

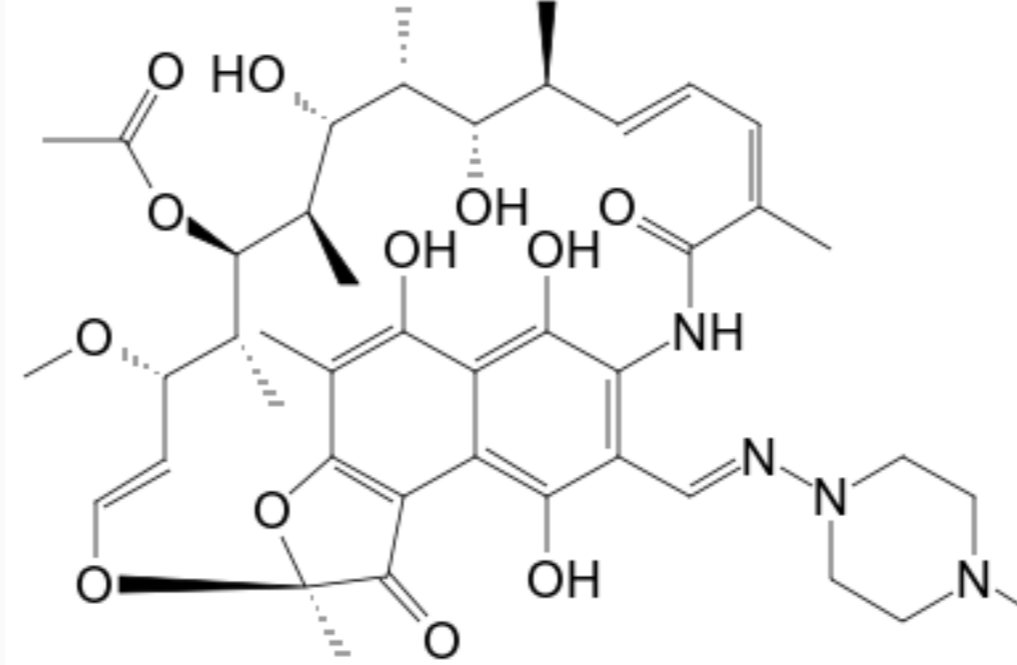
Zastosowanie elektrochemicznie aktywowanego czujnika sitodrukowanego w analizie ryfampicyny

Jędrzej Kozak, Katarzyna Tyszczyk-Rotko

Katedra Chemii Analitycznej, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wstęp

Ryfampicyna (RIF) ((3-[[[4-metylo-1-piperazylo]-imino]-metylo]-ryfamycyna) (rys. 1) jest półsyntetycznym antybiotykiem makrocyklicznym, który jest pochodną antybiotyków ryfamycynowych wytwarzanych w procesie fermentacji przeprowadzanej przez szczep *Streptomyces mediterranei*. Ryfampicyna jest antybiotykiem pierwszego rzutu wraz z izoniazydem, pirazynamidem, etambutolem i streptomycyną w leczeniu gruźlicy płuc i gruźlicy pozapłucnej i odgrywa wyjątkową rolę w zabijaniu częściowo uśpionych prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*). RIF jest również stosowana w leczeniu trądu oraz niektórych rodzajów zapalenia kości i szpiku, a także zapalenia wsierdzia. Działanie tego antybiotyku polega na hamowaniu zależnej od DNA polimerazy RNA w komórkach bakteryjnych, co skutkuje zahamowaniem ich wzrostu. Celem prezentowanych badań było opracowanie prostej i szybkiej woltamperometrycznej procedury do oznaczania RIF w próbkach moczu i wody. Należy zauważyć, że po raz pierwszy ryfampicynę oznaczano z wykorzystaniem czujnika sitodrukowanego.



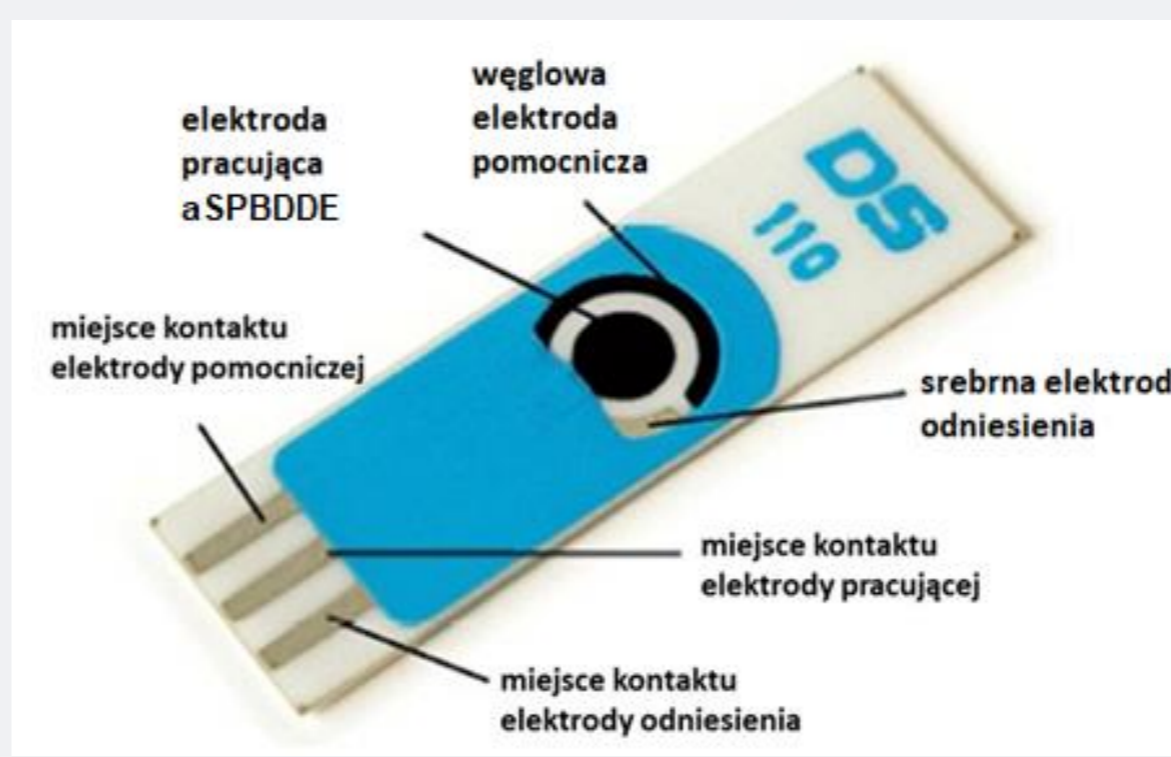
Rys. 1. Wzór strukturalny ryfampicyny

Część eksperymentalna

Oznaczanie RIF na elektrochemicznie aktywowanej sitodrukowanej elektrodzie diamentowej domieszkowanej borem (aSPBDDE)

Przed każdą serią pomiarów (po każdej zmianie roztworu w naczynku elektrochemicznym) SPBDDE był aktywowany elektrochemicznie. Aktywacja składała się z pięciu cykli woltamperometrycznych między 0 a 2 V przy szybkości skanowania 100 mV s⁻¹ w roztworze NaOH o stężeniu 0,1 mol L⁻¹. Po aktywacji czujnik (rys. 2) przepłukano wodą dejonizowaną i wykorzystano do oznaczania RIF.

W zoptymalizowanych warunkach analiza woltamperometryczna RIF została przeprowadzona w 0,1 mol L⁻¹ roztworze PBS o pH 3. Podczas mieszania przez 120 s (czas nagromadzenia) zastosowano potencjał nagromadzenia -0,45 V. Krzywe impulsowo-różnicowej adsorpcyjnej woltamperometrii strippingowej (DPAdSV) rejestrowano w zakresie potencjałów od -0,25 do 1 V przy amplitudzie 150 mV, szybkości skanowania 100 mV s⁻¹ i czasie modulacji 5 ms.

