

На правах рукописи



Зиятдинова Гузель Камилевна

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ
ИНТЕГРАЛЬНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЕМКОСТИ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

02.00.02 - аналитическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Казань-2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического института им. А.М.Бутлерова государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Казанского государственного университета им. В.И.Ульянова-Ленина"

Научный руководитель: академик РАЕН и МАНВШ,
доктор химических наук,
профессор Будников Герман Константинович

Научный консультант: кандидат медицинских наук,
доцент Погорельцев Валерий Ильич

Официальные оппоненты доктор химических наук,
профессор Гармонов Сергей Юрьевич
кандидат химических наук,
доцент Казымова Марина Александровна

Ведущая организация: Уральский государственный
экономический университет

Защита состоится « 9 » июня 2005 г. в 14 ч. на заседании диссертационного Совета К 212.081.04 по химическим наукам Казанского государственного университета по адресу: ул. Кремлевская 18, КГУ, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу:
420008, г. Казань, ул. Кремлевская 18, КГУ, Научная часть.

Автореферат разослан « 6 » мая 2005 г.

Ученый секретарь Совета,
кандидат химических наук



Л.Г.Шайдарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Антиоксиданты (АО) - это важнейший объект исследования и анализа в науках о жизни. Причин 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. Биоантиоксиданты создают систему антиоксидантной защиты, в которой они снижают одновременно как интенсивность свободнорадикального окисления, так и тяжесть клинических симптомов. Поэтому очень важной становится проблема контроля состояния антиоксидантной системы организма человека, а, следовательно, и антиоксидантного статуса при патологиях различного типа с целью дальнейшей терапевтической коррекции. Клиническая диагностика антиоксидантного (оксидантного, так как эти две системы уравнивают друг друга в рамках гомеостаза) статуса организма затруднена, поскольку в практической медицине отсутствуют лабораторно-биохимические методы, позволяющие дать интегральную оценку этого параметра. Существуют клинические методики, по которым оценивают отдельные лабораторные показатели (содержание продуктов перекисного окисления липидов (**ПОЛ**): малонового диальдегида, диеновых конъюгатов; активность супероксиддисмутазы (**СОД**) и каталазы), которые не всегда пригодны для доказательной диагностики и терапевтической коррекции патологического процесса.

Однако следует отметить, что в последнее время все большее внимание уделяется способам определения суммарного содержания АО, которое можно рассматривать как общий показатель состояния объекта анализа в оценке его антиоксидантных свойств, отражающей антиоксидантный статус организма. Существующие способы контроля АО основаны на применении хроматографии, спектрофотометрии и хемилюминесцентных методов, являющихся весьма трудоемкими, длительными и дорогостоящими. При этом в ряде случаев определяются или индивидуальные АО, или только отдельные их группы. Полученные результаты исследований часто несопоставимы, поскольку получены с использованием различных модельных систем.

Интенсивные исследования последних лет по созданию способов оценки антиоксидантных свойств биосубстратов свидетельствуют о том, что проблема разработки новых, экспрессных, универсальных и доступных методов их определения остается актуальной.

Основное свойство АО заключается в их способности легко окисляться и принимать участие в радикальных и окислительно-восстановительных реакциях. Поэтому определенную перспективу представляют способы скрининга антиоксидантной емкости (**АОЕ**) биосубстратов с помощью электрохимических методов.

Цель работы: показать возможность применения электрохимических методов для определения широкого круга индивидуальных биологически активных веществ различного строения, объединяемых понятием "антиоксидант", в лекарственных формах и биологических жидкостях и для оценки общего пока-

зателя "интегральная АОЕ", по которому можно сделать заключение о состоянии системы антиоксидантной защиты организма человека, а, следовательно, и об его антиоксидантном статусе.

В соответствии с целью исследования в работе поставлены следующие задачи:

- показать возможность применения гальваностатической кулонометрии и вольтамперометрии для определения индивидуальных АО различной природы в модельных растворах, лекарственных формах и биологических жидкостях человека;
- оценить возможность кулонометрического определения индивидуальных АО в присутствии биологической матрицы;
- разработать способы электрохимической оценки интегральной АОЕ биологических жидкостей, пригодных для клинических лабораторий;
- определить интегральную АОЕ крови и ее компонентов с применением электрогенерированных частиц брома и кислорода.
- выявить взаимосвязь между интегральной АОЕ и основными индивидуальными показателями антиоксидантного статуса: содержанием малонового диальдегида, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и металлов переменной валентности (Fe, Си, Мп, Сг и Ni) и активностью каталазы.

Научная новизна. Определены стехиометрические коэффициенты в реакциях ряда АО (восемь соединений) с электрогенерированными галогенами и на основе экспериментальных и литературных данных предложены возможные схемы реакций. Установлены потенциалы окисления АО на стационарных электродах из платины, графита и стеклогуглерода в условиях вольтамперометрии, обсуждены соответствующие схемы реакций. Найдены условия электрохимической генерации супероксид анион-радикала. Рассчитаны кинетические параметры его реакций с важнейшими АО. Установлено, что процесс следует ЕС-механизму.

В работе применен подход к оценке интегральной АОЕ биологических жидкостей с использованием электрогенерированных частиц брома и кислорода. Электрохимическая генерация супероксид анион-радикала позволяет моделировать процессы, происходящие в живых системах.

Установлено, что компоненты плазмы крови окисляются в условиях вольтамперометрии, ток окисления является мерой АОЕ. Определен круг низкомолекулярных АО, которые вносят вклад в АОЕ в этом случае.

Проведено определение интегральной АОЕ крови и ее компонентов при различных типах патологий, прослежено ее изменение в ходе медикаментозной терапии.

Установлены корреляционные зависимости между величинами АОЕ, полученными кулонометрически и вольтамперометрически.

Выявлена взаимосвязь между величиной интегральной АОЕ и содержанием малонового диальдегида, ЛПНП и металлов переменной валентности (Fe, Си, Мп, Сг и Ni) и активностью каталазы.

Практическая значимость. Разработаны способы кулонометрического и вольтамперометрического определения фармпрепаратов: липоевой кислоты,

катехоламинов (адреналина и допамина), мексидола, рутина и кверцетина, витаминов А и Е, кальциферолов в модельных растворах и в их лекарственных формах с величинами S_i от 0,01 до 0,09; глутатиона и сывороточного альбумина в модельных растворах и в крови человека с величиной S_i от 0,01 до 0,09. Предложен способ определения суммарного содержания свободных жирорастворимых АО в сыворотке крови человека в пересчете на а-токоферол.

Разработан подход кулонометрического определения индивидуальных АО на фоне, содержащем компоненты биологического происхождения, в частности, сыворотки крови, позволяющий свести к минимуму мешающее влияние матрицы.

Обнаружено взаимное влияние природных полифенолов и синтетического пространственно-затрудненного фенола - ионола, то есть системы полифенол - ионол при различных соотношениях компонентов. При введении ионола наблюдается каталитический эффект. Установлены соотношения, при которых наблюдается максимальное увеличение волны окисления полифенолов, что связано с регенерацией молекулы полифенола.

Проведена оценка интегральной АОЕ крови и ее компонентов при различных типах патологий. На основе экспериментальных данных величина АОЕ предлагается для предварительного скрининга антиоксидантного статуса организма человека и как показатель качества лечения, в том числе и при оперативных вмешательствах, то есть может служить репером в ходе лечения пациентов с различными типами патологий.

Разработанные способы определения интегральной АОЕ характеризуются точностью, хорошей воспроизводимостью и экономичностью и могут быть рекомендованы к применению в клинических лабораториях для первичного скрининга антиоксидантного статуса организма человека и его последующей коррекции.

На защиту выносятся:

1. Разработанные способы определения фармацевтических препаратов различной природы в модельных растворах и лекарственных формах методами гальваностатической кулонометрии с помощью электрогенерированных галогенов и вольтамперометрии.
2. Предложенные электрохимические способы определения глутатиона, сывороточного альбумина и жирорастворимых АО в биологических жидкостях.
3. Результаты исследования взаимного влияния природных полифенолов и синтетического пространственно-затрудненного фенола - ионола по данным вольтамперометрии.
4. Результаты определения интегральной АОЕ крови и ее компонентов с помощью электрогенерированного брома и супероксид-анион-радикала и обсуждение корреляции АОЕ с содержанием малонового диальдегида, ЛПНП и металлов переменной валентности (Fe, Си, Мп, Сг и Ni) и активностью катализаторов.
5. Величины интегральной АОЕ крови и ее компонентов при различных типах патологических процессов в организме, в том числе и генетического характера. Влияние антиоксидантной терапии на интегральную АОЕ.

6. Разработанный вольтамперометрический способ оценки интегральной АОЕ плазмы крови.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены в устных докладах на VIII Научно-практической конференции молодых ученых КГМУ (Казань, 2003 г.), Объединенной международной научной конференции "Новая геометрия природы" (Казань, 2003 г.), IX Всероссийской научно-практической конференции "Молодые ученые в медицине" (Казань, 2004 г.), Всероссийской конференции "Аналитика России" (Москва, 2004 г.), Итоговой научной конференции Казанского государственного университета (Казань, 2005 г.) и стендовых докладах на III Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003 г.), X Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2003 г.), IV Всероссийской конференции молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" (Саратов, 2003 г.), XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003 г.), IV Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2004 г.), VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием (Уфа, 2004 г.), V Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2005 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 статей и тезисы 15 докладов. Издано методическое пособие и получен патент РФ.

Диссертация выполнена при поддержке программы "Университеты России" (проект 06.01.004 "Реакции электрохимически генерированных частиц кислорода и галогенов с антиоксидантами и их применение в анализе сложных биологических объектов" и проект 06.01.085 "Возникающие реагенты в электроаналитической химии антиоксидантов") и научно образовательной программы CRDF и Минобразнауки РФ (НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века" REC-007 "Развитие методов оценки антиоксидантных свойств биологического материала, основанных на электрохимии" и "Вольтамперометрическая оценка интегральной антиоксидантной емкости плазмы крови"), фанта АН РТ № 07-7.3-176 "Создание научных основ определения интегральной антиоксидантной емкости биологических жидкостей и оценки антиокислительного статуса организма человека" и гранта Федерального агентства по образованию № А04-2.11-116 "Электрохимическая оценка антиоксидантных свойств соединений фенольного ряда".

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 187 страницах, содержит 42 таблицы, 37 рисунков и библиографию из 213 наименований. Работа состоит из предисловия, введения, литературного обзора, трех глав экспериментальной части, в которых описана постановка задачи, аппаратура, объекты и техника эксперимента и изложены результаты с их обсуждением, выводов и списка цитируемой литературы.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

В литературном обзоре (глава 1) рассмотрены общие вопросы, связанные с АО как объектами анализа, способы их определения в биологических объектах, приведены соответствующие метрологические показатели. Дана характеристика общему показателю интегральная АОЕ и описаны способы его оценки.

Во второй главе представлены данные об объектах исследования, используемых методах и приборах, описаны условия эксперимента.

Главы 3 и 4 посвящены обсуждению полученных результатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Электрогенерацию галогенов осуществляли на потенциостате П-5827 М при постоянной силе тока 5,0 мА из водных 0,2 М растворов КСl и КВг в 0,1 М H_2SO_4 и Кl на фоне виннокислого буферного раствора с $pH=3,56$. Кроме того, электрогенерацию брома и иода проводили из 0,2 М $(C_2H_3)_4NBг$ в 0,1 М $HClO_4$ и 0,1 М $(C_2H_3)_4M$ в 0,5 М $NaClO_4$ в ацетонитриле, соответственно, со 100 % выходом по току. Конечную точку кулонометрического титрования определяли амперометрически с двумя поляризованными игольчатыми платиновыми электродами ($\Delta E=300$ мВ). Кривая кулонометрического титрования имеет в и д .

Для автоматической регистрации вольтамперограмм использовали двухкоординатный регистрирующий прибор ПДА-1 и анализатор "Экотест-ВА". Вольтамперограммы исследуемых растворов регистрировали на стационарных электродах с линейной разверткой потенциала. Для измерения использовали рабочие электроды из платины, графита и стеклоуглерода. Вспомогательный электрод состоял из платиновой проволоки, свернутой спиралью. В качестве электрода сравнения использовали насыщенный каломельный и хлоридсеребряный электроды.

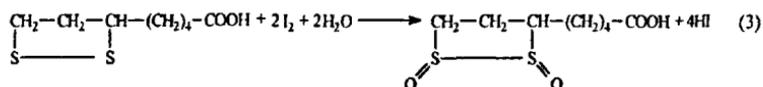
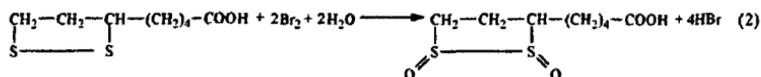
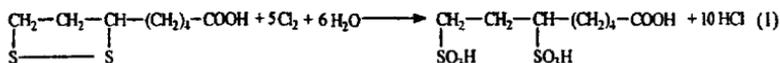
В работе использовали реактивы марок о.с.ч., х.ч., ч.д.а. и фармакопейной чистоты. Образцы крови и ее компонентов получали следующим образом. Брали артериальную (из артериального шунта у пациентов с ХПН) и венозную (из локтевой вены) кровь. Кровь помещали в пробирки, содержащие небольшое количество гепарина в качестве антикоагулянта. Плазму крови получали центрифугированием в течение 5 минут при 3000 об/мин. Для получения сыворотки цельную кровь помещали в чистые сухие центрифужные пробирки и оставляли стоять некоторое время, после чего осторожно тонкой стеклянной палочкой обводили стенки пробирки для отделения сгустка, а затем центрифугировали. Прозрачный центрифугат - сыворотка крови.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Электрохимическое определение индивидуальных антиоксидантов
в биологических жидкостях и лекарственных формах

Методами гальваностатической кулонометрии и вольтамперометрии проведено определение индивидуальных АО в модельных растворах, лекарственных формах и биологических жидкостях. Для кулонометрического определения были исследованы кулонометрические титранты-окислители - галогены I_2 , Br_2 , Cl_2 .

Липоевая кислота. Результаты кулонометрического титрования позволили установить стехиометрические коэффициенты реакций липоевой кислоты с электрогенерированными хлором, бромом и иодом, протекающих по схемам:



Результаты кулонометрического определения АО в модельных растворах представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты кулонометрического определения липоевой кислоты в модельных растворах электрогенерированными галогенами ($n=5$, $p=0,95$)

Титрант	Введено, мкг	Найдено, мкг	S_r
Cl_2	48	$48,0 \pm 0,9$	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
	192	191 ± 4	0,02
	288	282 ± 3	0,02

Установлено, что в условиях вольтамперометрии липоевая кислота окисляется лишь на стеклоуглеродном электроде на фоне $0,05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. На вольтамперограммах наблюдается пик окисления при потенциале $0,72 \text{ В}$.

Предельный ток окисления линейно возрастает с повышением концентрации липоевой кислоты в интервале концентраций: $1,15 \times 10^{-5} \div 1,73 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Уравнение регрессии имеет следующий вид:

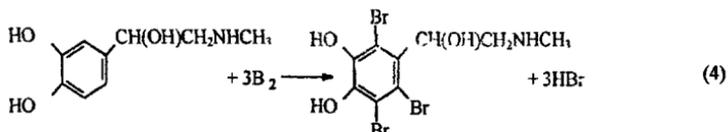
$$Y = (1,07 \pm 0,03) + (0,152 \pm 0,003) X \quad r = 0,9999$$

Нижняя граница определяемых содержаний липоевой кислоты (по 3σ критерию) составила $5,75 \times 10^{-6}$ М.

Катехоламины. Исследована возможность кулонометрического определения катехоламинов: адреналина и допамина.

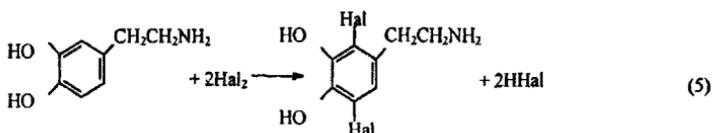
Адреналин реагирует быстро и количественно только с электрогенерированными Br_2 и I_2 , с Cl_2 реакция протекает неоднозначно вследствие его высокой реакционной способности.

В реакции адреналина с электрогенерированными Br_2 и I_2 участвуют три электрона. По результатам кулонометрического титрования можно предложить следующую схему реакции:



Аналогично протекает реакция с электрогенерированным иодом.

Допамин взаимодействует лишь с электрогенерированными Cl_2 и Br_2 с участием двух электронов. Полученные результаты позволили предложить следующую схему:



Результаты кулонометрического определения катехоламинов в модельных растворах представлены в табл. 2. Правильность оценена по способу "введено" - "найдено".

Таблица 2

Результаты кулонометрического определения адреналина и допамина в модельных растворах ($n=5$, $p=0,95$)

Определяемое соединение	Титрант	Введено, мкг	Найдено, мкг	S_r
Допамин	Cl_2	100	101±4	0,04
		300	296±6	0,02
		500	495±4	0,01
	Br_2	100	100±4	0,03
		200	198±6	0,03
		300	299±4	0,01
Адреналин	Br_2	100	93±2	0,02
		300	278±13	0,04
		500	461±6	0,01
	I_2	100	99±6	0,05
		200	200±6	0,02
		300	297±4	0,01

На основе полученных результатов проведено определения содержания основного компонента в лекарственных формах катехоламинов, что иллюстрирует табл. 3.

Таблица 3
Результаты кулонометрического определения катехоламинов в лекарственных препаратах (n=5, p=0,95)

Объект	Определяемое соединение	Содержание, мг/мл	Титрант	Найдено, мг/мл	S _r
Адреналина гидротартрат, раствор для инъекций	Адреналин	1,0	Br ₂	0,982±0,006	0,01
			I ₂	0,985±0,004	0,01
Допамин, раствор для инъекций	Допамин	5,0	Cl ₂	4,95±0,04	0,01
			Br ₂	4,98±0,07	0,01

Для вольтамперометрического определения катехоламинов применяли стационарные электроды из платины, графита и стеклоуглерода.

Кислород воздуха очень легко окисляет гидрохиноновый фрагмент молекул катехоламинов, а в щелочных средах окисление значительно ускоряется, поэтому определение проводили на фоне 0,1 М H₂SO₄.

На циклических вольтамперограммах адреналина и допамина наблюдаются обратимые пики окисления при 0,7, 0,7 и 0,58 В на стационарных электродах из платины, графита и стеклоуглерода соответственно. Анодный ток связан с концентрацией катехоламинов.

Параметры градуировочных зависимостей тока окисления катехоламинов от их концентрации представлены в табл. 4.

Таблица 4
Параметры градуировочных зависимостей для анодного пика на фоне 0,1 М H₂SO₄ от концентрации катехоламинов

Определяемое соединение	Электрод	Нижняя граница определяемых концентраций, М	Диапазон концентраций, М	Уравнение регрессии y=a+bx		R
				a	b×10 ⁻³	
Допамин	Графит	3,3×10 ⁻⁵	6,5×10 ⁻⁵ +1,6×10 ⁻³	2±1,4	60,8±0,2	0,9999
	СУ	1,1×10 ⁻⁵	6,5×10 ⁻⁵ +5,4×10 ⁻³	58±16	336±6	0,9993
	Рт	6,5×10 ⁻⁵	9,2×10 ⁻⁵ +1,1×10 ⁻³	-0,4±0,1	2,82±0,02	0,9996
Адреналин	Графит	1,6×10 ⁻⁵	2,2×10 ⁻⁵ +1,8×10 ⁻³	-3±1	120±10	0,9997
	СУ	3,3×10 ⁻⁵	1,6×10 ⁻⁵ +1,1×10 ⁻³	2,3±2,1	1040±40	0,9965
	Рт	1,1×10 ⁻⁴	1,2×10 ⁻⁴ +1,4×10 ⁻³	-0,5±0,1	7,6±0,2	0,9982

Результаты вольтамперометрического определения катехоламинов в модельных растворах представлены в табл. 5.

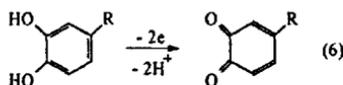
Известно, что гидрохинон и родственные соединения, содержащие в своей структуре гидрохиноновый фрагмент, окисляются по двухэлектронному меха-

Таблица

Результаты вольтамперометрического определения катехоламинов
в модельных растворах (n=5, p=0,95)

Определяемое соединение	Электрод	Введено, мг	Найдено, мг	S _r
Допамин	Графит	0,3	0,283±0,008	0,02
		2,5	2,48±0,04	0,01
		25,0	24,79±0,07	0,01
	Стеклоуглерод	0,5	0,52±0,02	0,03
		5,0	5,00±0,01	0,01
		10,0	9,67±0,09	0,01
	Pt	0,25	0,24±0,01	0,06
		2,5	2,47±0,02	0,01
		5,0	4,97±0,03	0,01
Адреналин	Графит	0,08	0,076±0,003	0,03
		1,0	0,99±0,03	0,02
		5,0	4,98±0,08	0,01
	Стеклоуглерод	0,06	0,057±0,002	0,03
		1,0	0,998±0,002	0,01
		3,0	2,9±0,1	0,03
	Pt	0,5	0,50±0,02	0,03
		3,0	2,9±0,1	0,03
		5,0	4,96±0,06	0,01

низму. Электрохимическое окисление катехоламинов на электродах протекает согласно схеме 6 с образованием соответствующих хинонов.



На основе полученных данных определено содержание основного (действующего) вещества в фармацевтических препаратах катехоламинов (табл. 6).

Таблица 6

Результаты вольтамперометрического определения содержания действующего вещества в лекарственных формах катехоламинов (n=5, p=0,95)

Объект	Определяемое соединение	Содержание, мг/мл	Электрод	Найдено, мг/мл	S _r
Адреналина гидротартрат, раствор для инъекций	Адреналин	1,0	Графит	0,97±0,02	0,02
			Стеклоуглерод	0,99±0,01	0,01
			Pt	0,97±0,02	0,01
Допамин, раствор для инъекций	Допамин	5,0	Графит	4,9±0,2	0,03
			Стеклоуглерод	4,99±0,02	0,01
			Pt	4,9±0,1	0,02

Мексидол. Предложен вольтамперометрический способ определения мексидола, являющегося АО, на стеклоуглеродном электроде на фоне 0,1 М H₂SO₄. На вольтамперограмме проявляется пик окисления при потенциале 0,5 В (рис.1).

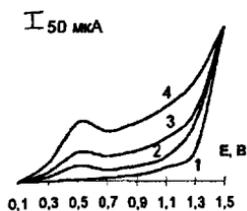


Рис. 1. Вольтамперограммы окисления мексидола различной концентрации (М) на стеклоуглеродном электроде на фоне 0,1 М H₂SO₄: 1- 0; 2- 4,8×10⁻³; 3- 9,3×10⁻³; 4- 1,8×10⁻², скорость изменения потенциала 20 мВ/с.

Экспериментально установлено, что сукцинатный остаток не проявляет себя в условиях опыта. Определено содержания основного (действующего вещества) в фармпрепарате.

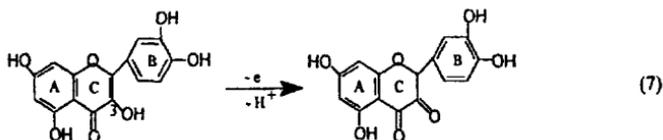
Флавонолы. Рутин и кверцетин окисляются на стационарных электродах из платины, графита и стеклоуглерода. Потенциалы окисления представлены в табл. 7.

Таблица 7

Потенциалы окисления флавонолов на стационарных электродах

Соединение	Фоновый электролит			
	0,1 М H ₂ SO ₄		Фосфатный буферный р-р, pH 7,4	
	Pt	Графит	Pt	Графит
Рутин	+0,6; +1,1	+0,6	+0,4	+0,3
Кверцетин	+0,6; +0,85	+0,5	+0,7	+0,3

Исходя из структуры флавонолов и имеющихся литературных данных, можно предположить, что в кислой среде в первую очередь окисляется гидроксильная группа кольца С (схема 7) с образованием устойчивой о-хиноидной структуры, а затем другие ОН-группы.



Молекула рутина содержит гликозидный остаток в положении 3. Поскольку растворение проводили в щелочной среде, то в результате гидролиза, по-видимому, образуется ОН-группа в кольце С. В щелочной среде протекает только реакция окисления гидроксильной группы в кольце С.

Параметры градуировочных зависимостей для рутина и кверцетина представлены в табл. 8.

Таблица 8

Параметры градуировочных зависимостей высоты волны окисления от концентрации флавонолов

Определяемое соединение	Электрод	Фоновый электролит	Диапазон концентраций, М	Уравнение регрессии $Y=a+bX$		R
				a	$b \times 10^{-4}$	
Рутин	Pt	0,1 М H ₂ SO ₄	$7,9 \times 10^{-6} + 2,0 \times 10^{-4}$	$0,5 \pm 0,4$	$8,9 \pm 0,4$	0,9973
		Фосфатный буферный р-р, рН 7,4	$3,1 \times 10^{-5} + 2,0 \times 10^{-4}$	$3,2 \pm 0,3$	$9,9 \pm 0,3$	0,9993
	Графит	0,1 М H ₂ SO ₄	$2,4 \times 10^{-5} + 2,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \pm 0,4$	$8,3 \pm 0,3$	0,9987
		Фосфатный буферный р-р, рН 7,4	$2,4 \times 10^{-5} + 2,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,2$	0,9978
Кверцетин	Pt	0,1 М H ₂ SO ₄	$8,7 \times 10^{-5} + 6,8 \times 10^{-4}$	$0,07 \pm 0,03$	$3,56 \pm 0,07$	0,9994
		Фосфатный буферный р-р, рН 7,4	$8,7 \times 10^{-5} + 5,7 \times 10^{-4}$	$-1,5 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,1$	0,9981

Полученные результаты использовали для определения содержания рутина в таблетках рутина и аскорутина, а также кверцетина в таблетках кверцетина (табл. 9).

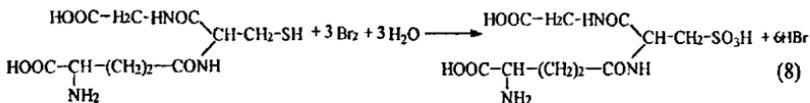
Таблица 9

Результаты вольтамперометрического определения рутина и кверцетина в лекарственных формах ($n=5$, $p=0,95$)

Объект	Определяемое соединение	Содержание, мг	Электрод	Фоновый электролит	Найдено, мг	S _r
Таблетки рутина	Рутин	20	Pt	0,1 М H ₂ SO ₄ рН 7,4	20 ± 2 18 ± 2	0,08 0,09
			Графит	0,1 М H ₂ SO ₄ рН 7,4	20 ± 1 19 ± 2	0,05 0,09
Таблетки кверцетина	Кверцетин	20	Pt	0,1 М H ₂ SO ₄ рН 7,4	19 ± 2 $19,6 \pm 0,6$	0,06 0,03
Таблетки аскорутина	Рутин	50	Pt	0,1 М H ₂ SO ₄ рН 7,4	48 ± 2 47 ± 3	0,03 0,05
			Графит	0,1 М H ₂ SO ₄ рН 7,4	51 ± 2 45 ± 4	0,04 0,08

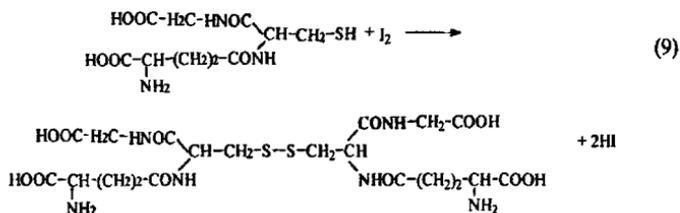
Определение АО в биологических жидкостях, а не только в модельных системах, несомненно, представляет актуальную задачу.

Глутатион. Установлено, что реакции глутатиона с электрогенерированными хлором и бромом протекают с участием 6 электронов. Исходя из результатов кулонометрического определения можно предложить следующие схемы взаимодействия:



По аналогичной схеме протекает реакция с электрогенерированным хлором.

С иодом реакция протекает с участием 2e согласно схеме 9.



Глутатион окисляется на платиновом стационарном электроде только в кислой среде.

На вольтамперограммах глутатиона на фоне 0,05 М H₂SO₄ регистрируется волна с E_{1/2} 0,95 В, высота которой связана с концентрацией глутатиона (рис. 2). При более высоких концентрациях глутатиона волна окисления приобретает форму пика.

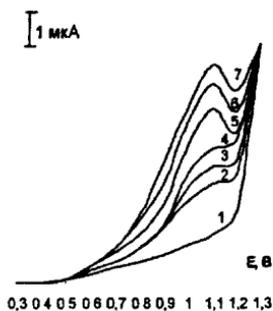


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления глутатиона при различных концентрациях (М) на фоне 0,05 М H₂SO₄ на платиновом электроде: 1 - 0; 2 - 3,6 × 10⁻⁴; 3 - 6,8 × 10⁻⁴; 4 - 9,8 × 10⁻⁴; 5 - 1,3 × 10⁻³; 6 - 1,5 × 10⁻³; 7 - 1,7 × 10⁻³, скорость изменения потенциала 20 мВ/с.

Разработаны способы определения глутатиона в крови. В основе определения лежит предварительное осаждение белков трихлоруксусной кислотой с последующим осаждением и изолированием глутатиона раствором сульфата кадмия. При этом другие редуцирующие вещества, способные помешать определению, остаются в растворе. Осадок, содержащий глутатион, растворяли в 1 М HCl. Полученный прозрачный раствор титровали электрогенерированными бромом и иодом. Результаты кулонометрического определения глутатиона представлены в табл. 10.

Для вольтамперометрического определения интервал линейности градуировочного графика 9,15 × 10⁻⁵ ÷ 2,14 × 10⁻³ М укладывается в диапазон реальных содержаний глутатиона в крови с учетом разбавления. Результаты определения

Таблица 10

Результаты кулонометрического определения глутатиона в крови человека
($n=5$, $p=0,95$)

№	Титрант	Содержание глутатиона, г/л	S_r
1	Br_2	$0,59 \pm 0,07$	0,07
	I_2	$0,61 \pm 0,06$	0,08
2	Br_2	$0,54 \pm 0,04$	0,08
	I_2	$0,57 \pm 0,07$	0,09

глутатиона в образцах крови вольтамперометрическим методом сопоставляли с результатами кулонометрического определения (табл. 11).

Таблица 11

Результаты электрохимического определения глутатиона в крови человека
($n=5$, $p=0,95$).

№	Найдено кулонометрически, М	S_r	Найдено вольтамперометрически, М	S_r
1	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	0,07	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	0,06
2	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	0,09	$(1,85 \pm 0,09) \times 10^{-3}$	0,05

Предложенные способы электрохимического определения глутатиона в крови характеризуются хорошей воспроизводимостью и обеспечивают высокую производительность, что позволяет рекомендовать их для применения в клинических лабораториях.

Сывороточный альбумин проявляет сильные антиоксидантные свойства, которые связывают с наличием серосодержащих функциональных групп.

Результаты кулонометрического титрования позволили установить стехиометрические коэффициенты реакции с электрогенерированными бромом и иодом, которые составляют 1:73 и 1:64 соответственно как для лиофильного альбумина, так и в случае использования в качестве стандарта 10% раствора сывороточного альбумина. Электрогенерированные бром и иод реагируют с сульфгидрильными и дисульфидными группами, которые окисляются до сульфо-группы с участием 6 и 5 электронов соответственно.

Предложен способ кулонометрического определения альбумина в сыворотке крови человека, основанная на предварительном осаждении белков сыворотки Na_2SO_4 и последующей экстракции альбумина диэтиловым эфиром. Результаты определения альбумина в сыворотке крови представлены в табл. 12.

Таблица 12

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
1	46 ± 1	0,02	45 ± 6	0,07
2	40 ± 2	0,04	41 ± 5	0,08
3	36 ± 2	0,04	33 ± 8	0,09
4	38 ± 2	0,04	37 ± 5	0,07
5	30 ± 2	0,05	28 ± 6	0,09

* Спектрофотометрическое определение альбумина в сыворотке крови.

Жирорастворимые биоантиоксиданты (α-токоферол, ретинол, кальциферолы) играют важную роль в живых системах. Именно они инактивируют свободные радикалы и тем самым защищают мембраны клеток от перекисного окисления.

Установлено, что α-токоферол и ретинол окисляются на стационарном платиновом микроэлектроде на фоне 0,1 М HClO₄ и 0,1 М CH₃COONa в ацетонитриле (рис. 3).

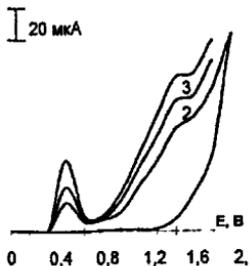
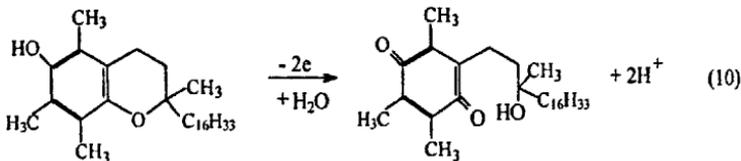


Рис.3. Вольтамперограммы окисления α-токоферола на платиновом электроде на фоне 0,1 М HClO₄ в ацетонитриле. С(М): 1 - 0; 2 - 1,88×10⁻³; 3 - 2,45×10⁻³; 4 - 4,48×10⁻³, скорость изменения потенциала 20 мВ/с.

Предельный ток пика линейно возрастает с повышением концентрации α-токоферола от 6,56×10⁻⁴ до 4,48×10⁻³ М. Нижняя граница определяемых концентраций составляет 0,27 мМ.

На фоне 0,1 М CH₃COONa в ацетонитриле также наблюдается две волны окисления α-токоферола, при этом линейная зависимость высот волн от концентрации отсутствует.

Первая ступень на вольтамперограммах α-токоферола соответствует, по-видимому, окислению до п-токоферилхинона по схеме 10. При потенциалах второй ступени, вероятно, происходят более глубокие превращения продуктов реакции по первой ступени.



На вольтамперограммах ретинола на фоне 0,1 М HClO₄ в ацетонитриле наблюдается две волны окисления приблизительно равной высоты при E_{1/2} 0,5 В и E_{1/2} 0,78 В.

Это позволяет предположить, по аналогии с электрохимическим поведением спиртов с ненасыщенными связями в цепи сопряжения, что ретинол окисляется сначала до ретиналя, а затем до ретиноевой кислоты.

На фоне 0,1 М CH₃COONa в ацетонитриле также проявляются две волны окисления, но первая очень слабо выражена. Вторая волна окисления ретинола наблюдается при E_{1/2} 0,92 В.

Судя по величинам высот волн и потенциалам полуволн, механизмы окисления ретинола на фоне 0,1 М HClO₄ и 0,1 М CH₃COONa в ацетонитриле отли-

чаются. Действительно, как известно из литературных данных, в щелочной среде ретинол неустойчив вследствие окисления кислородом воздуха. Первоначальным продуктом окисления являются его 5,6- и 7,8-эпокси. Возможное окисление на электроде этих продуктов в щелочной среде будет происходить при более положительных потенциалах.

Уравнение регрессии для ретинола на фоне 0,1 М CH_3COONa в АН имеет две области линейной зависимости (табл. 13).

Таблица 13

Градуировочные зависимости высоты первой волны окисления от концентрации ретинола на платиновом электроде

Фон	Диапазон концентраций, М	Уравнение регрессии $y=a+bx$		R
		a	b	
0,1 М HClO_4 в ацетонитриле	$8,22 \times 10^{-5}$ до $1,08 \times 10^{-3}$	5 ± 2	$2,3 \pm 0,2$	0,984
0,1 М CH_3COONa в ацетонитриле	$8,22 \times 10^{-5}$ до $5,79 \times 10^{-4}$ $7,54 \times 10^{-4}$ до $1,66 \times 10^{-3}$	$5,8 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,1$	0,997
		22 ± 2	$5,0 \pm 0,1$	0,999

Результаты вольтамперометрического определения ретинола и α -токоферола в модельных растворах представлены в табл. 14.

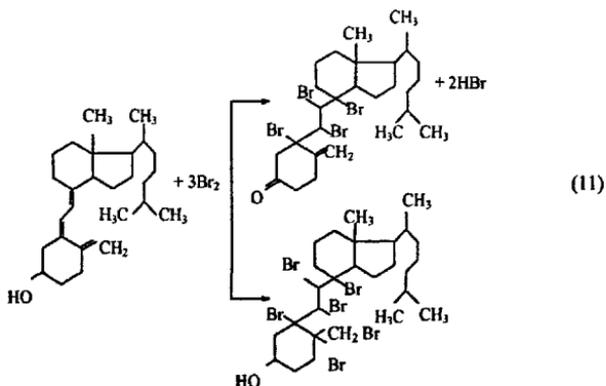
Таблица 14

Результаты вольтамперометрического определения ретинола и α -токоферола на платиновом электроде в модельных растворах ($n=5, p=0,95$)

Определяемое соединение	Фоновый электролит	Введено, мг	Найдено, мг	S_r
Ретинол	0,1 М HClO_4 в ацетонитриле	0,48	$0,47 \pm 0,03$	0,06
		1,2	$1,31 \pm 0,04$	0,03
		2,4	$2,29 \pm 0,09$	0,04
	0,1 М CH_3COONa в ацетонитриле	2,4	$2,19 \pm 0,09$	0,04
		4,8	$4,6 \pm 0,2$	0,04
		7,1	$7,2 \pm 0,2$	0,03
α -Токоферол	0,1 М HClO_4 в ацетонитриле	17,4	$17,40 \pm 0,04$	0,01
		34,8	$37,0 \pm 0,3$	0,01
		46,3	$45,6 \pm 0,6$	0,01

Для кулонометрического определения жирорастворимых АО исследованы электрогенерированные титранты-окислители I_2 и Br_2 . Установлено, что реакция протекает быстро и количественно только с электрогенерированным Br_2 . Титрант I_2 в реакцию не вступает.

Полученные результаты позволили установить стехиометрические коэффициенты реакции ретинола, эргокальциферола и холекальциферола с электрогенерированным Br_2 , равные 1:2, 1:7 и 1:3 соответственно. В связи с возможностью различных путей протекания процесса окисления строгой схемы реакции для ретинола и эргокальциферола привести сложно. Исходя из результатов кулонометрического титрования холекальциферола, можно предложить следующую схему взаимодействия (схема 11).



Результаты кулонометрического определения жирорастворимых АО в модельных растворах представлены в табл. 15.

Таблица 15

Результаты кулонометрического определения жирорастворимых антиоксидантов с помощью электрогенерированного брома ($n=5$, $p=0,95$)

Определяемое соединение	Введено, мкг	Найдено, мкг	S,
Ретинол	2378	2330±40	0,01
	4756	4800±50	0,01
	7134	7230±40	0,01
Эргокальциферол	31	26±2	0,05
	63	63±3	0,03
	78	88±3	0,03
Холекальциферол	50	56±4	0,05
	75	74±2	0,02
	100	103±7	0,04

На основе полученных данных предложен способ кулонометрического определения свободных жирорастворимых АО в сыворотке крови человека в пересчете на а-токоферол, основанная на экстракции жирорастворимых витаминов из сыворотки крови человека смесью петролейного эфира и спирта (1:1) и последующем кулонометрическом титровании электрогенерированным Br_2 . Результаты определения представлены в табл. 16.

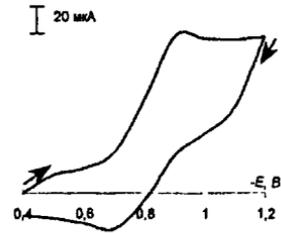
На стеклоуглеродном электроде на фоне $0,05 \text{ M } (C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде кислород восстанавливается с образованием супероксид анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$). На циклической вольтамперограмме наблюдается обратимый пик восстановления при $-0,9 \text{ В}$ (рис. 4).

Поскольку в биологических системах "поглотителями" свободных радикалов являются АО, представляет интерес изучить их влияние на процесс восстановления кислорода. АО проявляют слабые кислотные свойства. Донорами протонов были жирорастворимые АО: ретинол и а-токоферол, содержащие в структуре молекул гидроксильные группы.

Результаты кулонометрического определения содержания свободных жирорастворимых ЛО в сыворотке крови в пересчете на α -токоферол ($n=5$, $p=0,95$).

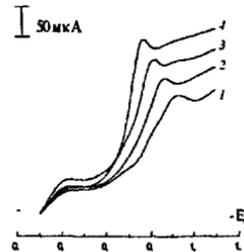
№	Содержание жирорастворимых антиоксидантов в пересчете на α -токоферол, г/л	S_T
1	$1,9 \pm 0,1$	0,05
2	$1,7 \pm 0,1$	0,06
3	$1,5 \pm 0,1$	0,07
4	$1,4 \pm 0,1$	0,06
5	$1,45 \pm 0,09$	0,06
6	$0,51 \pm 0,06$	0,08
7	$1,5 \pm 0,2$	0,07
8	$1,27 \pm 0,09$	0,06
9	$0,61 \pm 0,08$	0,08
10	$0,78 \pm 0,07$	0,08

Рис. 4. Циклическая вольтамперограмма кислорода на стеклоглеродном электроде на фоне $0,05 \text{ M } (\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ в диметилформамиде, скорость изменения потенциала 200 мВ/с .



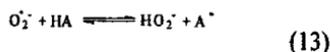
При введении АО электрохимические характеристики пика восстановления O_2 изменялись. Пик увеличивался по высоте и смещался в область более положительных потенциалов. С увеличением концентрации АО ток при потенциалах образования O_2 линейно растет (рис. 5).

Рис. 5. Вольтамперограммы восстановления кислорода на стеклоглеродном электроде на фоне $0,05 \text{ M } (\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ в диметилформамиде в присутствии ретинола; $C(\text{M})$: 1 – 0; 2 – $2,4 \times 10^{-4}$; 3 – $7,11 \times 10^{-4}$; 4 – $1,17 \times 10^{-3}$, скорость изменения потенциала 200 мВ/с .



Восстановление кислорода в присутствии АО протекает обратимо, о чем свидетельствует наличие анодного пика на циклических вольтамперограммах и разность потенциалов анодного и катодного пиков, близкая к 60 мВ .

Сопоставление полученных и литературных данных позволяет говорить о том, что восстановление кислорода в присутствии АО протекает по ЕС-механизму, и имеет место протонизация супероксид анион-радикала:



По полученным вольтамперограммам рассчитаны константы скорости взаимодействия АО с супероксид анион-радикалом по величине относительного прироста тока восстановления кислорода в присутствии протонирующего агента. Они составили $2,97 \times 10^3$ л/моль·с для ретинола и $2,10 \times 10^3$ л/моль·с для а-токоферола.

Полученные результаты позволили предложить метод определения АО по относительному приросту тока восстановления кислорода в их присутствии.

Проведено определение ретинола и а-токоферола в модельных растворах, а также содержание действующего вещества (ретинола и а-токоферола) в фармпрепаратах (табл. 17).

Таблица 17

Результаты определения ретинола и α -токоферола в фармпрепаратах в пересчете на ацетат ($n=5$, $p=0,95$).

Объект	Определяемое соединение	Содержание, %	Найдено, %	S_r
Р-р ретинола ацетата в масле	Ретинол	3,44	$3,1 \pm 0,2$	0,04
Р-р α -токоферола ацетата в масле	α -Токоферол	30	27 ± 1	0,04

Индивидуальные АО на фоне биологической матрицы. Исследована возможность кулонометрического определения индивидуальных АО на фоне биологической матрицы, в частности, сыворотки крови. Изучены системы, содержащие сывороточный альбумин и сыворотку крови в качестве источников матричного эффекта.

Установлено, что основными мешающими компонентами при определении АО являются белки. Показано, что для устранения матричного эффекта необходимо осажать белки, в частности, трихлоруксусной кислотой.

Фенольные АО. Большое разнообразие фенольных соединений не противоречит общности их строения и близости важнейших свойств. Практически все они обладают антиокислительной активностью. Фенольные АО способны, даже в виде ничтожно малых добавок, эффективно воздействовать на процессы свободнорадикального окисления.

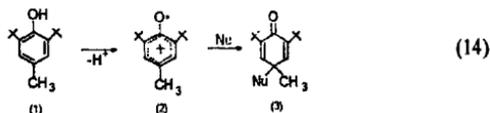
Таблица 18

Значения констант скорости взаимодействия некоторых фенольных антиоксидантов с супероксид анион-радикалом

Фенольные антиоксиданты	$k \times 10^3$, л/моль·с	S_r
Ионол	$8,9 \pm 0,1$	0,01
Кверцетин	$9,4 \pm 0,5$	0,02
Дигидрокверцетин	$10,4 \pm 0,3$	0,02
Рутин	$9,3 \pm 0,5$	0,02

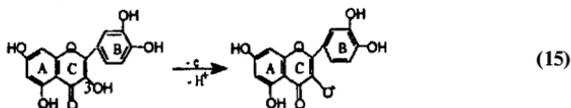
Рассчитаны константы скорости взаимодействия фенольных АО с электрохимически генерированным супероксид анион-радикалом по ЕС-механизму. Результаты представлены в табл. 18. Константы скорости взаимодействия имеют один порядок и близки по своим значениям. Это говорит о том, что все исследуемые АО приблизительно в равной мере способны взаимодействовать с $O_2^{\cdot-}$

Изучено вольтамперометрическое поведение фенольных АО на стеклоуглеродном электроде на фоне $0,1 \text{ M HClO}_4$ в диметилформамиде. Все исследуемые соединения окисляются в этих условиях. Известно, что окисление ионола протекает согласно следующей схеме:



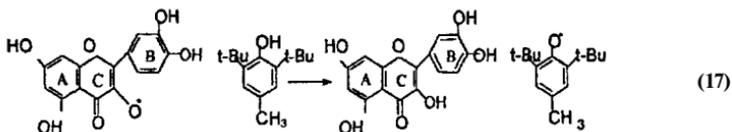
Промежуточное соединение (2) реагирует с любым присутствующим в растворе нуклеофилом (вода, этанол и др.). В отсутствие подходящего нуклеофила в реакцию вступает сам растворитель.

Исходя из структуры флавонолов и имеющихся литературных данных, можно предположить, что на первой ступени окисление затрагивает гидроксильную группу пиранового кольца С (схема 15) с образованием устойчивого радикала, а затем фенольные группы колец А и В. Молекула рутина содержит гликозидный остаток в положении 3. Поэтому, вероятно, в окислении участвует одна из гидроксильных групп кольца В.



Представляет интерес изучить взаимное влияние природных полифенолов и синтетического пространственно-затрудненного фенола - ионола в их смесях, имеющих значение в фармации. При введении ионола наблюдали изменение электрохимических характеристик пиков окисления полифенолов. Поскольку наиболее информативной является первая ступень, то влияние ионола рассматривается по ее изменению. Пик увеличивался по высоте и смещался в область менее положительных потенциалов.

Таким образом, в системе полифенол - ионол наблюдается каталитический эффект от введения ионола. Окисление полифенолов протекает с образованием радикала, который вступает в реакцию с ионолом, в результате чего происходит регенерация молекулы исходного полифенола (схема 16).



Максимальное увеличение тока пика наблюдается при соотношении компонентов 1:1 независимо от первоначальной концентрации полифенола. Исключение составляет рутин, для которого при низкой концентрации максимальный каталитический эффект в присутствии ионора наблюдается в соотношении 1:2. Это, вероятно, связано с присутствием в молекуле рутина гликозидного остатка.

Электрохимические методы оценки интегральной антиоксидантной емкости биологических объектов и возможности их применения в клинической практике

Следует отметить, что в последнее время все большее внимание уделяется способам определения суммарного содержания АО, которое можно рассматривать как общий показатель состояния объекта анализа в оценке его антиоксидантных свойств, отражающей антиоксидантный статус организма.

Разработан способ кулонометрического определения интегральной АОЕ биологических жидкостей с помощью электрогенерированного брома. Электрохимическое окисление бромид-ионов на платиновом электроде в кислых средах приводит к образованию Br_2 , Br_3 , а также короткоживущих радикалов брома (Br^*), адсорбированных на поверхности платинового электрода. Образующиеся при электроокислении соединения брома и сам бром легко вступают в различные радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также в реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям и это, как уже отмечали выше, позволяет охватить широкий круг биологически активных веществ различной структуры, обладающих антиоксидантными свойствами. Поэтому электрогенерированный бром можно предложить в качестве реагента для оценки суммарных антиоксидантных свойств биологических жидкостей, в частности, крови и ее компонентов. Для количественной оценки введена характеристика интегральная АОЕ, выраженная в единицах количества электричества (Кулонах) на 1 л крови (или другой субстанции).

Единица Кулон как стандарт выступает в роли универсальной единицы измерения, поскольку позволяет выразить АОЕ в пересчете на различные индивидуальные АО, используя константу Фарадея и число электронов, участвующих в реакции АО с электрогенерированным бромом.

Метод апробирован на большом числе здоровых доноров и пациентов (всего около 300 человек) с различными патологиями. Интерес представляют пациенты с детским церебральным параличом (ДЦП).

Установлено, что независимо от формы заболевания, АОЕ цельной крови и плазмы достоверно снижена по сравнению с контрольной группой, что иллюстрирует табл. 19. В большей степени уменьшение АОЕ происходило у пациентов с лёгкими формами заболевания. Так, АОЕ цельной крови у детей с диагнозом спастическая диплегия снизилась на 20,5 %, в то время как при более лёгких правосторонних и левосторонних гемипаретических формах заболевания снижение АОЕ крови составило 50 и 31 % соответственно.

Интегральная антиоксидантная емкость цельной крови и плазмы у детей с различными формами церебрального паралича

Группы обследования	Число детей в группе	АОЕ, кКл/л			
		цельная кровь	S _r	плазма крови	S _r
Здоровые	10	42 ± 3,5	0,07	18,2 ± 0,6	0,02
Спастическая диплегия	10	33,4 ± 0,6	0,03	-	-
Двойная гемиплегия	10	30,9 ± 0,8	0,04	10,3 ± 0,4	0,05
Гиперкинетическая форма	9	24,5 ± 0,9	0,05	-	-
Левосторонний гемипарез	11	29 ± 3	0,1	13 ± 2	0,2
Правосторонний гемипарез	10	21 ± 6	0,4	9 ± 2	0,3

Известно, что для больных ДЦП наблюдается повышенная генерация эндомутагенов в организме, которая, скорее всего связана с ненормальной активизацией метаболических циклов, которые содержат интермедиаты-эндомутагены радикальной природы в качестве промежуточных продуктов. В нормальных условиях эндомутагены метаболических циклов не опасны, однако в условиях патологии их генерация резко возрастает, и уровень начинает превышать физиологические возможности защитных систем.

В настоящее время убедительно показана роль процессов окисления в механизмах нарушений функции почек различной этиологии. Хроническая почечная недостаточность (ХПН) не является исключением. Поэтому проведены исследования интегральной АОЕ крови и ее компонентов у пациентов с ХПН, находящихся на программном гемодиализе.

Установлено, что гемодиализ достоверно повышает АОЕ плазмы и цельной крови, но эти величины не достигают уровня контрольной группы. Поэтому пациентам должна проводиться дополнительная антиоксидантная терапия.

Проведено исследование влияния антиоксидантной терапии витамином Е и ксимедоном на АОЕ плазмы и цельной крови. Результаты определения АОЕ представлены в табл. 20.

Таблица 20

Результаты определения АОЕ цельной крови и плазмы после курса лечения препаратами-антиоксидантами (p=0,95)

Препарат	Интегральная АОЕ, кКл/л			
	плазма		цельная кровь	
	до терапии	после терапии	до терапии	после терапии
Ксимедон (n=9)	12,2±0,6	16±1,5	22,8±0,9	30,4±0,4
Витамин Е (n=22)	12,2±0,6	19,2±0,8	22,8±0,9	37±1,3

Впервые установлено, что ксимедон также достоверно увеличивает АОЕ (33,3 % для крови и 31,1 % для плазмы), хотя и в меньшей степени, чем витамин Е, что позволяет расширить область применения данного препарата.

Прослежена взаимосвязь интегральной АОЕ крови и ее компонентов с основными показателями состояния антиоксидантной защиты организма человека, в частности, с активностью каталазы, и такими маркерами окислительного

стресса, как содержание малонового диальдегида, липопротеинов низкой плотности и металлов переменной валентности (Fe, Cu, Mn, Cr), что иллюстрирует табл.21.

Таблица 21

Параметры корреляционных зависимостей интегральной АОЕ крови и ее компонентов от индивидуальных показателей антиоксидантного статуса организма человека

Параметр	Уравнение регрессии $y=a+bx$		R
	a	$b \times 10^3$	
Активность каталазы	2 ± 1	980 ± 40	0,9887
Содержание малонового диальдегида	$23,1 \pm 0,3$	$-(780 \pm 30)$	-0,9942
Липопротеины низкой плотности	$20,0 \pm 0,9$	$-(1000 \pm 200)$	-0,7852
Железо	$16,2 \pm 0,4$	$-(5,4 \pm 0,8)$	-0,9044
Медь	$16,3 \pm 0,4$	$-(5 \pm 1)$	-0,8579
Марганец	$15,4 \pm 0,2$	$-(23 \pm 4)$	-0,8923
Хром	$16,1 \pm 0,3$	$-(213 \pm 34)$	-0,9103

Это подтверждает взаимосвязь процессов с участием радикальных частиц, АО (как низкомолекулярных, так и белков, в частности, ферментов), ионов металлов переменной валентности и субстратов перекисного окисления липидов. А, кроме того, показывает эффективность использования общих показателей, например, интегральной АОЕ, для оценки состояния живого организма, в частности, его антиоксидантного статуса.

Определенные возможности для анализа биологических жидкостей предоставляет вольтамперометрия. Установлено, что компоненты плазмы крови окисляются на стеклоглуглеродном электроде на фоне фосфатного буферного раствора (рН 7,4) при потенциале 0,38 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода. При этом на вольтамперограммах наблюдается волна или четко выраженный пик окисления, ток которого линейно возрастает с увеличением объема введенной плазмы крови (рис. 6). Максимальный ток окисления отражает концентрацию АО, а потенциал пика или полуволны характеризует их восстанавливающую способность. Поэтому величину тока можно считать мерой АОЕ плазмы крови.

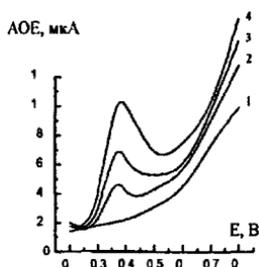


Рис. 6. Вольтамперограммы окисления плазмы крови различного объема (мл) на стеклоглуглеродном электроде на фоне фосфатного буферного раствора (рН 7,4): 1 – 0; 2 – 0,15; 3 – 0,2; 4 – 0,3. Скорость изменения потенциала 200 мВ/с.

Выявлены АО, которые вносят вклад в интегральную АОЕ плазмы крови. Учитывая содержание основных низкомолекулярных АО в плазме, можно сделать вывод, что это аскорбиновая и мочевая кислоты, а также серосодержащие

аминокислоты. Вклад остальных водорастворимых АО настолько незначителен, что не может быть зафиксирован в условиях вольтамперометрии. Это и было подтверждено экспериментально. При введении АО в плазму крови наблюдалось увеличение тока окисления пропорционально концентрации АО.

Проведенные клинические исследования показали, что при патологических процессах воспалительного характера величины АОЕ, достоверно различаются (табл. 22). Наименьшая АОЕ плазмы крови наблюдается в случае туберкулеза легкого.

Таблица 22

Результаты вольтамперометрического определения интегральной АОЕ плазмы крови пациентов с различными нозологическими характеристиками.

Диагноз	Интегральная АОЕ, мкА	S _r
Хроническая обструктивная болезнь легких	2,0±0,2	0,01
Бронхиальная астма	3,6±0,2	0,04
Туберкулез легкого	0,46±0,09	0,09
Гнойные инфекции хирургического профиля	4,6±0,3	0,05

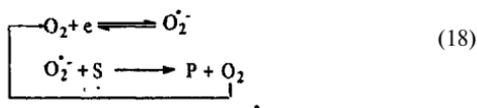
Для пациентов с гнойными инфекциями хирургического профиля прослежено изменение интегральной АОЕ плазмы крови в ходе лечения. Установлено, что медикаментозная терапия достоверно повышает уровень АОЕ крови уже в ходе лечения.

Параллельно определяли интегральную АОЕ плазмы крови методом гальваностатической кулонометрии. Корреляционный анализ показал, что существует прямо пропорциональная зависимость между величинами АОЕ, полученными вольтамперометрически и кулонометрически ($Y=a+bX$, где $a=-6,7\pm0,5$, $b=1,07\pm0,04$, $R=0,9934$).

Разработан вольтамперометрический способ определения АОЕ плазмы крови по ее реакции с электрохимически генерированными супероксид анион-радикалами.

Как уже отмечалось выше, на стеклоуглеродном электроде на фоне 0,05 М (C₂H₅)₂NI в диметилформамиде кислород воздуха восстанавливается с образованием O₂⁻ при -0,9В (отн. хлоридсеребряного электрода).

Как и в случае индивидуальных АО, при введении плазмы крови в раствор наблюдается изменение электрохимических характеристик пика восстановления кислорода. Он увеличивается по высоте и смещается в область более положительных потенциалов, что указывает на последующую химическую реакцию продуктов обратной элементарной стадии. Процесс по первой волне может быть представлен следующей схемой 18:



где S - компоненты плазмы крови, дезактивирующие продукт переноса электрона на молекулу кислорода.

На основе полученных результатов предложен вольтамперометрический способ оценки интегральной АОЕ плазмы крови. За аналитический сигнал принят относительный прирост тока восстановления кислорода в присутствии плазмы крови в пересчете на α -токоферол.

Определена интегральная АОЕ плазмы крови пациентов отделения гнойной хирургии. Результаты представлены в табл. 23. Уровень АОЕ плазмы для пациентов достоверно ниже, чем для контрольной группы (на 55,6 %). Для пациентов с гнойными инфекциями хирургического профиля наблюдается достоверное увеличение АОЕ плазмы крови после лечения (на 58,3 %).

Таблица 23

Результаты вольтамперометрического определения интегральной АОЕ плазмы крови по реакции с супероксид анион-радикалом в пересчете на α -токоферол
($n=5$, $p=0,95$)

Группы	АОЕ плазмы крови в пересчете на α -токоферол, мг/л			
	до лечения	S_T	после лечения	S_T
Контроль	800±10	0,01	-	-
Пациенты	86±2	0,02	136±8	0,04
	169±11	0,03	270±9	0,02
	338±4	0,01	535±7	0,01
	243±9	0,01	386±9	0,01
	153±9	0,02	242±8	0,02
	378±6	0,01	536±10	0,01
	485±8	0,01	766±9	0,01
	483±9	0,01	740±7	0,01
	495±9	0,01	783±9	0,01
	490±8	0,01	772±9	0,01

Несмотря на то, что АОЕ по реакции с супероксид анион-радикалом определяли в неводной среде, проведенный корреляционный анализ показал прямо пропорциональную зависимость между величинами интегральной АОЕ, полученными вольтамперометрически и кулонометрически до и после лечения ($Y=a+bX$, где $a=-1393\pm64$, $b=146\pm5$, $R=0,99464$ и $a=2191\pm149$, $b=145\pm8$, $R=0,9882$ соответственно).

Таким образом, компоненты плазмы крови реагируют с электрогенерированными радикальными частицами кислород[•] и брома. Обнаруженное значимое различие в АОЕ плазмы крови в ходе терапии позволяет рекомендовать методику вольтамперометрического определения АОЕ для оценки качества лечения.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны способы кулонометрического и вольтамперометрического определения фармпрепаратов: липоевой кислоты, адреналина и допамина, мексидола, рутина и кверцетина, витаминов А и Е, кальциферолов в модельных растворах и в их лекарственных формах с величинами S_T от 0,01 до 0,09. Уста-

новлены стехиометрические коэффициенты реакций указанных соединений с электрогенерированными титрантами - галогенами.

2. Предложены способы определения глутатиона и сывороточного альбумина в модельных растворах и в крови человека с величиной S_r от 0,01 до 0,09. Разработан способ определения суммарного содержания свободных жирорастворимых АО в сыворотке крови человека в пересчете на а-токоферол.

3. Найдены условия кулонометрического определения индивидуальных АО на фоне, содержащем компоненты биологического происхождения, в частности, сыворотки крови, позволяющий свести к минимуму мешающее влияние матрицы.

4. Найдены условия электрохимической генерации супероксид анион-радикала. Рассчитаны кинетические параметры его реакций с важнейшими АО. Установлено, что процесс следует ЕС-механизму.

5. Обнаружено взаимное влияние природных полифенолов и синтетического пространственно-затрудненного фенола - ионола, то есть системы полифенол - ионол при различных соотношениях компонентов. При введении ионола наблюдается каталитический эффект. Установлены соотношения, при которых наблюдается максимальное увеличение тока окисления полифенолов, что связано с регенерацией молекулы полифенола.

6. Разработан способ кулонометрической оценки интегральной АОЕ с помощью электрогенерированного брома. Впервые установлено, что интегральная АОЕ по реакции с электрогенерированным бромом коррелирует с содержанием малонового диальдегида, липопротеинов низкой плотности и металлов переменной валентности (Fe, Си, Мп, Сг) и активностью каталазы. Это подтверждает взаимосвязь процессов с участием радикальных частиц, АО (как низкомолекулярных, так и белков, в частности, ферментов), ионов металлов переменной валентности и субстратов перекисного окисления липидов. А, кроме того, показывает эффективность использования общих показателей, например, интегральной АОЕ, для оценки состояния живого организма, в частности, его антиоксидантного статуса.

7. Предложены вольтамперометрические способы определения интегральной АОЕ плазмы крови по реакции с супероксид анион-радикалом и по окислению компонентов плазмы на стеклоуглеродном электроде на фоне фосфатного буферного раствора. Проведенные клинические исследования показали, что величины интегральной АОЕ плазмы крови, полученные кулонометрически и вольтамперометрически, коррелируют между собой.

8. Проведена оценка интегральной АОЕ крови и ее компонентов при различных типах патологических процессов в организме: хронической почечной недостаточности, врожденных патологиях сердца, заболеваниях органов дыхания, гнойных инфекциях хирургического профиля, детском церебральном параличе. