

элементов А и В.

Отношение числа атомов  $m$  элемента А к числу атомов  $k$  элемента В определяется из уравнения (2) подстановкой (6) и (7)

$$(m/k) = (I_A^x / I_B^x) (S_A / S_B) (M_B^A) / (M_A^A) . \quad (8)$$

Решением уравнения (8) является условие минимизации целочисленных значений, т.е. ,если получено  $(m/k=4/6)$ ,то решением будет минимальная величина отношения, т.е.  $(2/3)$  .Окончательно можно записать

$$C_{AB} = A_2B_3 . \quad (9)$$

Закключение. На основании приведенных данных, при заданных табличных значениях коэффициентов чувствительности, показана возможность определения стехиометрического состава двухкомпонентных систем.

### Библиографический список

- 1.Анализ поверхности методами Оже и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Под ред. Бриггса Д., Сиха М.П., -М.: Мир, -1987, - 598 с.
- 2.Нефедов В.И., Черепин В.Т. Физические методы исследования поверхности твердых тел. -М.: Наука, -1983, - 296 с.
3. Wagner C.D., Sensitivity of Defection of Elements by Photoelectron Spectrometry Anal.. Chem.-1972-V.44,n.6 -P. 1050-1053
- 4.Asami K., Hashimoto K. Quantative ESCA Determination Methods of  $Fe^{+2}$  and  $Fe^{3+}$  in Iron Oxides, Jap. Inst. Metals -1976 -V.40,N5-P.438-443

Харина Г.В., Иванова А.В.,  
Брайнина А.З.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИОЛОВ И ДИСУЛЬФИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТОЛСТОПЛОСКИХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ЭЛЕКТРОДОВ

**Введение.** Содержание SH- и SS-групп и их соотношение являются одним из весьма существенных факторов антиоксидантной системы организма. Изменение соотношения концентраций тиолов и дисульфидов может служить информацией о наличии оксидантного стресса [1].

Тиол-дисульфидная система рассматривается как “redox buffer”, например, “буфер” на основе глутатиона: g-SH/g-S-S-g. Окисленный глутатион (gS-Sg) является физиологическим показателем активности внутриклеточной сис-

темы защиты от действия реактивного кислорода и может использоваться для мониторинга окислительного стресса *in vivo* [2]. Буферная емкость антиоксидантной системы (АОС) тем выше, чем больше смещено влево, указанного выше окислительно-восстановительного процесса.

При выходе из окислительного стресса отношение восстановленных и окисленных форм глутатиона возрастает [3]. Значит, возникает возможность оценивать АОС и, следовательно, интенсивность свободно радикального окисления по величине тиол-дисульфидного соотношения (ТДС = SH/SS). Надежно установлено [4], что ТДС крови может служить в качестве теста для объективной оценки адаптационных возможностей организма и их искусственной коррекции, для диагностики и прогнозирования заболеваний, для неспецифической профилактики и терапии. Отсюда следует крайняя актуальность разработки аналитических методов, позволяющих следить за уровнем содержания в крови как сульфгидрильных, так и дисульфидных групп

Для определения низкомолекулярных тиолов нами использован следующий подход: осаждение тиолов ( и дисульфидов после их восстановления) в объеме раствора в виде малорастворимых тиолатов переходных металлов с последующей регистрацией аналитического сигнала, обусловленного не прореагировавшими ионами металла, методом прямой катодной вольтамперометрии (КВ).

#### **Экспериментальная часть.**

##### **Аппаратура и электроды.**

Все измерения были выполнены с помощью автоматического программно управляемого вольтамперометрического анализатора ИВА-5 (ООО НПВП «ИВА», г. Екатеринбург, Россия). Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку объемом 10 мл. Перемешивание раствора осуществляли с помощью магнитной мешалки. Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный стержень, электродом сравнения - хлорсеребряный (Ag/AgCl) электрод, заполненный насыщенным раствором KCl.

В качестве рабочих использовали электроды:

- типа 1 – толстопленочный углеродсодержащий электрод, модифицированный  $Hg_2(OH)_2$ ;
- типа 2 – толстопленочный углеродсодержащий электрод, модифицированный  $Hg_2Cl_2$ . Процедура модифицирования описана ранее.

