

Библиографический список

1. Внуков А. К. Защита атмосферы от выбросов энергообъектов: Справ. М., 1992.
2. Моррисон С. Химическая физика поверхности твердого тела / Пер. с англ. А. Я. Шульмана; Под ред. Ф. Ф. Волькенштейна. М., 1980.

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

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИОЛОВ

В последние годы появились многочисленные свидетельства ключевой роли тиолов в различных биологических и биохимических реакциях. Биотиолы участвуют во многих клеточных функциях, таких как биосинтез, клеточное деление, детоксикация. Окислительно-восстановительные изменения некоторых тиолсодержащих белков могут быть включены в число ключевых регуляторных факторов ферментов и клеточной пролиферации. Например, установлено, что глутатион играет важную роль в метаболизме лекарств, кальция, в функции тромбоцитов и биологических мембран. Глутатионовая антипероксидная система защищает хрусталик глаза от развития катаракты, в эритроцитах она защищает гемоглобин от денатурации H_2O_2 и тормозит пероксидацию липидов [4].

Тиолы, присутствующие в клетках и тканях человека и животных, характеризуются разнообразием строения и свойств. Среди этих веществ различают тиолы небелковой природы (низкомолекулярные кислоторастворимые вещества) и высокомолекулярные соединения – белки. К числу первых из них относятся: аминокислота – цистеин, содержащий цистеиновый остаток – *HS*-глутатион, меркаптопроизводное аминокислоты гистидина – эрготионеин, гомоцистеин как промежуточный продукт в метаболизме метионина, димеркаптофолиевая кислота, кофермент *A* и некоторые другие соединения. Белковые тиолы можно разделить на растворимые и нерастворимые в воде, т. е. на соединения, сульфгидрильные группы которых входят в состав растворимых белков (например, гемоглобина) или нерастворимых структурных белков (белки клеточных мембран).

Сульфгидрильные группы, входящие в состав различных веществ, легко окисляются с образованием дисульфидных групп.

Возникающая на основе этих превращений обратимая тиолдисульфидная система имеет большое значение в регуляции окислительно-восстановительного равновесия в клетках и тканях организма, с нею связаны механизмы многих биологических процессов. Известно, что изменения количественного соотношения тиольных и дисульфидных групп (тиолдисульфидное соотношение) приводят к радикальной перестройке всех режимов жизнедеятельности клетки: изменению ритмов деления, интенсивности метаболизма [2, 6]. Доказано, что при окислительном стрессе отношение концентраций восстановленных и окисленных форм тиолов резко понижается, тогда как при выходе из окислительного стресса оно возрастает [6]. Таким образом, это отношение является физиологическим показателем активности внутриклеточной системы защиты от действия реактивного кислорода. Поэтому проблема контроля за содержанием сульфгидрильных и дисульфидных групп в организме является особенно актуальной [1].

На сегодняшний день известно множество разнообразных методов определения тиольных и дисульфидных групп, входящих в состав различных биотиолов.

1. *Метод прямого окисления* с использованием стеклоуглеродных, графитовых, платиновых, золотых и серебряных электродов.

Проблема этого метода – пассивация поверхности благородного металла. Механизм обнаружения состоит в адсорбции реагента на поверхности электрода с последующим окислением, дающим аналитический сигнал.

2. *Импульсное электрохимическое обнаружение*. Согласно этому методу рабочий электрод, в качестве которого используется платина или золото, выдерживают в течение небольшого промежутка времени при положительном потенциале для окисления поверхности электрода, затем – при отрицательном для восстановления металла из образовавшегося оксида, после чего задают потенциал обнаружения тиолов, которые адсорбируются на чистой металлической поверхности электрода. Метод характеризуется невысокой селективностью и не позволяет разделить количественно тиолы и дисульфиды.

