

14. Дьячковский Ф.С., Ерицян М.Л., Каширенинов О.Е., Матиска Б., Мах К., Швестка М., Шилов А.Е. Исследование природы активных центров в каталитических системах  $TiCl_4+AlR_3Cl$  // Высокомолярные соединения. – 1969. – Т. А9. – № 3. – С. 543–547.
15. Мананкова А.А., Бондалетов В.Г., Белоусова А.С., Ляпков А.А. Исследование стадии дезактивации тетрахлорида титана в процессе получения нефтеполимерных смол // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4. – С. 271–274.
16. Aoshima S., Kanaoka S. A Renaissance in Living Cationic Polymerization // Chem. Rev. – 2009. – V. 109. – P. 5245–5287.

Поступила 15.01.2013 г.

УДК 543.552.054.1

## КОНТРОЛЬ ХРОМА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ МЕТОДОМ АДсорбЦИОННОЙ КАТОДНОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

Г.Б. Слепченко, В.М. Пичугина, Е.Г. Черемпей, Т.И. Шукина

Томский политехнический университет  
E-mail: microlab@tpu.ru

*Выбраны условия вольтамперометрического определения хрома шестивалентного на графитовых электродах с использованием дифенилкарбазида методом адсорбционной катодной вольтамперометрии. Разработана и метрологически аттестована вольтамперометрическая методика контроля опухолевых клеток на содержание хрома шестивалентного.*

### Ключевые слова:

*Вольтамперометрия, хром, биологические объекты, пробоподготовка, электрод, методика, метрологические характеристики.*

### Key words:

*Voltammetry, chromium, biological objects, probes pretreatment, electrode, procedure, metrological characteristics.*

Хром участвует в регуляции углеводного, жирового обмена, важен для ферментного и гормонального обмена в организме, деятельности сердечной мышцы, сосудов. Наличие этого элемента помогает человеку преодолеть стресс, регулирует уровень сахара в крови. Нехватка хрома нередко является причиной ухудшения толерантности к глюкозе, избыточного веса, способствует быстрой утомляемости, появлению бессонницы. При избыточном поступлении в организм хром, особенно шестивалентный, может оказывать канцерогенный и аллергизирующий эффекты, предрасполагает к более частому развитию гастритов, гепатитов, астено-невротических расстройств [1].

В литературе микроколичества хрома определяют несколькими инструментальными физико-химическими методами: проточно-инжекционные методы, атомно-абсорбционная спектрометрия, электрохимические методы и т. д. [2–5].

Среди электрохимических методов наиболее чувствительным является метод адсорбционной катодной вольтамперометрии (АКВА). Широко распространен способ накопления хрома в виде адсорбированного комплекса с органическими лигандами (диэтилтриаминпентауксусная кислота, 1,5-дифенилкарбогидразид и др.) [6, 7]. Также используется метод адсорбционного вольтамперометрического определения хрома с купфером [8].

Купферон – аммонийная соль нитрозофенилгидроксиламина. Применяется в аналитической химии для осаждения ионов различных металлов. Метод дает более высокую чувствительность, чем предыдущие адсорбционные методики для хрома.

Он основан на эффективном концентрировании комплекса хром–купферон на электроде типа висящей ртутной капли и каталитическом восстановлении адсорбированного комплекса. Это дает предел обнаружения  $1,0 \text{ нг/дм}^3$ . Для достижения высокой чувствительности, как правило, в качестве индикаторного применяется ртутьсодержащий электрод, что существенно ограничивает применение данного способа измерения хрома.

Поэтому целью исследований являлся выбор индикаторного нетоксичного электрода на основе углеродсодержащих материалов, а также вольтамперометрических условий для определения хрома шестивалентного и разработка методики его определения в опухолевых клетках.

### Экспериментальная часть

Используемые реактивы были квалификации «х. ч.» или «ос. ч.». Воду перегоняли дважды, с добавлением перманганата калия и серной кислоты. Рабочие растворы с концентрациями 10,0 и 1,0 мг/дм<sup>3</sup> готовили из ГСО состава раствора ионов хрома.

