентом в ЕХЛ-реакціях. Для експериментальної перевірки було використано вже добре досліджений на модифікованому АПП скловуглецевому електроді біпіридилний комплекс рутенію, окислена форма якого має достатньо позитивний потенціал для наступного гомогенного окислення білірубину.

На рис. 2 наведені циклічна вольтамперограма в анодній ділянці потенціалів та відповідна ЕХЛ модельної аналітичної системи без додавання білірубину, які були отримані в сенсорному пристрої з модифікованим АПП скловуглецевим електродом.

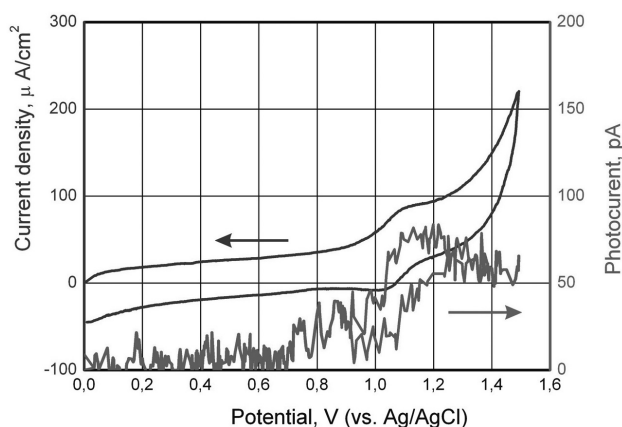


Рис. 2. Циклічна вольтамперограма та відповідна емісія ЕХЛ модельної аналітичної системи без додавання білірубину ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{M NaClO}_4 + 40\text{мкМ Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$); $V=100\text{мВ/с}$

Зафіксована фонові ЕХЛ, лише трохи перевищувала рівень шумів фотоструму. Після додавання білірубину в модельному розчині до концентрації біля 5нМ, ЕХЛ зросла в десять разів (рис.3). Таким чином, наше припущен-

ня про можливість використання білірубину як співреагенту в ЕХЛ реакціях з електрогенерованими іон-радикалами $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{+3}$ підтвердилося. Додатковим підтвердженням механізму хімічних реакцій $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{+3}$ з білірубіном є близька до експоненційної кінетика затухання люмінесценції під час зворотного ходу розгортки потенціалу, коли іон-радикали $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{+3}$ не генеруються на електроді (електрохемілюмінесцентний процес виключено).

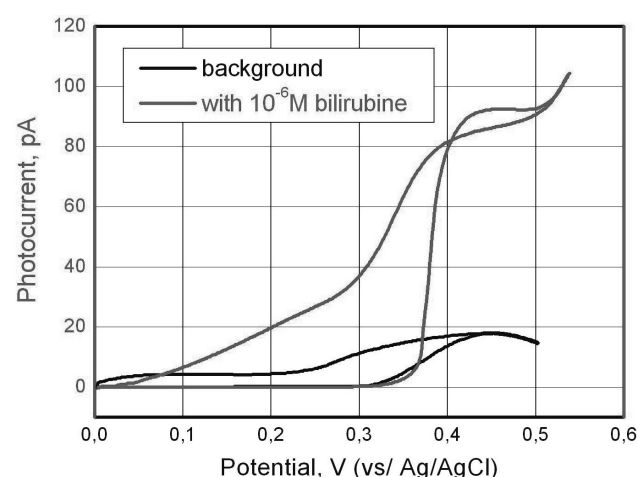


Рис. 3. Циклічна вольтамперограма та відповідна емісія ЕХЛ модельної аналітичної системи при додаванні білірубину ($\text{H}_2\text{O} + 5\text{нМ білірубину} + 0,1\text{M NaClO}_4 + 40\text{мкМ Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$); $V=100\text{мВ/с}$

В загальному вигляді схема запропонованого співреагентного механізму ЕХЛ наведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Схема механізму випромінювання ЕХЛ у системі зі співреагентом білірубіном^a

Фізико-хімічні процеси	Схема реакцій ЕХЛ
Окислення електрохемілюмінофору на електроді	$R - e \rightarrow R^{*+}$
Хімічна (гомогенна) реакція окисленого електрохемілюмінофору і співреагенту	$R^{*+} + C \rightarrow R + C^{*+}$ $C^{*+} \rightarrow C_{Red}^{*+}$ $C_{Red}^{*+} + R \rightarrow R^{*+} + P$
Формування збуджених станів	$R^{*+} + C_{Red}^{*+} \rightarrow R^* + P$
Емісія світла	$R^* \rightarrow R + h\nu$

^a R — електрохемілюмінофор; C — співреагент; C_{Red}^{*+} — інтермедакти-відновлювачі співреагенту; P — продукт, реакцій з C_{Red}^{*+} .

Для збільшення розчинності білірубину модельний розчин готували на фосфатному буфері з рН=8,5.

Дані для буферизованого модельного розчину з концентрацією білірубину в 0,4 мкМ (рис. 4), свідчать про зростання інтенсивності ЕХЛ більше ніж у 100 разів по відношенню до модельного розчину без білірубину. Тобто ЕХЛ збільшується пропорційно концентрації білірубину у модельному розчині.