3. *Вольтамперометрический метод* с использованием металлических электродов. Метод заключается в образовании и последующем нако-

плении образующегося при взаимодействии комплексного соединения металл-тиол на поверхности электрода, после которого производят катодную развертку для восстановления иона металла до нулевой степени окисления. По сигналу восстановления металла определяют количество тиолов в объекте.

4. *Вольтамперометрическое определение с использованием медиаторных систем.* Метод основан на электрокаталитическом окислении тиолов комплексными соединениями металлов с переменной валентностью, играющих функцию переноса электронов, с последующей регистрацией тока восстановления. Метод характеризуется недостаточной селективностью.

5. *Спектрофотометрический метод.* Определение основано, как правило, на восстановлении тиолсодержащими соединениями каких-либо окислителей, например, оксидитионитробензойной кислоты или нитросинего тетразолия с образованием окрашенных соединений. Метод характеризуется недостаточной селективностью. Так, например, при использовании нитросинего тетразолия происходит восстановление не только тиолами, но и глюкозой, аскорбиновой кислотой, креатинином и другими восстановителями, содержащимися в биологических объектах.

6. *Метод амперометрического титрования.* Сущность метода состоит в титровании раствора тиолсодержащего соединения азотнокислым серебром, в ходе которого ионы серебра связываются *SH*-группами с образованием устойчивого меркаптида. Появление избытка ионов серебра по окончании титрования вызывает возникновение в элементе, состоящем из платинового рабочего электрода и электрода сравнения, электрического тока, пропорционального концентрации ионов серебра и измеряемого микроамперметром. Содержание *SH*-групп эквивалентно количеству нитрата серебра, затраченному на титрование.

7. *Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.*

8. *Метод капиллярного электрофореза.*

Последние два метода отличаются высокой трудоемкостью и стоимостью.

Многие из указанных методов не доведены до уровня конкретных методик анализа и применяются для определения тиолов в растворах фоновых электролитов.

Для определения низкомолекулярных тиолов нами использованы два подхода:

1) концентрирование тиолов в виде малорастворимых соединений на поверхности металлических электродов с последующей регистрацией аналитического сигнала восстановления ионов металла – катодная инверсионная вольтамперометрия (ИКВА);

2) 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 анодной инверсионной вольтамперометрии (ИАВА).

Все измерения были выполнены с помощью автоматических программно-управляемых вольтамперометрических анализаторов ИВА-5 (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург, Россия) или μ -Autolab (*Eco-Chemie*, Голландия). Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку объемом 10 мл. Вспомогательным электродом служил графитовый или стеклоуглеродный стержень, электродом сравнения – хлорсеребряный (Ag/AgCl) электрод, заполненный насыщенным раствором KCl. В качестве рабочих использовали электроды типа 1, изготовленные напылением серебра на полимерную подложку *Melinex* или *PET*, и типа 2, изготовленные нанесением пасты, содержащей платину, на керамическую подложку.

Для приготовления растворов и промывки приспособлений использовали дважды дистиллированную воду. Аммиачный буферный раствор (pH = 9,5) готовили смешиванием растворов 0,2 М NH₄OH и 0,2 М NH₄NO₃, 10 мМ раствор Ag (I) – растворением соответствующей навески соли азотнокислого серебра в воде. Растворы, содержащие Ag (I) в меньших концентрациях, готовили путем разбавления исходного раствора аммиачным буфером, 1 мМ растворы тиолов (*L*-цистеин солянокислый, глутатион восстановленной *GSH*-формы от фирмы *Merck*) – растворением соответствующей навески реагента в предварительно дегазированной аргонном воде и хранили в темноте не более 3 ч. Применяли глюцидр (4%-й раствор) фармакопейный.

Концентрацию тиолов в анализируемом растворе в случае их осаждения в объеме раствора рассчитывали по следующим соотношениям:

$$I_0 = kC^0,$$

$$I_1 = k(C^0 - C'),$$

$$I_2 = k(C^0 - C' - C'_д),$$

где I_0, I_1, I_2 – сигналы серебра: соответственно исходный, после введения анализируемой пробы, после введения стандартной добавки цистеина или глутатиона восстановленного; $C^0, C', C'_д$ – концентрации в ячейке соответственно ионов серебра, $-SH$ и стандартной добавки; k – коэффициент пропорциональности.

