

С. В. Терентьева, Е. М. Матолыгина, В. Д. Аптекарь,  
А. М. Гусакова, Е. А. Ивановская, А. Т. Тепляков

## РАЗРАБОТКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНСУЛИНА В КРОВИ

Томский НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН

Сахарный диабет — заболевание, в основе которого лежит абсолютная или относительная недостаточность инсулина в организме, вызывающая нарушение обмена веществ, главным образом углеводного [1].

По данным Всемирной Организации Здравоохранения ежегодно число больных увеличивается на 5–7 %, а каждые 12–15 лет удваивается, поэтому в настоящее время данное заболевание приняло характер пандемии.

Это определяет важность своевременного контроля уровня инсулина в крови, причём для объективного суждения о концентрации данного гормона необходимо создание экспресс-методики, что и явилось целью нашей работы.

Весьма перспективным является современный электрохимический метод вольтамперометрии при определении электрохимически активных лекарственных и токсичных веществ, а также их метаболитов в биологических матрицах, причём абсолютная чувствительность данного метода составляет  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  мг/л.

### Экспериментальная часть

Экспериментальные данные были получены на полуавтоматическом анализаторе ТА-2 (НПП “Техноаналит”, г. Томск) с программным обеспечением в комплекте с IBM-совместимым компьютером PENTIUM и монитором Hyundai. Источником информации служили поляризационные кривые.

Стандартный раствор инсулина готовили из субстанции инсулина 26,8 МЕ/мг производства ICN Biomedical USA (США) методом сухой навески. В работе были использованы электроды: ртутно-пленочный — в качестве индикаторного и хлор-серебряный — в качестве электрода сравнения.

В эксперименте использовали кварцевую посуду. Фоновым электролитом служил 0,01 М раствор калия хлорида, подкисленный винной кислотой до pH = 3,

приготовленный из реактивов квалификации х.ч. с использованием воды бидистиллированной.

В работе были задействованы одноканальные дозаторы на 0,01; 0,05; 0,10; 1,00; 10,00 мл (Finnpipette, Финляндия) со сменными наконечниками.

При построении сахарной кривой глюкозу в крови определяли электрохимическим методом с помощью ион-селективных электродов на приборе “STAT PROFILE 5” (Nova Biomedical, США).

Каждое из приведенных цифровых значений является средним из трех – пяти измерений.

### Результаты и их обсуждение

Из электрохимических методов на сегодняшний день известен метод определения комплекса цинк – инсулин по иону цинка на ртутном каплюющем электроде [3], но в основу данной работы была положена разработанная нами вольтамперометрическая методика определения инсулина в стандартных растворах по органической части молекулы [4], погрешность которой составляет не более 2,5 % (табл. 1).

Важный этап при перенесении электрохимической методики, разработанной в модельных смесях, на биологические объекты – выявление сигнала вещества на вольтамперограмме в присутствии выбранного биологического объекта. При внесении в электрохимическую ячейку 0,02 мл сыворотки крови и измерении величины силы тока в нулевой точке с последующим прибавлением раствора стандартного образца а инсулина с концентрацией  $1 \cdot 10^{-4}$  мг/л порциями по 0,01 мл и параллельным измерением силы тока в ячейке было установлено, что и в присутствии биологического объекта для инсулина сохраняется прямолинейная зависимость силы тока от концентрации вещества в электролитической ячейке.

