

9. Ревенко А.Г. // Аналитика и контроль. -2002. -6, № 3. -С. 231—246.
10. Сб. инструкций "Spectraplus" для пользователей спектрометра S4 Explorer.
11. Лончих С.В., Петров Л.Л. Стандартные образцы

состава природных сред. -Новосибирск: Наука, Сиб. отделение, 1988.

12. Govindaraju K. Geostandards Newsletter: Special Issue. -1994. -Vol. 18.

Институт земной коры СО РАН, Иркутск

Поступила 08.06.2005

УДК 543.258:543.8

Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников

КУЛОНОМЕТРИЯ В АНАЛИЗЕ АНТИОКСИДАНТОВ

Разработаны способы кулонометрического определения индивидуальных антиоксидантов в модельных растворах, лекарственных препаратах и биологических жидкостях человека с применением электрогенерированных титрантов — галогенов. Величины относительного стандартного отклонения составили 0.01—0.09. Найдены стехиометрические коэффициенты и предложены соответствующие схемы реакций.

Антиоксиданты (АО) — это важнейший объект исследования и анализа в науках о жизни. Причины такого внимания много. Одна из них состоит в профилактике старения организма и свободнорадикальных патологий, таких, как заболевания сердечно-сосудистой системы, неврологические, онкологические и другие заболевания [1—3].

Интерес к исследованию соединений, которые способны предотвращать процессы свободнорадикального окисления в клетках, впервые проявили биофизики и физиологи. Позже к решению таких задач пришли химики. В результате их плодотворного сотрудничества мы сейчас имеем огромный массив информации об АО, их функциях в живом организме, а благодаря химикам-синтетикам значительно расширен круг соединений этого типа.

АО — вещества различной химической природы, способные тормозить или устранять неферментативное свободнорадикальное окисление органических соединений различными формами кислорода. Биоантиоксиданты, подавляя свободнорадикальное окисление, регулируют степень влияния окисления на большинство метаболических процессов. Конечным итогом действия АО является создание оптимальных условий для метаболизма и обеспечение нормального роста клеток и тканей.

АО, функционирующие в живом организме (биоантиоксиданты), играют важную роль, защищая от неферментативного свободнорадика-

льного окисления биосубстраты, например легкоокисляющиеся липиды и, в частности, жиры и жирные кислоты мембранных образований клетки. Биоантиоксиданты являются необходимыми компонентами всех тканей и клеток живых организмов, где они в нормальных физиологических концентрациях поддерживают на низком стационарном уровне свободнорадикальные окислительные процессы. В норме расходование антиоксидантов и пополнение ими тканей живых организмов сбалансировано.

Биоантиоксиданты — это, как правило, полифункциональные соединения, антиокислительная функция которых выражена в разной степени. Различают АО, основная биологическая функция которых определяется или связана с антиоксидантной активностью, например токоферолы, и соединения, обладающие антиоксидантным действием, биологическая функция которых не связана с антиокислительными свойствами, например, антибиотики, обладающие в первую очередь бактерицидными свойствами, но оказывающие также антиоксидантное действие.

Биологическая активность АО обусловлена стереоэлектронными эффектами ароматического и хроманового колец, орто- и пара-положением гидроксильных групп, их трет-бутильным экранированием, образованием семихинонных форм, тиолсодержащими соединениями, хелатированием металлов переменной валентности, рецепторным взаимодействием с клеточной мембраной и т.д.

© Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, 2005


Индивидуальные биоантиоксиданты создают антиоксидантную систему, определяющую антиоксидантную активность живых тканей. К числу наиболее эффективных и распространенных АО относятся токоферолы (витамин Е), ряд фенолов (эвгенол и его производные) и полифенолов (конидендрин, пирокатехин, производные галловой кислоты), флавоноиды (рутин, кверцетин), убихиноны, некоторые стероидные гормоны, фосфолипиды, в том числе лецитин, кефалин. Сюда же следует отнести аскорбиновую, лимонную, никотиновую, дегидрокофеиновую и бензойную кислоты и их соли, серосодержащие аминокислоты (цистеин, глутатион), серотонин, адреналин, билирубин, белки крови [4, 5].