Из этих соотношений легко получить

$$\frac{I_0 - I_1}{I_1 - I_2} = \frac{C'}{C'_д}$$

или, обозначив $I_0 - I_1 = \Delta_{np}$ и $I_1 - I_2 = \Delta_д$,

$$C' = C'_д \frac{\Delta_{np}}{\Delta_д}.$$

Принимая во внимание, что

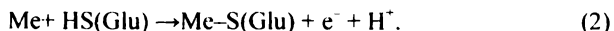
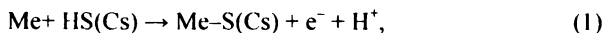
$$C' = C \frac{V_{np}}{V_{яч}}, \text{ а } C'_д = C_д \frac{V_д}{\Delta_{яч}},$$

получим

$$C = C_д \frac{V_д}{V_{np}} \cdot \frac{\Delta_{np}}{\Delta_д},$$

где C – концентрация $-SH$ -групп в анализируемом образце; $C_д$ – концентрация цистеина или глутатиона восстановленного в исходном стандартном растворе; $V_д$ и V_{np} – аликвоты стандартной добавки и пробы.

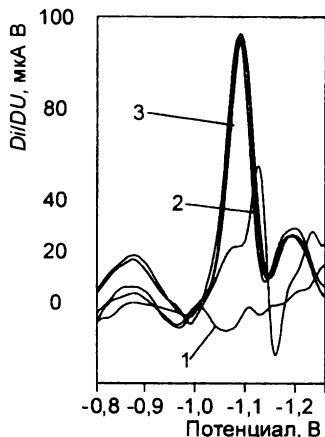
Концентрирование тиолов в виде малорастворимых соединений на поверхности металлических электродов. Известно, что некоторые переходные металлы, такие как Ag, Cu, Au, Hg, при взаимодействии с низкомолекулярными тиолсодержащими соединениями образуют малорастворимые соли – тиолаты (или меркаптиды):



Электрохимические реакции (1) или (2) могут быть использованы в качестве сигналообразующих. Оптимальной для этих реакций является щелочная среда, в которой происходит наиболее полная диссоциация тиольных соединений и достаточно быстрое взаимодействие их с материалом электрода (серебряные электроды типа 1). В связи с этим в качестве фонового электролита был выбран раствор NaOH.

Дифференциальные инверсионные катодные вольтамперограммы (ДИКВА) цистеина и глутатионата серебра, зарегистрированные после накопления соединений при потенциале 0,5 В приведены на рис. 1.

a



б

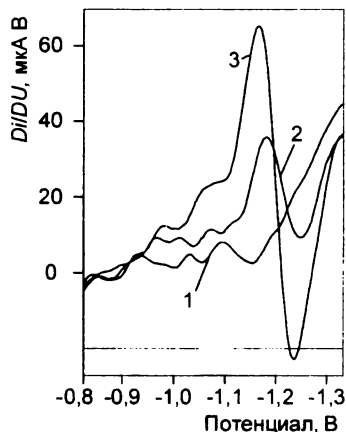


Рис. 1. ДИКВА цистеина и глутатионата серебра:
a – 0,5M NaOH + *x* мкМ цистеина, где *x* = 0 М (1), 10 (2), 20 (3);
б – 0,5M NaOH + *x* мкМ глутатиона

Из рисунка видно, что сигналы тиолов серебра регистрируются при одном и том же потенциале, близком к 1,1 В. Смещение потенциала накопления в область отрицательных значений до 0,5 В приводит к увеличению времени стабилизации вольтамперограмм, возможно, вследствие уменьшения концентрации Ag^+ в приэлектродном слое, которая определяется величиной потенциала. Смещение потенциала накопления в область положительных значений до 0 В приводит к искажению формы сигнала.