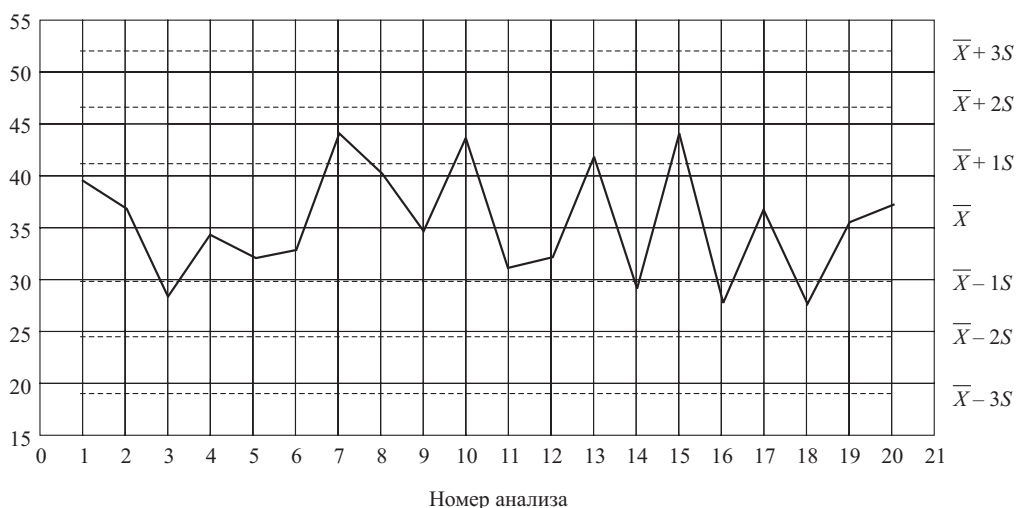
С целью возможного усиления сигнала были исследованы варианты отбора проб крови в присутствии гепарина, натрия цитрата и динатриевой соли этиленди-

Таблица 1

Метрологические характеристики разработанной методики ( $f$ , число степеней свободы, — 19;  $P$ , доверительная вероятность, — 95 %;  $t$  ( $P$ ;  $S$ ), критерий Стьюдента (табл.), — 2,13)

№ п/п	Истинное значение измеряемой величины, мг/л $\mu$	Средние выборки, $\bar{X} \cdot 10^{-4}$	Дисперсия, $S^2 \cdot 10^{-12}$	Стандартное отклонение, $S \cdot 10^{-6}$	Полуширина доверительного интервала, величина, $\Delta X \cdot 10^{-6}$	Относительная погрешность отдельной варианты, $\varepsilon$ , %	Относительная погрешность среднего результата, $\bar{\varepsilon}$ , %	Коэффициент Стьюдента, полученный расчетным путем, $t_{\text{выч}}$
1	$1 \cdot 10^{-4}$	0,991	1,057	1,028	2,189	2,22	0,49	1,77
2	$1 \cdot 10^{-5}$	0,0993	0,0789	0,0888	0,1891	1,91	0,43	1,39

Концентрация инсулина в крови, пмоль/л



Контрольная карта определения инсулина в нормальной (непатологической) сыворотке крови. Основные параметры определения: среднее содержание инсулина в крови ( $\bar{X}$ ) — 35,61 пмоль/л, значение среднеквадратического отклонения ( $S$ ) — 5,51. Контрольные пределы:  $\bar{X} - 3S = 19,08$ ;  $\bar{X} - 2S = 24,59$ ;  $\bar{X} - 1S = 30,10$ ;  $\bar{X} + 1S = 41,12$ ;  $\bar{X} + 2S = 46,63$ ;  $\bar{X} + 3S = 52,14$  пмоль/л.

аминтетрауксусной кислоты (Трилон Б) [5]. Однако в присутствии гепарина не наблюдалось воспроизводимости результатов, тогда как наличие в исследуемых образцах натрия цитрата или Трилона Б приводило к исчезновению сигнала инсулина на полярографической кривой, что, вероятно, обусловлено сдвигом рН в щелочную сторону.

Для выявления контрольных пределов и коэффициента вариации методики был проведен анализ двадцати образцов нормальной (непатологической) сыворотки крови (содержание глюкозы 4,8 ммоль/л) с составлением контрольной карты (рисунок) и последующей оценкой систематической погрешности и общей воспроизводимости результатов (табл. 2).

По результатам анализа были рассчитаны: величина среднего значения ( $\bar{X}$ ), дисперсия ( $S^2$ ), величина среднеквадратичного отклонения ( $S$ ) и коэффициент вариации ( $CV$ ), который составил 15,47 %.