В настоящее время активно развиваются способы определения АО в различных объектах, в частности, в пищевых продуктах, лекарственных препаратах и биосубстратах.

В основу методов определения положены свойства молекул АО окисляться как в растворе, в присутствии окислителей, так и на поверхности электродов из материалов различной природы [6—8]. Кроме того, как следует из структурных особенностей АО, эти соединения обладают способностью поглощать свет в широкой области спектра и поэтому могут быть количественно определены методами спектроскопии [9, 10].

Цель исследования — разработать способы кулонометрического определения важнейших АО с применением электрогенерированных галогенов.

Электрогенерацию галогенов осуществляли на потенциостате П-5827 М при постоянной силе тока 5.0 мА из водных 0.2 М растворов КСl и КВr в 0.1 М H_2SO_4 и КI на фоне виннокислого буферного раствора с рН 3.56. Кроме того, электрогенерацию брома и иода проводили из 0.2 М $(C_2H_5)_4NBr$ в 0.1 М $HClO_4$ и 0.1 М $(C_2H_5)_4NI$ в 0.5 М $NaClO_4$ в ацетонитриле соответственно, со 100 %-м выходом по току.

Рабочим электродом служила гладкая платиновая пластинка площадью 1 см^2 , вспомогательным электродом — платиновая спираль, отделенная полупроницаемой перегородкой от анодного пространства ячейки. Конечную точку кулонометрического титрования определяли амперометрически с двумя поляризованными игольчатыми платиновыми электродами ($\Delta E = 300\text{ мВ}$). Кривая кулонометрического титрования имеет следующий вид: 

Кулонометрическое определение АО прово-

дили следующим образом. В кулонометрическую ячейку вносили 20.0 мл фонового раствора и аликвоту исследуемого раствора (0.2÷2.0 мл). Для титрования брали аликвоты с таким расчетом, чтобы время титрования не превышало 5 мин.

Фиксировали изменение индикаторного тока во времени. По перегибу на индикаторных кривых находили конечную точку титрования и рассчитывали массу вещества по формуле:

$$m = \frac{I \cdot t \cdot M}{nF},$$

где I — сила тока, А; t — время достижения конечной точки титрования, с; M — молярная масса вещества, г/моль; n — число электронов, участвующее в реакции; F — постоянная Фарадея 96500 Кл/моль.

В работе использовали реактивы марок ос.ч., х.ч., ч.д.а. и фармакопейной чистоты.

Ацетонитрил очищали кипячением с перманганатом калия в колбе с обратным холодильником и отгоняли над оксидом фосфора (V).

В качестве стандартных растворов α -токоферола и ретинола использовали раствор витамина Е в масле с содержанием α -токоферил-ацетата 97.7 % и раствор ретинола пальмитата в масле с содержанием 55 %. Навеску антиоксиданта (0.6—0.8 г) омыляли трехкратным избытком спиртового раствора КОН в течение 30 мин на водяной бане в колбе с обратным холодильником. Полученные прозрачные спиртовые растворы α -токоферола и ретинола переносили в мерную колбу, разбавляли до метки спиртом и, после стандартизации, использовали в качестве стандарта.