Из рис. 1, а и б видно, что сигнал от введения 10^{-4} М глутатиона составляет 35 мкА/В, тогда как сигнал, соответствующий 10^{-5} М цистеина, составляет 75 мкА/В. Это обусловлено, очевидно, большим размером и массой и, как следствие, меньшей подвижностью молекулы глутатиона по сравнению с молекулой цистеина, более медленной доставкой в зону электродной реакции, что является причиной меньшей эффективности накопления на поверхности электрода глутатионата серебра по сравнению с цистеинатом. Кроме того, сигнал восстановления глутатионата растет непропорционально концентрации глутатиона. Это затрудняет определение глутатиона и совместное определение цистеина и глутатиона в растворе. Суммарное содержание тиолов может быть определено только после разрыва трипептидных связей глутатиона. Для этого глутатион подвергали гидролизу в концентрированной хлороводородной кислоте [3], что приводит к разрыву С–С связей и образованию цистеина.

В табл. 1 приведены результаты определения цистеина, глутатиона и гидролизованного глутатиона. При определении негидролизованного глутатиона выявлена концентрация существенно ниже введенной, а при определении суммарного содержания тиолов после гидролиза глутатиона между найденной и введенной концентрацией наблюдается лучшее соответствие.

Для выяснения возможности использования описанного подхода для анализа крови пробу крови, содержащую в качестве коагулянта глюицир, смешивали с концентрированной хлороводородной кислотой (в соотношении 1:1) для разрыва связей в молекулах трипептидов. Суммарную концентрацию тиолов рассчитывали по методу стандартных добавок. В качестве стандартной добавки тиолов использовали раствор цистеина.

В табл. 2 представлены результаты определения тиольных групп в образцах крови. Найденное содержание тиолов в цельной крови составляет 1,5–3,5 мМ/л, тогда как обычное содержание тиолов соответствует 7,8–9,0 мМ/л [5]. Это, по-видимому, является следствием влияния матри-

цы крови на процесс электрохимического концентрирования тиолов на поверхности металла. Отсюда следует, что, как и многие методы, инверсионная вольтамперометрия, включающая накопление тиолов на поверхности серебряного электрода в виде соответствующих тиолатов, пригодна лишь для анализа более простых, чем кровь, образцов.

Таблица 1

Результаты определения цистеина и глутатиона в растворах ($n = 3, P = 0,95$) с использованием электродов типа 1

№ пробы	Образец (0,5M NaOH + тиольные соединения)	Введено C_1, mM	Найдено C_2, mM ($x_{cp} \pm \Delta x$)	$S_r, \%$	$R^*, \%$
1	<i>Cystein</i>	1,0	1,23 ± 0,10	8,3	123
2	<i>Glutation</i>	1,0	0,35 ± 0,08	22,2	35
3	<i>cyst + glut</i>	1,0	0,64 ± 0,06	9,9	64
4	<i>glut (hydr)</i>	1,0	0,80 ± 0,06	7,9	80
5	<i>cyst + glut (hydr)</i>	1,0	1,01 ± 0,15	14,5	101

* $R = (C_2/C_1) \cdot 100\%$ – величина, характеризующая отклонение полученного результата от истинного значения (*recovery*) [7].

Таблица 2

Содержание тиолов в образцах крови ($n = 3, P = 0,95$), найденное с использованием электродов типа 1

№ пробы	Содержание-SH, mM/л ($x_{cp} \pm \Delta x$)	$S_r, \%$
1	3,5 ± 0,24	6,9
2	1,5 ± 0,11	7,5
3	3,5 ± 0,22	6,5
4	1,8 ± 0,13	7,2

Таким образом, осложняющими обстоятельствами при определении тиолов в крови методом ИКВА с накоплением тиолатов на поверхности металлических электродов являются недостаточная воспроизводимость результатов, необходимость предварительного гидролиза глутатиона и влияние матрицы крови на результаты анализа.