Измерение сигналов методом вольтамперометрии проводили с использованием комплекса аналитического вольтамперометрического СТА (ООО «ИТМ», г. Томск, Россия). Использовали рабочие электроды – сажевые на основе сажи из электропроводящей пластмассы; графитовые с использованием спектрального графита; стеклоуглеродные (СУЭ) и пропитанные эпоксицидной смолой графитовые (ГЭ). Электрод сравнения – хлоридсеребряный в  $1,0 \text{ моль/дм}^3 \text{ KCl}$  (ХСЭ).

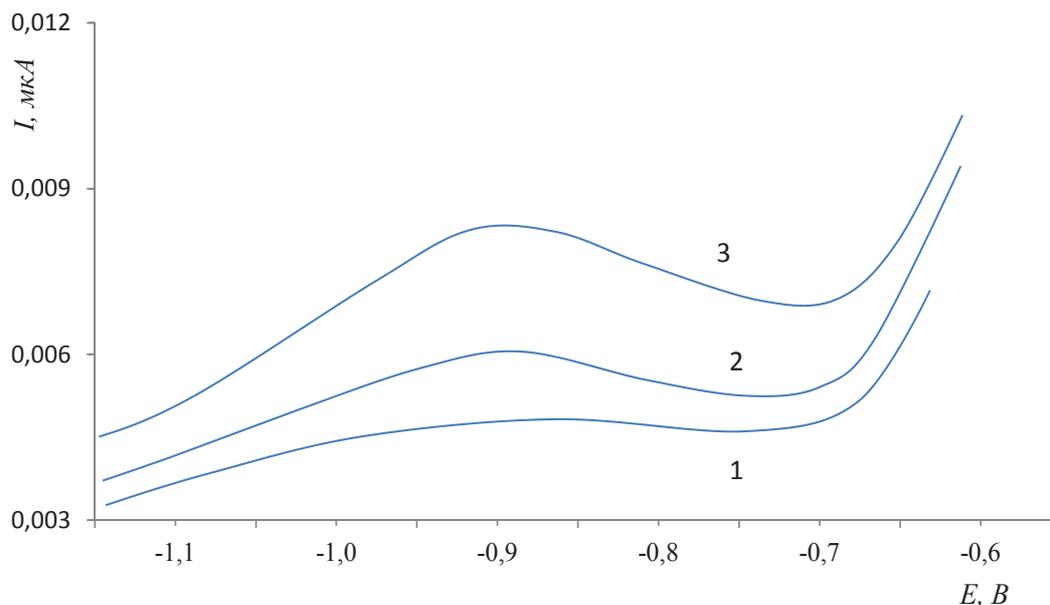


Рис. 1. Вольтамперные кривые на СУ: 1 – фон: 0,05 моль/дм<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>+SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>; 2 – фон + C(Cr(VI))=0,005 мг/дм<sup>3</sup>; 3 – фон + C(Cr(VI))=0,01 мг/дм<sup>3</sup>

Пробоподготовку – минерализацию проб – проводили с использованием комплекса пробоподготовки «Темос-Экспресс» (ООО «ИТМ», г. Томск, Россия).

Нами проведены исследования основных способов определения хрома шестивалентного с использованием адсорбционной катодной вольтамперометрии на органических лигандах – дифенилкарбазида и купферона.

Методика работы заключалась в следующем: в кварцевый стаканчик помещали фоновый электролит (0,05 моль/дм<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>), 0,05 г сульфата натрия для удаления кислорода и 0,2 см<sup>3</sup> купферона концентрации 1·10<sup>-2</sup> моль/дм<sup>3</sup> либо 2·10<sup>-4</sup> моль/дм<sup>3</sup> дифенилкарбазида. Снимали фоновую вольтамперную кривую. Затем добавляли 0,05 см<sup>3</sup> аттестованного раствора ионов хрома шестивалентного концентрации 1,0 мг/дм<sup>3</sup> и проводили снятие вольтамперной зависимости.