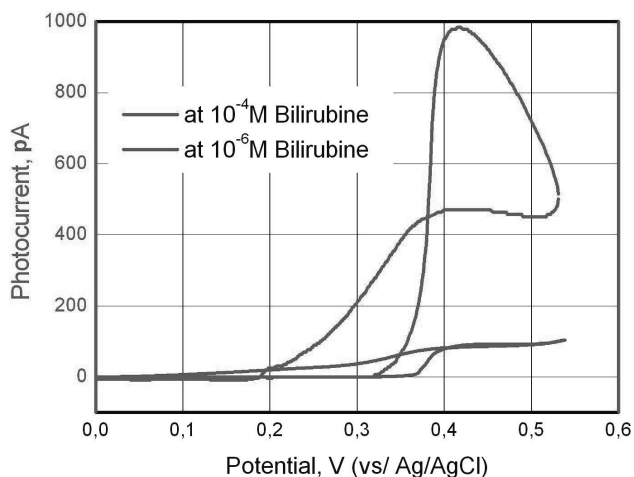


Рис. 4. Циклічна вольтамперограма та відповідна емісія ЕХЛ модельної аналітичної системи при додаванні білірубину (фосфатний буфер з рН=8,5 + 0,4мкМ білірубину + 0,1М NaClO₄ + 40мкМ Ru(bpy)₃Cl₂); V=100мВ/с

Висновки

У даній роботі вперше показана можливість високочутливої ЕХЛ-сенсорики білірубину на електроді, модифікованому АПП та запропонований відповідний механізм ЕХЛ-реакції. Беручи до уваги, що рівень білірубину за ядерної жовтухи складає 256 мкМ — для доношених немовлят і 171 мкМ — для недоношених немовлят, запропонований ЕХЛ-метод з межею визначення 5нМ адекватний для застосування в об'єктивній оцінці гіпербілірубінемії новонароджених. Крім того, низька межа виявлення (нМ) запропонованого методу дає можливість детектувати білірубін у дуже малих кількостях проби, що буває головною вимогою в деяких специфічних випадках при моніторингу рівня гіпербілірубінемії новонароджених, де виникає необхідність взяття дуже малої кількості зразка для аналізу.

Подяки

Робота виконана за підтримки наданої Українським науково-технологічним центром (проекти № № 4180, 4495 та 5067), керівник проєктів — проф. Рожицький М. М.

Література

1. Karp W. B. Biochemical Alterations in Neonatal Hyperbilirubinemia and Bilirubin Encephalopathy // *Pediatrics*. — 1979. — Vol. 64. — P.361–368.
2. Moyer V., Freese D. K., Whittington P. F., Olson A. D. et al. // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2004. — Vol.39. — P.115–128.
3. Johnson L., Blutani V. K. // *Clin. Perinatol.* — 1998. — Vol. 25. — P.555–560.
4. Fung Y. S., Sun D. X., Yeung C. Y. Capillary Electrophoresis for Determination of Free and Albumin-bound Bilirubin and the Investigation of Drug Interaction with Bilirubin-bound Albumin // *Electrophoresis*. — 2000. — Vol. 21. — P.403–410.
5. Nie Z., Fung Y. S. Microchip Capillary Electrophoresis for Frontal Analysis of Free Bilirubin and Study of Its Interaction with Human Serum Albumin // *Electrophoresis*. — 2008. — Vol.29. — P.1924–1931.
6. Brodersen R. Bilirubin Solubility and Interaction with Albumin and Phospholipid // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1979. — Vol. 254. — P. 2364–2369.
7. Norman J., Michelle M. Humans Bilirubin-Metal Ion Complexes // *Anal. Chem.* — 1974. — Vol 46. — P.926–929.
8. Wang C., Wang G., Fang B. Electrocatalytic oxidation of bilirubin at ferrocenecarboxamide modified MWCNT–gold nanocomposite electrodes // *Microchim Acta*. — 2009. — Vol.164. — P.113–118.
9. Zhuang Q., Dai H. — C., Liu H. Electrochemical Study on the Interaction of Bilirubin with Europium Ions in Aqueous Media // *Electroanalysis*. — 1999. — Vol.11. — No. 18. — P.1368–1371.
10. Koch T. R. Feasibility of Measuring Free and Total Bilirubin Electrochemically in Serum // *Clin. Chem.* — 1981. — Vol.27. — P.1295–1299.
11. Zeng B., Zhou X. Indirect Determination of Bilirubin by Linear Sweep Polarography // *Fresenius J Anal Chem.* — 1993. — Vol.347. — P.382–387.
12. Rubinstein I., Bard A. J. *J. Amer. Chem. Soc.* — 1981 — Vol. 103. — P. 512–516.
13. G. C. Fiaccabrino, M. Koudelka-Hep, Y. — T. Hsueh, S. D. Collins, R. L. Smith, *Anal. Chem.* — 1998. — Vol.70. — P.4157–4161.