##### **Реактивы.**

Для приготовления растворов и промывки приспособлений использовали дважды дистиллированную воду. В работе применяли реактивы квалификации «о.с.ч.» или «х.ч.». Аммиачный буферный раствор (pH = 9.5) готовили смешиванием растворов 0.2 М  $NH_4OH$  и 0.2 М  $NH_4NO_3$ . Для приготовления растворов,

содержащих 8.9 мМ  $\text{Cd}^{2+}$ , использовали Государственные стандартные образцы содержащие 1 г/л ионов соответствующего металла. 1 мМ растворы тиолов (L-цистеин солянокислый, глутатион восстановленной -GSH и окисленной - GSSG форм от фирмы Merck) готовили растворением соответствующей навески реагента в воде и хранили в темноте не более трех часов.. Применяли гидразин гидрат квалификации «х.ч.», глюгицир (4 % раствор) фармакопейный.

Пробы крови отбирали с антикоагулянтом глюгициром в соотношении 1:4 и помещали в морозильную камеру. Затем пробы размораживали и разбавляли 0,01М раствором NaOH в 5 и 10 раз.

### Результаты и обсуждение

Определение основано на понижении катодного сигнала кадмия, обусловленного образованием труднорастворимого тиолата кадмия. Исследования проводились в среде аммиачного буферного раствора с  $\text{pH}=9$ . В этом случае сигналообразующей являлась электрохимическая реакция восстановления кадмия на поверхности электрода:



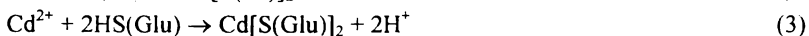
На часовом стекле в капле аммиачного буферного раствора смешали водные растворы соли кадмия и глутатиона восстановленного.

При выборе металла, по сигналу которого можно было бы вести определение сульфгидрильных групп, учитывались следующие свойства:

- 1) способность образовывать малорастворимые соединения с тиолами,
- 2) простота ВА обнаружения ионов металла,
- 3) меньшее значение равновесной концентрации ионов металла, образующихся при диссоциации малорастворимого тиолата металла, по сравнению с концентрацией ионов металла, образующихся при диссоциации комплексных ионов – аммиакатов.

В случае кадмия образование осадка тиолата, имевшего кристаллическую структуру, происходило сразу. В случае использования других металлов (свинец, медь) взаимодействие тиолов с ионами металлов происходило медленно, а осадок имел аморфную структуру.

Введение в раствор глутатиона восстановленного приводит к понижению аналитического сигнала кадмия, обусловленному связыванием его ионов в малорастворимые тиолаты кадмия в соответствии с уравнениями реакций:



Для расчета концентрации SH-групп использовали безэталоный метод и метод добавок.

1) По безэталонному методу концентрацию ионов кадмия рассчитывали по формулам:

$$C_{SH} = \frac{I_{Cd} - I_{pr}}{I_{Cd}} \times C_{Cd} \times 2, \quad (4)$$

где  $C_{Cd}$  – концентрация ионов кадмия в ячейке (мкМ),

$I_{Cd}$  – АС кадмия (мкА),

$I_{pr}$  – АС кадмия после введения пробы

Формула (2) позволяет рассчитать концентрацию SH-групп в ячейке (мкМ). Для расчета общей молярной концентрации SH-групп использовали следующую формулу:

$$C_{M-sh} = C_{SH} \times \frac{V_{общ}}{V_{пр}} \times K \times 1.25 \quad (5)$$

где  $C_{SH}$  – концентрация тиолов в ячейке,

$V_{общ}$  – общий объем ячейки,

$V_{пр}$  – объем пробы,

$K$  – коэффициент разбавления пробы 0,1М раствором NaOH,

1,25 – коэффициент разбавления пробы глюгициром

2) По методу добавок:

$$C_{SH} = \frac{\Delta_{пр}}{\Delta_{доб}} \times C_{доб-яч} \quad (6)$$

где  $C_{SH}$  – концентрация SH-групп в ячейке (мкМ),

$\Delta_{пр}$  – понижение сигнала кадмия от введения пробы,

$\Delta_{доб}$  – понижение сигнала кадмия от введения добавки,

$C_{доб}$  – концентрация добавки в ячейке (мкМ).

Молярную концентрацию SH-групп в крови рассчитывали по формуле (5).

После формирования поверхности рабочего электрода определение проводили в соответствии со следующей программой: потенциал предварительного перемешивания и потенциал покоя были выбраны равными –0,45В, так как при более положительных потенциалах происходило окисление цистеина.

На рис. 1 приведена зависимость величины катодного тока от концентрации ионов кадмия в аммиачном буферном растворе. Как видно из рисунка, прямопропорциональная зависимость сохраняется вплоть до 40 мкМ  $\text{Cd}^{2+}$ .