Затем были рассчитаны контрольные пределы:  $\bar{X} \pm 1S$ ,  $\bar{X} \pm 2S$ ,  $\bar{X} \pm 3S$ . В ряду полученных результатов не было ни одного из двадцати значений, выходящих за пределы  $\bar{X} \pm 3S$ , что свидетельствует о достоверности результатов [6].

Для проверки правильности разработанной вольт-амперометрической методики определения инсулина в крови был проведен независимый параллельный контроль полученных нами результатов в сравнении с другим методом. Для этого был использован метод построения сахарной кривой, так как данный тест отражает биологическую активность инсулина и является наиболее часто используемым в клинических лабораториях.

В исследовании приняли участие десять человек: девять мужчин в возрасте от 38 до 69 лет и одна женщина в возрасте 44 лет. У одного из мужчин был поставлен диагноз гипертонической болезни второй стадии (пациент Л., 38 л.), а у остальных — ишемической болезни сердца. Женщина была здорова.

У обследуемых брали венозную кровь в течение 3,0 ч через каждые 30 мин. Первую пробу крови отбирали натощак. Затем пациенты одновременно принимали по 75 г глюкозы в 200 – 250 мл воды (сахарная нагрузка) и через 30 мин вновь проводили забор крови [5].

Таблица 2  
Данные статистической обработки результатов анализа контрольной сыворотки крови

№ п/п	Содержание инсулина в сыворотке крови, пмоль/л	$ X_i - \bar{X} $	$ X_i - \bar{X} ^2$
1	39,41	3,80	14,44
2	36,97	1,36	1,85
3	28,25	7,36	54,17
4	34,53	1,08	1,17
5	32,09	3,52	12,39
6	32,96	2,65	7,02
7	44,30	8,69	75,52
8	40,29	4,68	21,90
9	34,71	0,90	0,81
10	43,60	7,99	63,84
11	31,22	4,39	19,27
12	32,09	3,52	12,39
13	42,20	6,59	43,43
14	29,12	6,49	42,12
15	44,47	8,86	78,50
16	27,73	7,88	62,09
17	36,97	1,36	1,85
18	27,90	7,71	59,44
19	35,93	0,32	0,10
20	37,50	1,89	3,57
$\Sigma$	712,24	...	575,87

Примечание: Расчет основных параметров:  $\bar{X} = \frac{712,24}{20} = 35,61$ ;

$$S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{575,87}{19} = 30,31; S = \sqrt{S^2} = \sqrt{30,31} = 5,51;$$

$$CV = S/\bar{X} \cdot 100\% = 5,51/35,61 \cdot 100\% = 15,47\%.$$

Результаты параллельного определения глюкозы и инсулина в десяти образцах сыворотки крови

№ п/п	Образцы исследуемой сыворотки	Параметры	Время, мин						
			0	30	60	90	120	150	180
1	Пациент А., 56 лет	Глюкоза, ммоль/л	8,1	11,4	11,2	9,2	8,0	6,8	6,8
		Инсулин, пмоль/л	19,0	153,1	120,9	91,2	72,0	59,8	52,7
2	Пациент Б., 52 лет	Глюкоза, ммоль/л	6,1	9,9	9,2	7,8	5,1	4,9	4,8
		Инсулин, пмоль/л	75,9	211,0	90,2	74,5	59,1	55,9	44,1
3	Пациент В., 69 лет	Глюкоза, ммоль/л	5,5	7,6	12,2	9,9	4,3	3,7	4,5
		Инсулин, пмоль/л	46,9	132,0	172,7	135,5	114,1	110,6	45,7
4	Пациент Г., 68 лет	Глюкоза, ммоль/л	6,1	7,4	9,9	11,0	8,0	6,6	5,4
		Инсулин, пмоль/л	23,1	207,5	252,9	258,1	204,0	137,2	39,4
5	Пациент Д., 55 лет	Глюкоза, ммоль/л	5,4	8,6	10,5	8,0	6,7	3,9	3,4
		Инсулин, пмоль/л	21,6	313,9	119,3	87,7	84,1	60,5	23,7
6	Пациент Л., 38 лет	Глюкоза, ммоль/л	5,1	6,8	6,9	6,8	6,1	4,4	4,1
		Инсулин, пмоль/л	52,8	516,2	326,1	64,4	55,5	47,8	46,2
7	Пациент О., 51 лет	Глюкоза, ммоль/л	6,3	6,8	9,3	8,0	7,3	5,2	4,8
		Инсулин, пмоль/л	218,0	331,4	694,1	354,0	261,6	242,4	214,5
8	Пациент Р., 44 лет	Глюкоза, ммоль/л	5,3	6,6	6,3	6,1	4,8	4,7	5,2
		Инсулин, пмоль/л	84,2	155,4	152,8	125,2	112,0	76,4	63,7
9	Пациент Р., 56 лет	Глюкоза, ммоль/л	6,0	9,1	11,7	10,5	10,0	6,2	4,1
		Инсулин, пмоль/л	49,7	169,3	320,9	212,8	166,8	83,7	62,1
10	Пациент Х., 54 лет	Глюкоза, ммоль/л	5,5	7,2	9,8	8,2	8,9	7,9	5,4
		Инсулин, пмоль/л	33,0	204,1	235,4	150,2	88,6	83,5	58,6