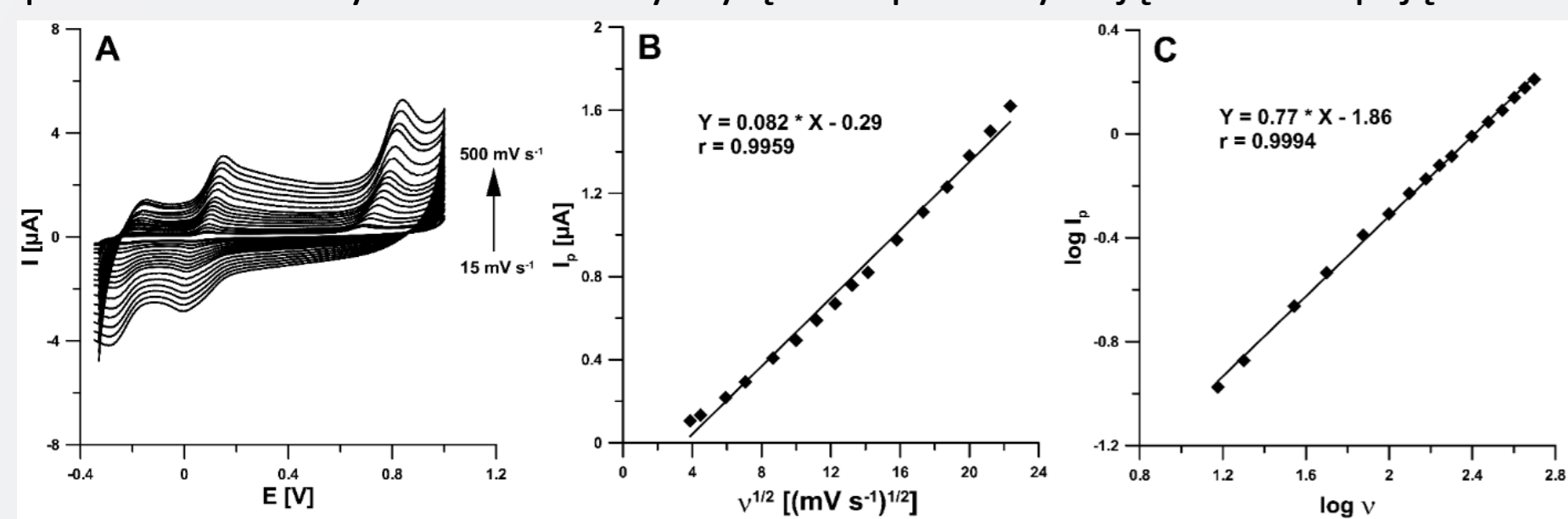


Rys. 2. Trójelektrodowy czujnik sitodrukowany (Metrohm, DropSens)

Wyniki

Proces elektrodowy

Charakter procesu elektrodowego zbadano za pomocą woltamperometrii cyklicznej, a zarejestrowane woltamperogramy przedstawiono na rys. 3A. Wykreślono zależność między natężeniem prądu piku RIF (I_p) i pierwiastkiem kwadratowym z szybkości skanowania ($v^{1/2}$). Jak pokazano na rys. 3B, zależność liniowa ($r = 0,9959$) sugeruje, że proces jest kontrolowany przez dyfuzję. Ponadto, wykreślono zależność między logarytmem natężenia prądu piku ($\log I_p$) i logarytmem z szybkości skanowania ($\log v$), Rys. 3C. Wartość nachylenia 0,77 zaobserwowana na wykresie tej zależności wskazuje, że proces ten nie był kontrolowany wyłącznie przez dyfuzję lub adsorpcję.



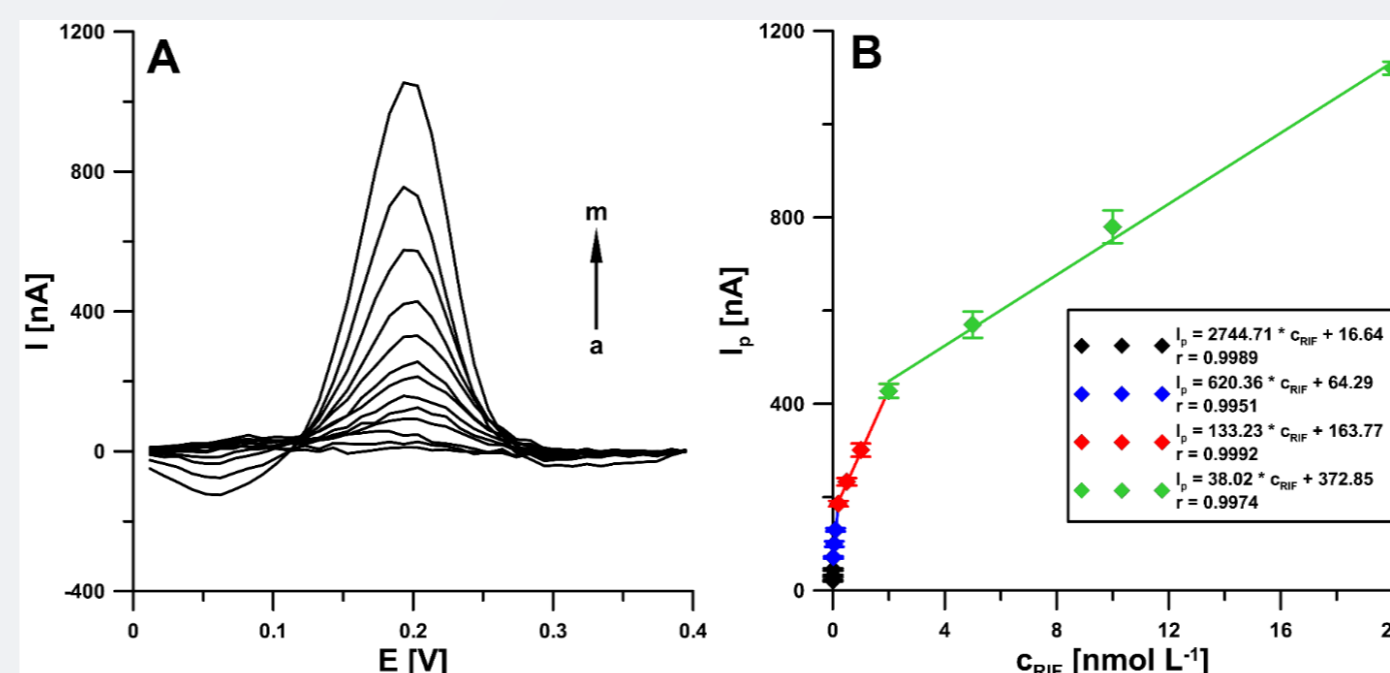
Rys. 3. A) Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane w 0,1 M roztworze PBS o pH 3 zawierającym 5×10^{-6} mol L⁻¹ RIF przy różnych szybkościach skanowania, B) Zależność pomiędzy I_p i $v^{1/2}$, C) zależność pomiędzy $\log I_p$ and $\log v$. Szybkość skanowania (v) 15 - 500 mV s⁻¹ [1].