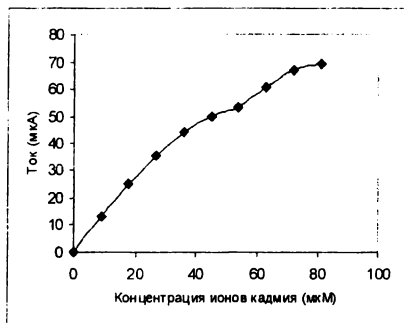


Рис. 1. Зависимость катодного тока от концентрации ионов кадмия в аммиачном буферном растворе, полученная при использовании электрода типа 1 (КДВА) кадмия, полученные в аммиачном буферном растворе со следующим алгоритмом определения:  $E_{\text{нак}} = -0,45\text{В}$ ,  $\tau_{\text{нак}} = 90\text{сек}$ . Из рис. 2 видно, что увеличение концентрации вводимого в раствор цистеина последовательно уменьшает сигнал кадмия.

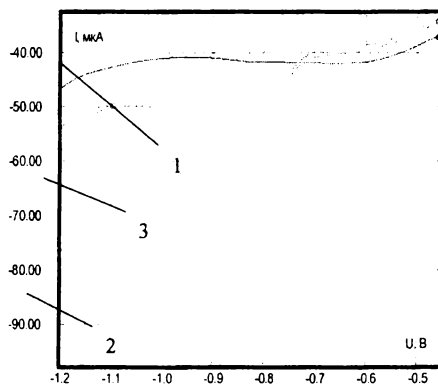


Рис. 2. КВА кадмия, полученные с использованием электрода типа 2. 1 – фон, 2 – + 27 мкМ  $\text{Cd}^{2+}$ , 3 – + 25 мкМ glut.-SH. Найдено 25,04 мкМ глутатиона – SH

Был проведен анализ модельных растворов, содержащих глутатион-SH, глутатион-SS и их смесь.

Как видно из рис. 2, введение в аммиачный буферный раствор ионов кадмия приводит к появлению на катодной вольтамперограмме четкого аналитического сигнала (АС) при потенциале -0,9В. Введение глутатиона-sh приводит к падению АС кадмия.

При расчете концентрации тиолов по безэталонному методу установлено, что найденная концентрация sh-групп соответствует введенной.

В табл.1 приведены результаты определения тиолов в зависимости от времени перемешивания.

Таблица1.

Содержание тиолов в модельном растворе, найденное в зависимости от времени перемешивания раствора.

№	Введено цистеина (мкМ)	Время перемешивания, (с)	Найдено цистеина (мкМ)	S <sub>r</sub> , %
1	15,0	40	10,3	8,1
	20,0		16,4	2,7
2	10	60	8,8	7,3
	15		12,6	9,7
3	15	90	14,8	6,9
	20		19,6	7,4
4	15	120	14,7	4,3
	20		19,5	5,4
5	15	180	14,8	6,4
	20		19,7	3,6

S<sub>r</sub> – среднее квадратичное отклонение.

Как следует из табл.1, оптимальное время перемешивания, необходимое для более полного протекания реакций (1) и (2), соответствует 90сек.

На рис. 3 приведена кривая титрования цистеина раствором соли кадмия. Как видно из рисунка, точка перегиба на кривой титрования соответствует количеству кадмия, прореагировавшего с SH- группами.

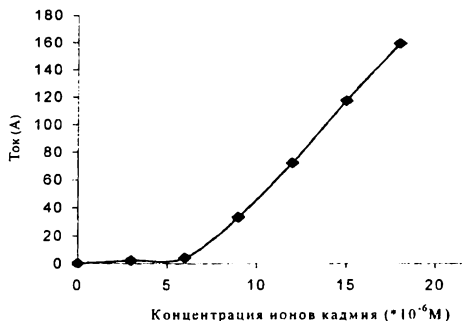


Рис.3. Кривая титрования цистеина (10μМ) раствором соли кадмия, полученная по катодным ВА кадмия ( $E_{\text{нак}}=-0,45\text{В}$ ,  $\tau=90\text{сек}$ ).

В таблице 2 приведены результаты определения концентрации тиольных групп, полученные разными методами. Как следует из таблицы, данные ВА титрования хорошо согласуются с результатами, полученными ранее по относительному понижению тока восстановления ионов кадмия.

Таблица 2.

Результаты определения содержания SH- групп, полученные различными методами ( $n=3$ ,  $p=0.95$ ) с использованием электродов типа 1.

Введенное содержание SH –групп $C_{\text{SH}}$ , μM	Найденное содержание SH-групп $C_{\text{SH}}$ , μM					
	методом ВА-титр. $x_{\text{ср}} \pm \Delta x$	$S_r$ %	R, %	по относ. понижению катодного сигнала $x_{\text{ср}} \pm \Delta x$	$S_r$ %	R, %
10,0	9.60±0.28	3,0	4,0	9.80±0.43	4,3	2,0
20,0	19,60±0,34	1,7	4,0	19,70±0,46	4,7	3,0
30,0	29,40±0,31	1,1	6,0	29,80±0,57	1,9	2,0

$R=(C_2/C_1)*100\%$  – величина, характеризующая отклонение полученного результата от истинного значения (recovery) [5].