Методика определения инсулина в крови на приборе ТА-2 состояла из следующих стадий:

1. Из программного обеспечения вольтамперометрического анализатора открывали приложение, обозначенное нами как “Инсулин”.

2. В электролитические ячейки объемом 20 мл помещали по 10 мл фонового электролита и запускали программу электролиза, которая заключалась в предварительном перемешивании и деаэрации раствора газообразным азотом с содержанием кислорода не более 0,001 % в течение 150 с, с последующим получением вольтамперограммы при линейной развертке потенциала от 0,2 до (-1,3) В и одновременным отображением линии фона на экране монитора.

3. К фоновому электролиту добавляли по 0,005 мл исследуемого образца сыворотки крови, запускали программу электролиза для получения вольтамперограммы, соответствующей пробе, и измеряли высоту сигнала инсулина (мкА) с максимумом при (-0,9) В.

4. В электролитическую ячейку помещали 0,02 мл внутреннего стандарта раствора инсулина  $10^{-4}$  мг/л и в результате электролиза получали вольтамперограмму, соответствующую пробе с добавкой.

5. Программное обеспечение прибора автоматически производило расчет результатов. Время единичного анализа составляло не более 11 мин.

Затем на основании полученных данных проводилось построение графиков зависимости концентрации глюкозы (сахарная кривая) и инсулина (инсулиновая кривая) от времени (табл. 3).

По результатам анализа было установлено, что во всех образцах сыворотки крови одновременно дости-

гается максимальная концентрация глюкозы и инсулина, причем содержание гормона превышает сравнительные пределы (22 – 181 пмоль/л [5]) у пациентов, страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы, что соответствует литературным данным и подтверждает достоверность полученных нами результатов.

Таким образом, полученные данные по содержанию инсулина и глюкозы в крови являются взаимодополняющими, что дает возможность использования разработанной методики для целей лабораторной и клинической диагностики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Большая медицинская энциклопедия, Т. 7, Советская энциклопедия, Москва (1977), сс. 227 – 241.
2. Е. В. Крюкова, А. А. Савченко, В. Т. Манчук и др., *Пробл. эндокринологии*, **46(3)**, 3 – 6 (2000).
3. С. П. Мискиджян, Л. П. Кравченко, *Полярография лекарственных препаратов*, Издательское объединение “Вища школа”, Киев (1976).
4. С. В. Терентьева, Е. М. Матолыгина, В. И. Кулешов и др., *Вольтамперометрический способ определения инсулина*, Патент России 2002117812 (2002).
5. В. В. Меньшиков (ред.), *Руководство по клинической лабораторной диагностике*, Медицина, Москва (1982).
6. Приказ МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 “О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения российской федерации”, *Клинич. лаборат. диагностика*, № 6, 41 – 55 (2000).

Поступила 25.02.03.