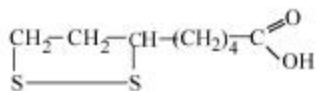
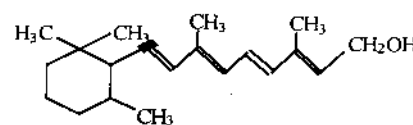
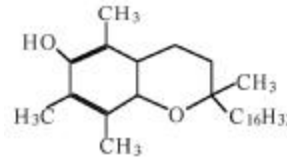
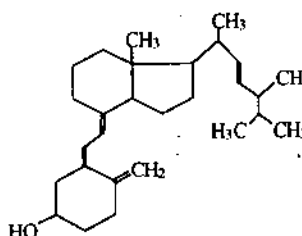
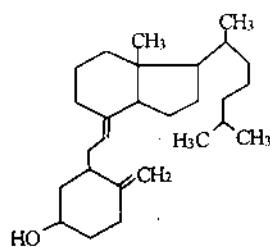
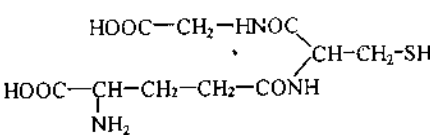

Применяли эргокальциферол производства ОАО Фармакон (Санкт-Петербург) и холекальциферол фирмы Мерк КГаА (Германия).

В качестве стандартного раствора сывороточного альбумина использовали лиофильный альбумин из человеческой сыворотки производства REANAL (Венгрия) и в качестве рабочего — 10 %-й раствор сывороточного альбумина человека (Казанское предприятие по производству бактериальных препаратов), полученный путем фракционирования плазмы человеческой крови, свободной от вирусов СПИДа и гепатита.

Для кулонометрического определения АО были исследованы кулонометрические титранты-окислители — галогены I_2 , Br_2 , Cl_2 . Для выяснения стехиометрии реакций проводили кулонометрическое титрование стандартных раст-

Т а б л и ц а 1

Стехиометрические коэффициенты в реакциях антиоксидантов с электрогенерированными галогенами ($n=5$, $p=0.95$)

| Соединение | Структурная формула | Титрант | Соотношение v (в-ва) : v (Hal_2) |
|--------------------------------|---|---------------|---|
| Липоевая кислота |  | Cl_2 | 1:5 |
| | | Br_2 | 1:2 |
| | | I_2 | 1:2 |
| Ретинол |  | Br_2 | 1:2 |
| α -Токоферол |  | Cl_2 | 1:1 |
| | | Br_2 | 1:1 |
| Эргокальциферол |  | Br_2 | 1:7 |
| Холекальциферол |  | Br_2 | 1:3 |
| Глутатион |  | Cl_2 | 1:3 |
| | | Br_2 | 1:3 |
| | | I_2 | 1:1 |
| Сывороточный альбумин человека |  | Br_2 | 1:73 |
| | | I_2 | 1:64 |

воров. Результаты кулонометрического титрования позволили установить стехиометрические коэффициенты реакций важнейших АО с электрогенерированными галогенами (табл. 1).

Исходя из результатов кулонометрическо-

го определения, можно предложить схемы взаимодействия. Так, для серосодержащих АО (липовой кислоты, глутатиона, сывороточного альбумина человека) характерно окисление тиольных и дисульфидных групп до сульфо- и сульфоксидной групп (схемы (1)–(5)).

Для жирорастворимого АО α -токоферола реакция протекает, видимо, с образованием α -токоферилхинона [11] по схеме (6).