С целью определения концентрации дисульфидов проводили их восстановительное расщепление гидразином. Содержание дисульфидов определяли по разности между суммарным количеством тиолов и содержанием сульфгидрильных групп, определенных ранее:

$$C_{s-s} = (C_{\Sigma} - C_{sh})/2 \quad (7)$$

$C_{\Sigma}$  – суммарное содержание сульфгидрильных групп, найденное после восстановительного расщепления дисульфидов.

$C_{s-s}$  – концентрация дисульфидов,

$C_{sh}$  – концентрация тиольных групп.

В таблице 3 приведены результаты определения sh и ss- групп в модельных растворах глутатиона восстановленного и окисленного и их смеси. Как следует из таблицы, введенное количество тиолов и дисульфидов как в индивидуальных растворах, так и в их смеси, соответствует найденному.

Таблица 3.

Результаты анализа модельных растворов на содержание групп SH и SS с использованием модифицированных каломелью электродов.

Раствор глутатион –SH, SH (мкМ)		Раствор глутатион –SS, SS (мкМ)		Раствор глутатион-(SH+SS)			
				SH (мкМ)		$\Sigma$ SH (мкМ)	
Введ	найд	введ	найд	введ	найд	введ	найд
15.0	14.5	10.0	8.6	15.0	12.2	25.0	26.9
	14.1	10.0	9.9		14.3		24.2
	14.4	10.0	9.1		14.4		24.3
					15.7		21.6
20.0	18.8	15.0	14.5		15.7		25.4
	17.9		14.1		15.3		26.0
					15.1		25.5
				12.0	12.5	20.0	20.4
					11.2		19.8
							19.4
						15.0	14.5
							14.1
							15.4
				22.5	20.2	37.5	35.8

Указанный метод был использован для анализа проб крови. На рис. 4 приведены катодные вольтамперограммы (КВА) кадмия в присутствии аликвоты пробы крови, разбавленной 0,01М раствором NaOH.



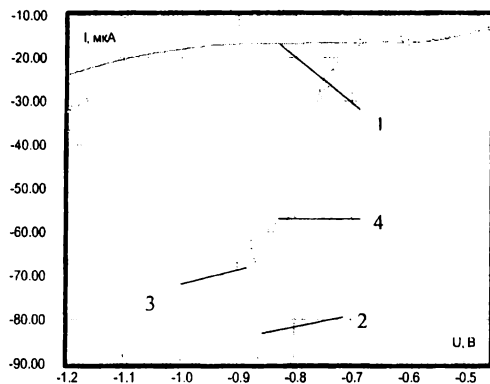


Рис. 4. КВА кадмия, полученные с использованием ТМУЭ. 1- фон (аммиачный буферный раствор), 2 - +  $\text{Cd}^{2+}$  (27мкМ), 3 - +проба крови А.З. 200мкл, 4 - + глутатион sh (10мкМ). Найдено 11,5мМ SH-

Как видно из рис.4, введение пробы приводит к понижению АС кадмия. Концентрацию SH—групп рассчитывали по методу добавок с использованием формул (4) и (5).

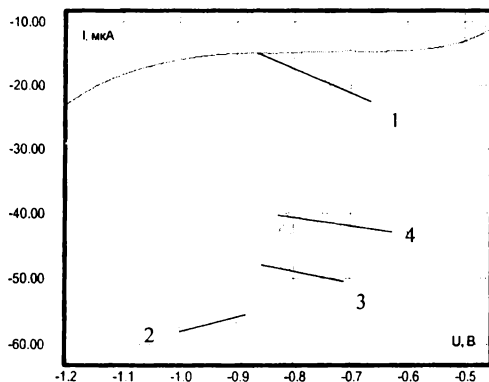


Рис. 5. КВА кадмия, полученные с использованием ТМУЭ. 1- фон (аммиачный буферный раствор + 40mM  $\text{N}_2\text{H}_4$ ), 2 - +  $\text{Cd}^{2+}$  (27мкМ), 3 - +проба крови А.З. 120мкл, 4 - + глутатион sh (10мкМ). Найдено 17,5мМ SS-

На рис.5 приведены КВА кадмия в присутствии гидразина. Как следует из рис. 5, введение гидразина не влияет на АС кадмия. Гидразин восстанавли-

вает присутствующие в крови дисульфидные мостики до sh—групп, поэтому введение пробы крови в присутствии гидразина также понижает АС кадмия.