Осаждение тиолов в объеме раствора в виде малорастворимых тиолатов переходных металлов. Основная идея количественного вольт-

амперометрического определения тиолов состоит в нахождении доли ионов металла (например, серебра), вступивших во взаимодействие с сульфгидрильными группами органических соединений в соответствии с уравнениями реакций (1) и (2). Источником информации о концентрации тиолов может служить сигнал электрохимических превращений металла, непрореагировавшего с *SH*-группами в растворе. Этот подход был успешно применен В. В. Соколовским для определения тиолов методом амперометрического титрования [6]. С целью упрощения и ускорения анализа, создания возможности его осуществления с помощью серийно выпускаемой недорогой аппаратуры мы использовали этот подход в варианте инверсионной вольтамперометрии.

На рис. 2 приведены инверсионные анодные вольтамперограммы (ИАВА) серебра ($E_n = -0,5$ В; $t_n = 20$ с; $v = 250$ мВ · с⁻¹). Увеличение концентрации ионов серебра в растворе, как и следовало ожидать, приводит к росту величины тока окисления накопленного на электроде серебра. Зависимость максимального тока от концентрации ионов серебра имеет прямо пропорциональный характер. В присутствии цистеина происходит падение сигнала в результате связывания ионов серебра *SH*-группами цистеина.

Результаты определения цистеина и глутатиона приведены в табл. 3. Найденные концентрации тиолов соответствуют введенным.

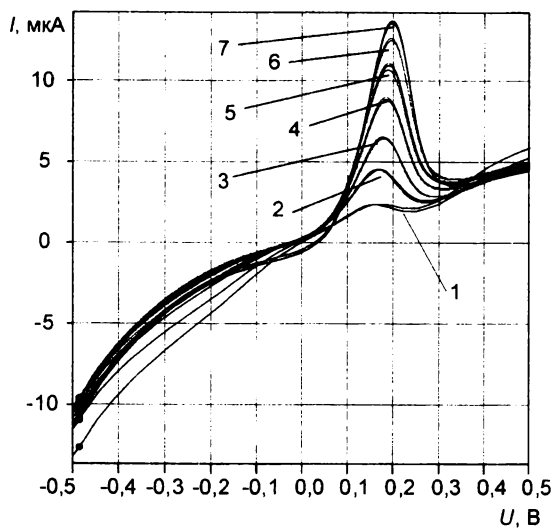
Таблица 3

Результаты определения цистеина и глутатиона в модельных растворах методом ИАВА ($n = 3$, $P = 0,95$) с использованием электрода типа 2

№ пробы	Образец (аммиачный буфер + тиольные соединения)	Введено C_1 , мкМ	Найдено C_2 , мкМ ($x_{cp} \pm \Delta x$)	S_r , %	R , %
1	<i>Cystein</i>	10	$10,3 \pm 0,4$	4,2	103
		5	$4,9 \pm 0,5$	11,2	98
2	<i>Glutation</i>	10	$9,6 \pm 0,3$	3,2	96
		5	$4,5 \pm 0,3$	7,7	90

Электрод типа 2 был использован для определения тиолов в образцах крови, стабилизированной глюциром. Введение пробы крови в раствор, содержащий ионы серебра, приводит к снижению аналитического сигнала (рис. 3, $E_n = -0,5$ В; $t_n = 30$ с; $v = 300$ мВ · с⁻¹).