На сажемом электроде не удалось получить сигнал восстановления ни купферона, ни дифенилкарбазида, ни хрома в связи с тем, что процесса адсорбции на поверхности графита не происходило. На графитовом мягком электроде были получены только катодные пики купферона и хрома. Данные сигналы не изменялись от их добавок, что связано с заполнением поверхности и трудностью очистки электрода. Также в качестве рабочего был предложен стеклоуглеродный электрод в виде стержня. На данном электроде были получены пики купферона и адсорбированного комплекса, растущие от концентрации добавленного хрома (VI).

Аналогичные результаты были получены и при использовании дифенилкарбазида.

Недостатком данного электрода является достаточно большая поверхность, и единственный ме-

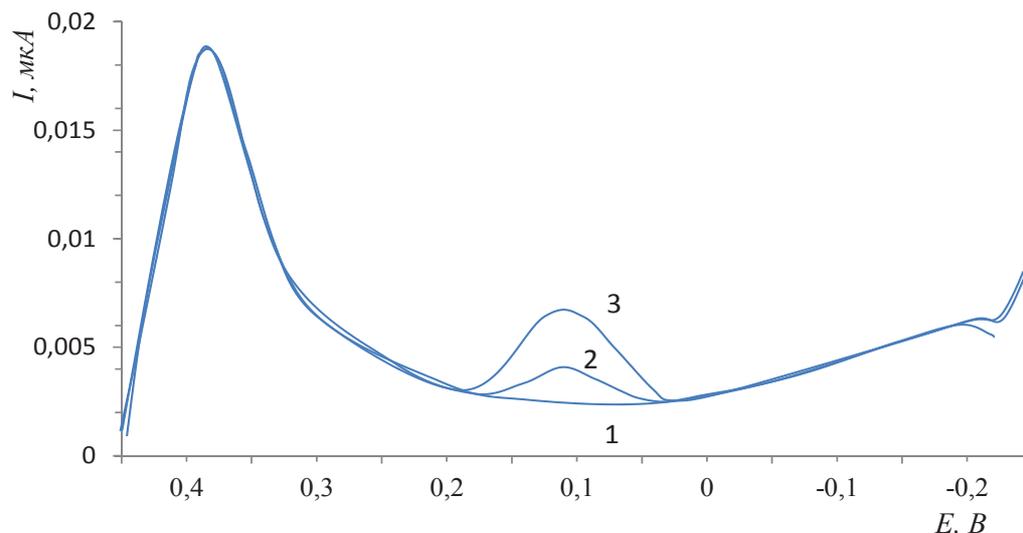
тод очистки, который здесь можно применить, – это механическая чистка электрода фильтровальной бумагой после снятия каждой вольтамперной кривой. Данный метод очистки приводит к нестабильным и постоянно изменяющимся высотам пиков. Вследствие этого дальнейшие исследования на этом электроде прекращены.

Нами проведены исследования по выбору условий определения хрома шестивалентного на пропитанном графитовом электроде с использованием дифенилкарбазида. Электрод изготавливали из пропитанного эпоксидной смолой графитового стержня с диаметром рабочей поверхности 3...5 мм. Перед работой электрод шлифовали на фильтровальной бумаге.

Из рис. 2 видно, что разрешающая способность определения хрома и градуировочная зависимость удовлетворяют требованиям методики его измерения на уровне 0,005 мг/кг.

Таким образом, для определения хрома нами был выбран нетоксичный индикаторный электрод – пропитанный графитовый. Условия его определения даны в табл. 1.

Нами было сделано предположение, что дифенилкарбазид образует схожий комплекс с другим металлом. Одним из распространенных металлов, как примесь в реактивах, воде и т. д., является медь. Опыт проводили аналогично опыту с хромом, только вместо хрома добавляли 0,05 см<sup>3</sup> раствора меди (2+) из 0,1 мг/дм<sup>3</sup>. Сигнал комплекса от добавок меди (0,05 см<sup>3</sup>) не наблюдался. Также в ходе исследований установлено, что регистрация аналитических сигналов Cr<sup>6+</sup> в присутствии Pb<sup>2+</sup> допустима с погрешностью 15 % с его избытком в 400 раз. Определению Cr<sup>6+</sup> не мешает 100-кратный избыток следующих элементов: As, Cd и Fe.



**Рис. 2.** Вольтамперная зависимость системы хром-дифенилкарбазид на ГЭ: 1 – фон 0,15 моль/дм<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, C<sub>дифенилкарб.</sub> = 4·10<sup>-5</sup> моль/дм<sup>3</sup>; 2 – фон + C(Cr(VI))=0,005 мг/дм<sup>3</sup>; 3 – фон + C(Cr(VI))=0,01 мг/дм<sup>3</sup>

**Таблица 1.** Задаваемые режимы работы прибора при определении массовой концентрации хрома в пробах опухолевых клеток методом инверсионной вольтамперометрии

Параметры измерения	Показатели
Система измерений	двухэлектродная
Электроды: – рабочий; – сравнения	ГЭ ХСЭ
Развертка	катодная
Режим регистрации вольтамперограмм	дифференциально-импульсный
Поляризующее напряжение для электро-накопления, В	0,35
Потенциал начала регистрации вольтамперной кривой, В	0,35
Конечное напряжение развертки, В	-0,2
Потенциал очистки электрода, В	-0,2
Время очистки электрода, с	20
Скорость линейного изменения потенциала, мВ/с	30
Время электролиза, с	60
Потенциал аналитического пика, В (ориентировочное значение)	0,1
Фоновый электролит	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,15 моль/дм <sup>3</sup> + дифенилкарбазид 4·10 <sup>-5</sup> моль/дм <sup>3</sup>

**Методика анализа опухолевых клеток на содержание хрома**

Подготовленные для анализа пробы анализируемого объекта массой 0,003...2,000 г, взятые с точностью до 0,0002 г, помещают в кварцевые стаканчики вместимостью 20...25 см<sup>3</sup>, добавляют 2...4 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и 0,5 см<sup>3</sup> пероксида водорода концентрации 30 %. Стаканчики с пробами помещают в комплекс пробоподготовки «Темос-Экспресс».

Температуру повышают до 120...130 °С, раствор упаривают до объема примерно 0,5 см<sup>3</sup>. В каждый стаканчик добавляют по 2,0 см<sup>3</sup> перегнанной азотной кислоты, по 1,0 см<sup>3</sup> пероксида водорода и снова упаривают (до объема ≈ 0,5 см<sup>3</sup>). Эту обработку повторяют еще 3...5 раз, последний раз упаривая досуха.

Стаканчики с остатком помещают в комплекс пробоподготовки «Темос-Экспресс», предварительно нагретый до 450±15 °С и прокаливают в течение 10 мин. Если после первого прокаливания в осадке присутствуют несгоревшие частицы, то осадок в каждом стаканчике снова обрабатывают смесью азотной кислоты и пероксида водорода, как указано выше, а затем прокаливают в комплексе пробоподготовки «Темос-Экспресс» в течение 5 мин. Обработку пробы смесью азотной кислоты и пероксида водорода с последующим прокаливанием повторяют до получения золы белого, серого или рыжеватого цвета (без черных угольных включений).

Стаканчики с полученной золой охлаждают до комнатной температуры. В каждый из них добавляют по 0,5 см<sup>3</sup> серной кислоты концентрации 3 моль/дм<sup>3</sup>, 8,0 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и 1,5 см<sup>3</sup> раствора надсернистого аммония массовой концентрации 0,1 %. Снова помещают стаканчики на 20 мин в разогретый до температуры 170 °С комплекс «Темос-Экспресс». Затем стаканчики вынимают, охлаждают до комнатной температуры, добавляют в каждый стаканчик с пробой бидистиллированной воды до объема 10,0 см<sup>3</sup> и по 0,2 см<sup>3</sup> раствора дифенилкарбазида концентрации 2·10<sup>-4</sup> моль/дм<sup>3</sup>. Выдерживают стаканчики 15 мин. Проба готова для выполнения измерений.

При разработке методики нами проведены анализы проб опухолевых клеток.

В табл. 2 приведены результаты проведенных измерений и проверка правильности методом «введено-найдено».

**Таблица 2.** Обобщение результатов анализа проб опухолевых клеток на содержание хрома шестивалентного методом инверсионной вольтамперометрии ( $n=24$ ,  $P=0,95$ )

Номер серии	Анализируемая проба	Содержание ионов хрома шестивалентного, мг/кг	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг
1	Клетки (образец № 1)	0,0070±0,0028	0,015	0,017±0,007
2	Клетки (образец № 2)	Менее 0,0050	0,070	0,067±0,027
3	Клетки (образец № 3)	Менее 0,0050	0,200	0,190±0,070
4	Клетки (образец № 4)	Менее 0,0050	1,500	1,430±0,570
5	Клетки (образец № 5)	2,1600±0,8600	2,500	4,570±1,830

Для доказательства правильности проведенных расчетов и сравнения рассчитанных по уравнениям и экспериментально определенных значений характеристик погрешности и ее составляющих, а также для практического использования проведен расчет приписанных характеристик погрешности и ее составляющих по выведенным уравнениям для ряда значений концентраций хрома в пробе.

Для всего диапазона выбраны максимальные значения (из экспериментально оцененных значений) для определения приписанных характеристик. Полученные результаты представлены в свидетельстве об аттестации методики в виде табл. 3.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Преображенский В.Н., Ушаков И.Б., Лядов К.В. Активационная терапия в системе медицинской реабилитации лиц опасных профессий. – М.: Паритет Граф, 2000. – 320 с.
2. Маркова И.В. Кулонометрическое определение хрома (VI) и меди (II) при их совместном присутствии // Журнал аналитической химии. – 2001. – Т. 56. – № 9. – С. 971–975.
3. Фицев И.М. Проточно-инжекционное определение хрома по каталитическому току гидроксилamina // Журнал аналитической химии. – 1998. – Т. 53. – № 2. – С. 128–130.
4. Najafi N, Mashkouri. Cr (VI)/Cr (III) speciation by in situ electro-deposition onto tube prior to electrothermal atomic absorption spectrometry // J. Sci. Islam. Rep. Iran. – 2002. – V. 13. – № 2. – P. 125–130.
5. Дедкова В.П., Швеева О.П., Савин С.Б. Тест-метод определения Cu (II), Ni (II), Cr (VI) из одной пробы // Журнал аналитической химии. – 2001. – Т. 56. – № 8. – С. 851–855.

**Таблица 3.** Диапазоны измерений, относительные значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости методики при доверительной вероятности  $P=0,95$

Определяемый элемент	Диапазон концентраций, мг/кг	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r(\delta)$ , %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_R(\delta)$ , %	Показатель точности (границы, в которых находится погрешность методики), $\delta$ , %
Хром	От 0,005 до 5,000 включ.	8	15	40

#### Выводы

В результате проведенных исследований в качестве индикаторного был выбран нетоксичный графитовый электрод и вольтамперометрические условия определения хрома шестивалентного с использованием дифенилкарбазида методом АКВА. Разработана методика количественного химического анализа проб опухолевых клеток на содержание хрома шестивалентного инверсионно-вольтамперометрическим методом и проведена ее метрологическая аттестация. Методика предназначена для использования в химических лабораториях организаций, предприятий и служб. Диапазон определяемых содержаний хрома составляет от 0,005 до 5,000 мг/кг.

*Работа выполнена в рамках государственного задания «Наука» по теме 3.2816.2011.*

6. Jorge E.O., Rocha M.M., Fonseca I.T.E., Neto M.M.M. Studies on the stripping voltammetric determination and speciation of chromium at a rotating-disc bismuth film electrode // Talanta. – 2010. – V. 81. – № 1–2. – P. 556–564.
7. Малахова Н.А., Чернышева А.В., Брайнина Х.З. Инверсионная вольтамперометрия хрома с дифенилкарбазидом // Журнал аналитической химии. – 1987. – Т. 42. – № 9. – С. 1636–1640.
8. Wang J., Lu J., Olsen K. Measurements of Ultratrace Level of Chromium by Absorptive – Catalytic Stripping Voltammetry in the Presence of Cupferron // J. Analyst. – 1992. – V. 117. – P. 1913–1917.

Поступила 19.02.2013 г.