В табл.4 приведены результаты анализа крови двух реципиентов. Использовали разное разбавление проб крови: 5- и 10- кратное. Как следует из таблицы, результаты хорошо согласуются между собой. Уровень содержания тиолов в крови указанных реципиентов, а также значения ТДС свидетельствуют о достаточно высоком антиоксидантном статусе организма [6].

Таблица 4.

Результаты анализа крови на содержание тиолов (SH) и дисульфидов (SS) с разной степенью предварительного разбавления 0. 01 М NaOH. Метод добавок.

реципиент	Найденное кол-во SH- и SS при разбавлении в 10 раз (mM).				Найденное кол-во SH- и SS при разбавлении в 5 раз (mM).			
	SH (mM)	$\Sigma SH$ (mM)	SS (mM)	ТДС	SH (mM)	$\Sigma SH$ (mM)	SS (mM)	ТДС С
№1	9,7	16,3	3,3	3,1	9,5	16,4	3,45	2,9
	9,0				10,1	16,9	3,4	
	11,5	17,9	3,2		9,9	17,5	3,8	
	11,0	18,8	3,9		11,3			
	11,9	18,5	3,3					
	$C_{cp} = 10,6$ $S_r = 0,10$	$C_{cp} = 17,8$ $S_r = 0,05$	$C_{cp} = 3,4$ $S_r = 0,08$		$C_{cp} = 10,2$ $S_r = 0,07$	$C_{cp} = 3,55$ $S_r = 0,05$		
№2	9,1	16,8	3,85	3,14	9,2	15,8	3,3	3,08
	12,3	19,7	3,7		11,2	18,1	3,5	
	12,0	19,5	3,75		11,9	19,3	3,7	
	11,8	18,1	3,15					
	$C_{cp} = 11,3$ $S_r = 0,11$	$C_{cp} = 18,5$ $S_r = 0,06$	$C_{cp} = 3,6$ $S_r = 0,08$		$C_{cp} = 10,8$ $S_r = 0,10$	$C_{cp} = 17,8$ $S_r = 0,08$	$C_{cp} = 3,5$ $S_r = 0,05$	

### Заключение

Взаимодействие SH-групп в составе больших органических молекул (белков) с ионами металлов протекает медленно, что подтверждается необходимостью достаточно длительного перемешивания раствора после введения в него исследуемой пробы крови. Замедленное взаимодействие приводит к тому, что электрохимическая реакция взаимодействия материала электрода (серебра,

золота) с тиолами крови не успевает пройти в приэлектродном слое. В результате накопление продуктов реакции на поверхности электрода не является таким же эффективным, как в случае реакции, протекающей в объеме раствора, содержащего SH-группы в составе низкомолекулярных тиолов. Поскольку добавка, вводимая в раствор именно в виде такого соединения, обуславливает более высокий прирост сигнала, чем в случае введения аликвоты крови, содержащей SH-группы в такой же мольной концентрации, найденная концентрация тиолов оказывается заниженной.

В последнем, предложенном нами методе катодной вольтамперометрии этот недостаток устраняется.

Можно было бы использовать инверсионную вольтамперометрию в таком же варианте (с выдержкой раствора), однако это не имеет смысла, поскольку концентрации ионов кадмия слишком высоки для определения методом инверсионной вольтамперометрии.

Работа была выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (проект № 2132).

### Библиографический список

1. В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко. Биологическая роль глутатиона. *Успехи современной биологии*, 110, в.1(4) (1990) 20-27.
2. Н. Hughes, Н. Jaeschke, J. Mitchel, *Methods in Enzymology*. Vol. 186: Oxygen radicals in biological systems. Part B. *Oxygen radicals and antioxidants*. San Diego: Acad. Press, 1990. P.681 –685.
3. *Methods in Enzymology*. Vol. 251: Biothiols. Part A: Monothiols and dithiols, protein thiols and thiol radicals. Ed. L.Packer. San Diego. 1995. Acad. Press. 382p.
4. В.В. Соколовский. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель неспецифической резистентности организма: *Учебное пособие*, Санкт-Петербург, 1996, 33 с.
5. Основы аналитической химии. Под ред. Ю.А. Золотова. Т. 1. М., Высшая школа. 2002. С.35.
6. Г.С. Солдатова, Т.Н. Поспелова, Э.А. Трубицын, Н.Ф. Захарчук и др. Современные лечебные и диагностические технологии в специализированной медицинской помощи. Новосибирск. 1997. С.108.