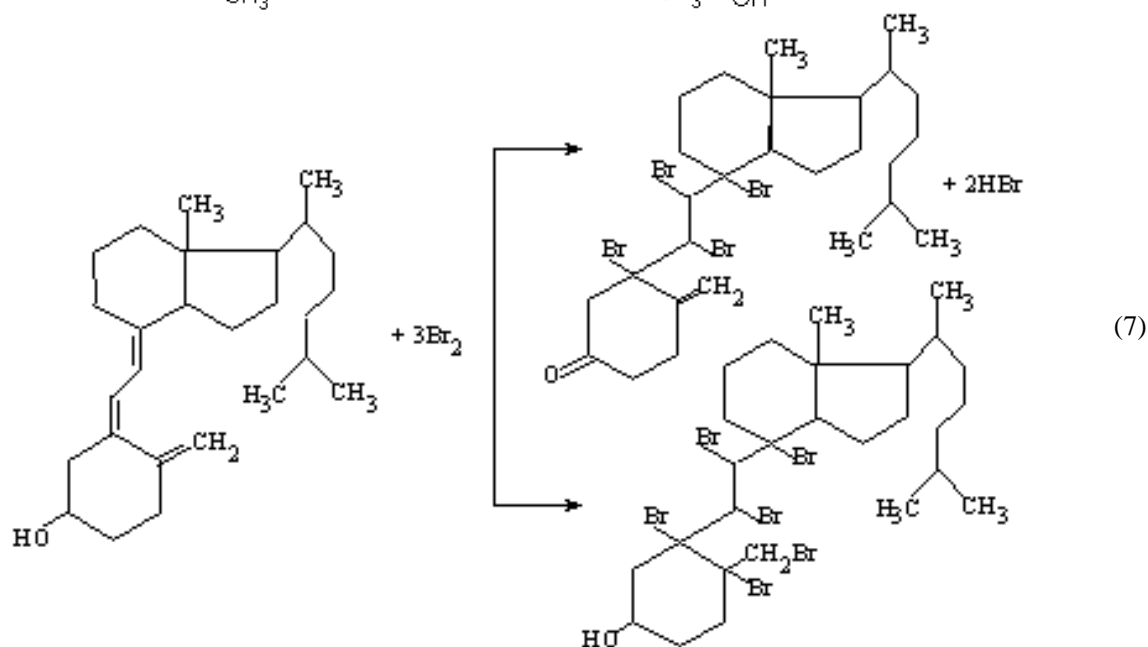
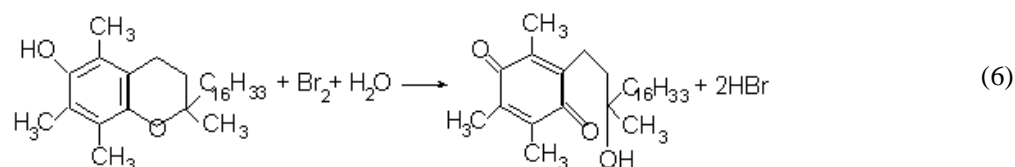
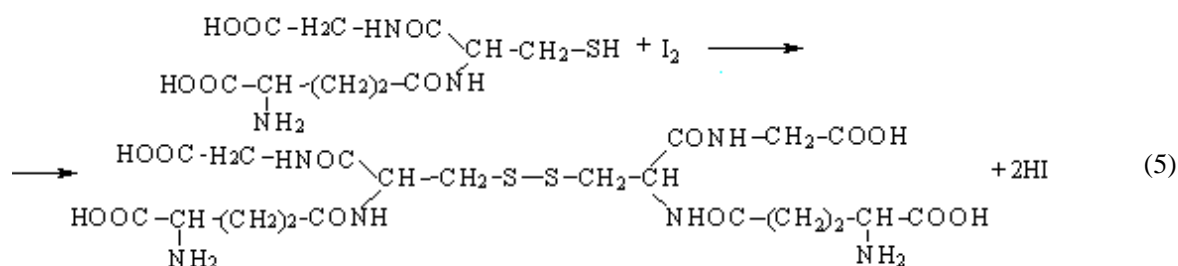
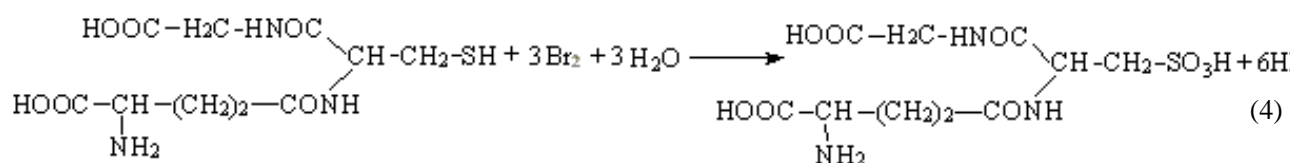
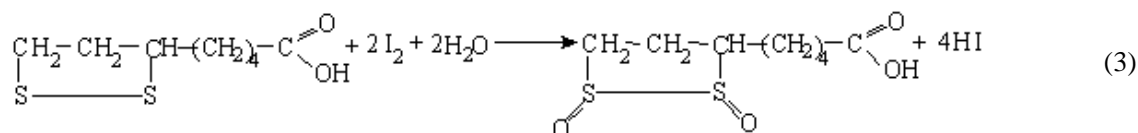
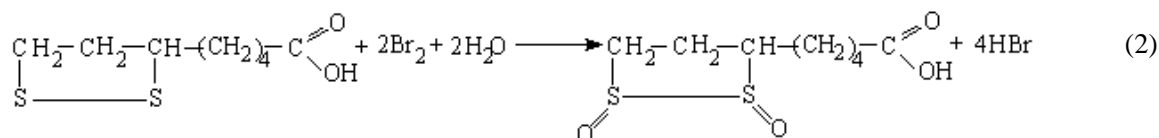
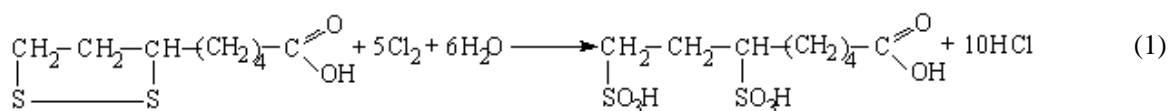
Поскольку стехиометрические коэффициенты окисления α -токоферола бромом и хлором одинаковы, то можно предложить аналогичную схему и для электрогенерированного хлора. При титровании стандартных растворов α -токоферола электрогенерированными галогенами установлено, что йод медленно окисляет α -токоферол. Это затрудняет установление конечной точки титрования и поэтому не позволяет использовать йод в качестве кулонометрического реагента.