a



б

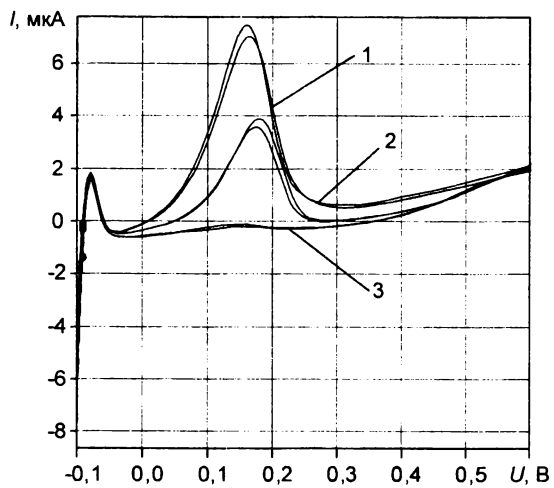


Рис. 2. ИАВА серебра состава растворов:
a – аммиачный буфер + x мкМ Ag(I) , $x = 5$ (1), 10 (2), 15 (3), 20 (4), 25 (5), 30 (6) 35 (7);
б – аммиачный буфер + Ag(I) 10 мкМ + x мкМ цистеина, $x = 0,0$ (1), 5 (2), 10 (3) (*б*)

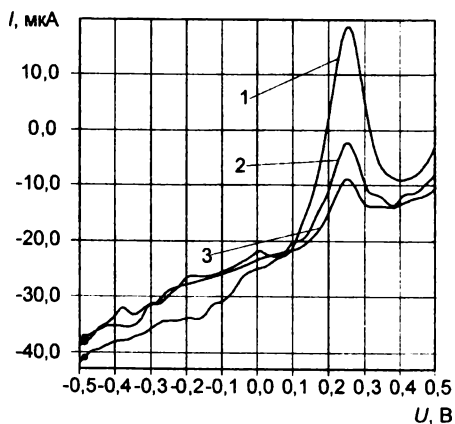


Рис. 3. ИАВА серебра состава растворов:
 1 – аммиачный буфер + 25 мкМ Ag(I), 2 – аммиачный буфер + проба крови (200 мкл);
 3 – аммиачный буфер + цистеин (5 мкМ)

На рис. 4 приведены результаты инверсионной вольтамперометрии титрования крови, стабилизированной глюцициром ($E_n = -0,5В$, $t_n = 30$ с, $v_p = 300$ мВ/с). Исходную кровь разбавляли фоном в соотношении 1:10, затем аликвоту 300 вводили в ячейку объемом 10 мл (табл. 4).

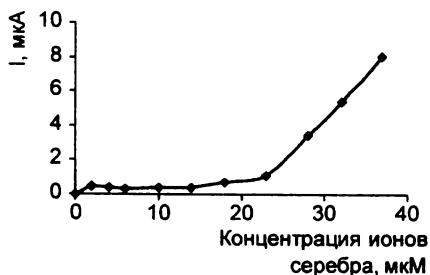


Рис. 4. Кривая инверсионной вольтамперометрии титрования пробы крови раствором соли серебра

Таблица 4

Содержание тиолов в образцах крови ($n = 3$, $P = 0,95$), стабилизированной глюцициром

Название метода	№ пробы	Содержание SH-групп, мМ/л ($x_{cp} \pm \Delta x$)	S_r , %
Метод добавок	1	$7,2 \pm 0,22$	3,1
	2	$8,4 \pm 0,47$	5,6
Метод титрования	1	7,0	3,1
	2	8,1	5,6

Метод добавок можно применять для анализа крови на содержание тиольных соединений.

Таким образом, второй подход имеет явное преимущество, поскольку позволяет проводить анализ крови без предварительного химического разрыва связей в молекуле глутатиона.

Библиографический список

1. Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб., 2000.
2. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. М., 2001.
3. Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М., 1971.
4. Кулинский В. И., Колисниченко Л. С. Биологическая роль глутатиона // Успехи современной биологии. 1990. Т. 110, № 1(4).
5. Солдатова Г. С. и др. Современные лечебные и диагностические технологии в специализированной медицинской помощи. Новосибирск, 1997.
6. Соколовский В. В. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель неспецифической резистентности организма: Учеб. пособие. СПб., 1996.
7. Основы аналитической химии / Под ред. Ю. А. Золотова. М., 2002.