Krzywa kalibracyjna

W zoptymalizowanych warunkach uzyskano krzywą kalibracyjną RIF, wyniki przedstawiono w Tabeli 1 i na Rysunku 4.

Tabela 1. Parametry krzywej kalibracyjnej.

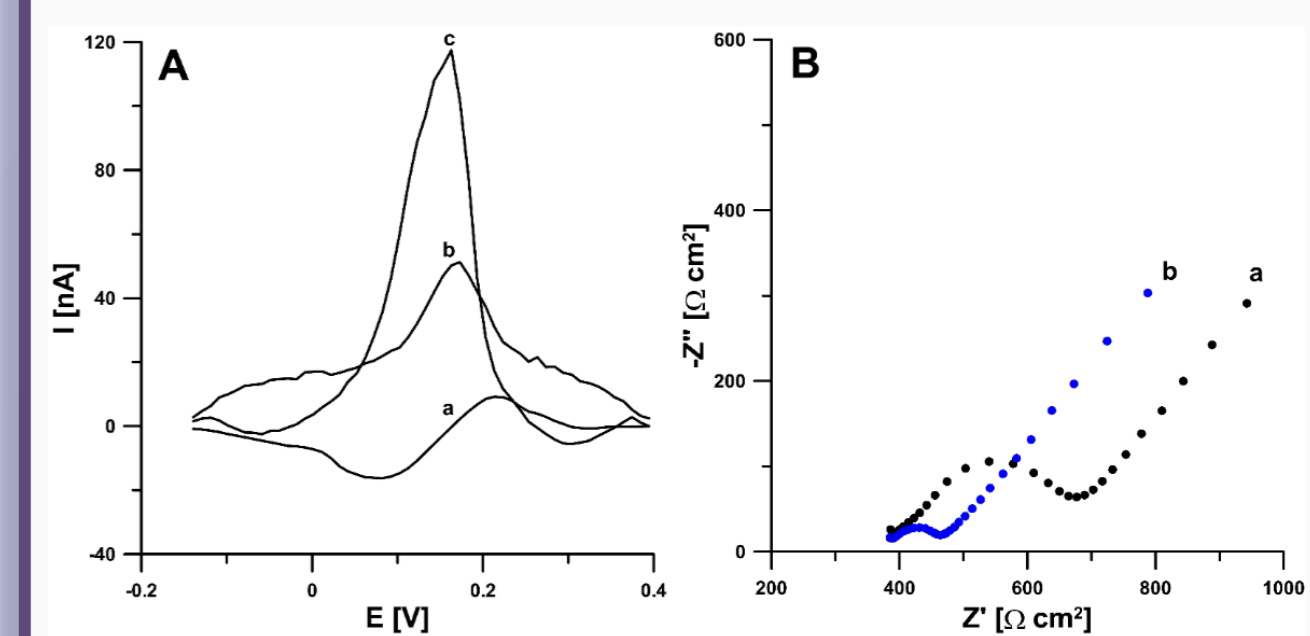
Zakresy liniowe	a) $2,0 \times 10^{-12} - 2,0 \times 10^{-11}$ mol L ⁻¹ b) $2,0 \times 10^{-11} - 2,0 \times 10^{-10}$ mol L ⁻¹ c) $2,0 \times 10^{-10} - 2,0 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹ d) $2,0 \times 10^{-9} - 2,0 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹
Granica wykrywalności (LOD)	$2,2 \times 10^{-13}$ mol L ⁻¹
Granica oznaczalności (LOQ)	$7,3 \times 10^{-13}$ mol L ⁻¹



Rys. 4. A) Krzywe DPAdSV i B) Zakresy liniowe krzywej kalibracyjnej RIF [1].

Wpływ elektrochemicznej aktywacji SPBDDE na sygnał analityczny RIF

Aktywacja może sfunkcjonalizować powierzchnię elektrody, zwiększyć powierzchnię aktywną lub usunąć zanieczyszczenia z powierzchni. Dlatego w pierwszym etapie badań zastosowano aktywację elektrochemiczną w dwóch różnych roztworach (0,1 M NaOH i 0,1 M bufor octanowy o pH 4 zawierający 10 mM H₂O₂). Badania wykazały, że elektrochemiczna aktywacja elektrody przyczynia się do znacznego wzrostu natężenia prądu piku RIF. Otrzymane sygnały pokazały, że aktywacja za pomocą NaOH była znacznie skuteczniejsza (Rysunek 5A). Ponadto, jak widać na rysunku 5B, elektrochemiczna aktywacja elektrody (krzywa niebieska) skutkuje znacznym obniżeniem oporu przenoszenia ładunku w porównaniu z elektrodą nieaktywowaną (krzywa czarna).



Rys. 5. A) Woltamperogramy 0,2 nM RIF w 0,1 M buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) o pH 7,5 uzyskane na nieaktywowanej sitodrukowanej elektrodzie diamentowej domieszkowanej borem (SPBDDE) (a), aktywowanej elektrochemicznie w 0,1 M buforze octanowym pH 4,0 zawierającym 10 mM H₂O₂ SPBDDE (b) i aktywowanej elektrochemicznie w 0,1 M NaOH SPBDDE (c). B) Wykresy Nyquista dla SPBDDE (a) i aSPBDDE (b) [1].

Zastosowanie

W celu sprawdzenia użyteczności opracowanej procedury oznaczania RIF z wykorzystaniem aSPBDDE, przeprowadzono analizę próbek moczu bydlęcego i wody z rzeki Bystrzyca. Pomiar wykonano metodą woltamperometryczną (DPAdSV) i chromatograficzną (HPLC/PDA). Wyniki przedstawiono w Tabeli 2. Uzyskane wyniki potwierdzają użyteczność przedstawionej procedury do oznaczania RIF w wodzie rzecznej i moczu bydlęcym.

Tabela 2. Wyniki oznaczania RIF w próbkach wody rzecznej i moczu bydlęcego. przy użyciu impulsowo-różnicowej adsorpcyjnej woltamperometrii strippingowej (DPAdSV) i chromatografii (HPLC/PDA) [1].

Próbka	Stężenie RIF [mol L ⁻¹]				Odzysk (%)		Błąd względny (%)
	Dodano	Oznaczono DPAdSV	Stężenie RIF w naczynku elektrochemicznym	Oznaczono HPLC/PDA	DPAdSV		
Rzeka Bystrzyca	$1,0 \times 10^{-9}$	$9,73 \times 10^{-10}$	$9,73 \times 10^{-11}$	<LOD	97,3	-	
	$5,0 \times 10^{-8}$	$4,57 \times 10^{-8}$	$4,57 \times 10^{-9}$	$4,71 \times 10^{-8}$	91,4	3,0	
Mocz bydlęcy	$1,0 \times 10^{-6}$	$9,20 \times 10^{-7}$	$9,20 \times 10^{-11}$	<LOD	92,0	-	
	$5,0 \times 10^{-5}$	$4,93 \times 10^{-5}$	$4,93 \times 10^{-9}$	$4,76 \times 10^{-5}$	98,6	3,6	

Wnioski

- Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że opracowana woltamperometryczna procedura pozwala na oznaczenie RIF na elektrochemicznie aktywowanej sitodrukowanej elektrodzie diamentowej domieszkowanej borem w szerokim zakresie stężeń, od $2,0 \times 10^{-12}$ do $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.
- Aktywacja elektrochemiczna powierzchni elektrody za pomocą woltamperometrii cyklicznej spowodowała zmniejszenie oporu przenoszenia ładunku, co przełożyło się na znaczący wzrost natężenia prądu piku RIF.
- Otrzymane wyniki potwierdzają użyteczność przedstawionej procedury do oznaczania RIF w wodzie rzecznej i moczu.