Исходя из результатов кулонометрического титрования холекальциферола, можно предложить схему взаимодействия (схема (7)).

Для ретинола и эргокальциферола возможны различные пути реакции окисления, поэтому требуются дополнительные исследования с применением методов спектроскопии.

На основе полученных результатов проведено определение АО в модельных растворах (табл. 2).

Разработан способ кулонометрического определения глутатиона в крови человека. В основе определения лежит предварительное осаждение белков трихлоруксусной кислотой с последующим осаждением и изолированием глутатиона раствором сульфата кад-



Т а б л и ц а 2

Результаты кулонометрического определения антиоксидантов в модельных растворах с помощью, электрогенерированных галогенов ($n=5$, $p=0.95$)

| Определяемое соединение | Титрант | Введено | Найдено | S_r | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|-----------|------|
| | | мкг | | | | |
| Липовая кислота | Cl ₂ | 48 | 48.0 ± 0.9 | 0.02 | | |
| | | 96 | 93 ± 1 | 0.01 | | |
| | | 192 | 192 ± 1 | 0.01 | | |
| | Br ₂ | 96 | 98 ± 1 | 0.01 | | |
| | | 192 | 198 ± 5 | 0.01 | | |
| | | 288 | 287 ± 3 | 0.01 | | |
| | | I ₂ | 96 | 96 ± 3 | 0.02 | |
| | I ₂ | 192 | 191 ± 4 | 0.02 | | |
| | | 288 | 282 ± 3 | 0.02 | | |
| | | Ретинол | Br ₂ | 2378 | 2330 ± 40 | 0.01 |
| Ретинол | Br ₂ | 4756 | 4800 ± 50 | 0.01 | | |
| | | 7134 | 7230 ± 40 | 0.01 | | |
| | | Эргокальциферол | Br ₂ | 31 | 26 ± 2 | 0.05 |
| Эргокальциферол | Br ₂ | 63 | 63 ± 3 | 0.03 | | |
| | | 78 | 88 ± 3 | 0.03 | | |
| | | Холекальциферол | Br ₂ | 50 | 56 ± 4 | 0.05 |
| | | Холекальциферол | Br ₂ | 75 | 74 ± 2 | 0.02 |
| 100 | 103 ± 7 | | | 0.04 | | |
| Глутатион | Br ₂ | | | 42 | 40 ± 4 | 0.07 |
| Глутатион | Br ₂ | 168 | 169 ± 12 | 0.05 | | |
| | | 253 | 257 ± 5 | 0.01 | | |
| | | I ₂ | 73 | 71.7 ± 0.2 | 0.01 | |
| | I ₂ | I ₂ | 168 | 155 ± 7 | 0.03 | |
| | | | 211 | 198 ± 7 | 0.02 | |
| | | | Cl ₂ | 42 | 45 ± 2 | 0.04 |
| | Cl ₂ | Cl ₂ | 168 | 165 ± 5 | 0.02 | |
| | | | 211 | 203 ± 8 | 0.03 | |

мия. При этом другие редуцирующие вещества, способные помешать определению, остаются в растворе [12]. Осадок, содержащий глутатион, растворяли в 1 М HCl. Полученный прозрачный раствор титровали электрогенерированными бромом и иодом. Результаты кулонометрического определения глутатиона представлены в табл. 3.

Другой важнейший АО — сывороточный альбумин. Разработана методика его кулонометрического определения в сыворотке крови че-

Т а б л и ц а 3

Результаты кулонометрического определения глутатиона в крови человека ($n=5$, $p=0.95$)

| Титрант | Содержание глутатиона, г/л | S_r | Титрант | Содержание глутатиона, г/л | S_r |
|-----------------|----------------------------|-------|-----------------|----------------------------|-------|
| Br ₂ | 0.59 ± 0.07 | 0.07 | Br ₂ | 0.54 ± 0.04 | 0.08 |
| I ₂ | 0.61 ± 0.06 | 0.08 | I ₂ | 0.57 ± 0.07 | 0.09 |

Т а б л и ц а 4

Результаты кулонометрического определения альбумина в сыворотке крови с помощью электрогенерированного брома ($n=5$, $p=0.95$)

| Найдено кулонометрически, г/л | S_r | Найдено контрольным методом*, г/л | S_r |
|-------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| 46 ± 1 | 0.02 | 45 ± 6 | 0.07 |
| 40 ± 2 | 0.04 | 41 ± 5 | 0.08 |
| 36 ± 2 | 0.04 | 33 ± 8 | 0.09 |
| 38 ± 2 | 0.04 | 37 ± 5 | 0.07 |
| 30 ± 2 | 0.05 | 28 ± 6 | 0.09 |

* Спектрофотометрическое определение альбумина в сыворотке крови [12].

ловека. В пробирку помещали 0.5 мл сыворотки крови, добавляли до 10.0 мл 26 %-й раствор Na₂SO₄ и тщательно встряхивали. Затем вносили 3.0 мл диэтилового эфира, интенсивно перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. Прозрачный центрифугат содержит сывороточный альбумин [12]. Аликвоту (0.1 мл) исследуемого раствора вносили в электрохимическую ячейку и титровали электрогенерированным бромом. Результаты кулонометрического определения альбумина в сыворотке крови сопоставляли с данными спектрофотометрического определения (табл. 4).

Предложенные кулонометрические способы определения глутатиона и альбумина в биологических жидкостях с нижней границей определяемых концентраций $2 \cdot 10^{-6}$ и $3.8 \cdot 10^{-8}$ М соответственно характеризуются хорошей воспроизводимостью и обеспечивают высокую производительность, что позволяет рекомендовать их для применения в клинических лабораториях.

Проведенные исследования показали эффек-

Т а б л и ц а 5

Результаты кулонометрического определения антиоксидантов в лекарственных препаратах ($n=5$, $p=0,95$)

| Объект | Определяемое соединение | Содержание, мг/мл | Титрант | Найдено, мг/мл | S_r |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|----------------|-------|
| Раствор эргокальциферола в масле | Эргокальциферол | 0.625 | Br ₂ | 0.60 ± 0.02 | 0.03 |
| Раствор холекальциферола в масле | Холекальциферол | 0.5 | Br ₂ | 0.44 ± 0.08 | 0.04 |
| Раствор ретинола ацетата в масле | Ретинол | 41 | Br ₂ | 39 ± 2 | 0.04 |
| Раствор α-токоферола ацетата в масле | α-Токоферол | 300 | Br ₂ | 270 ± 10 | 0.04 |
| Таблетка липоевой кислоты | Липоевая кислота | 25* | Cl ₂ | 25.0 ± 0.7* | 0.03 |
| | | | Br ₂ | 24.4 ± 0.5* | 0.02 |
| | | | I ₂ | 24.8 ± 0.5* | 0.02 |

* Приведено в мг.

тивность кулонометрии при определении содержания действующего вещества в лекарственных препаратах (табл. 5).

Таким образом, разработаны способы кулонометрического определения АО — липоевой кислоты, витаминов А и Е, кальциферолов, глутатиона и сывороточного альбумина человека в модельных растворах, лекарственных формах и биологических жидкостях с величинами относительного стандартного отклонения 0.01—0.09. Установлены стехиометрические коэффициенты реакций указанных соединений с электрогенерированными титрантами — галогенами.

РЕЗЮМЕ. Розроблено засоби кулонометричного визначення індивідуальних антиоксидантів у модельних розчинах, лікарських препаратах та біологічних рідинах людини із застосуванням електрогенерованих титрантів — галогенів. Величини відносного стандартного відхилення склали 0.01—0.09. Знайдено стехіометричні коефіцієнти і запропоновано відповідні схеми реакцій.

SUMMARY. Methods for coulometric determination of individual antioxidants in model solutions, pharmaceuticals and human biological fluids using electrogenerated halogens as titrants are proposed. The RSD of determination are 0.01—0.09. Stoichiometric coefficients of the antioxidants reaction with electrogenerated halogens are

established and possible mechanisms of this interactions are discussed.

1. Ghiadoni L., Viridis A., Taddei S. et al. // Amer. J. of Hypertension. -1998. -11, № 4. -P. 174.
2. Hennekens C.H. // Pure and Appl. Chem. -1997. -69, № 10. -P. 2141—2144.
3. Parthasarathy S., Santanam N., Auye N. // Biochem. Pharmacol. -1998. -56, № 3. -P. 279—284.
4. Янковский О.Я. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты). -С-Пб.: ИГРА, 2000.
5. Diplock A.T. Antioxidants and free radical scavengers. Free radical damage and its control / Ed. by C.A. Rise-Evans, R.H. Burdon. - Amsterdam: Elsevier, 1994. -P. 113—130.
6. Ensafi A.A. // Anal. Lett. -2003. -36, № 3. -P. 591—604.
7. Stone C.G., Cardosi M.F., Davis J. // Anal. Chim. Acta. -2003. -491, № 2. -P. 203—210.
8. Шайдарова Л.Г., Зиганишина С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К. // Журн. аналит. химии. -2003. -58, № 12. -С. 1277—1283.
9. Zhenghua S., Shuang H. // Talanta. -2002. -57, № 1. -P. 59—67.
10. Yolanda A., Ostra M., Ubide C. et al. // Talanta. -2002. -57, № 2. -P. 343—353.
11. Абдуллин И.Ф., Турова Е.Н., Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. // Журн. аналит. химии. -2002. -57, № 8. -С. 864—866.
12. Балаховский С.Д., Балаховский И.С. Методы химического анализа крови. -М.: Медгиз, 1953.

Казанский государственный университет
Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казань

Поступила 13.06.2005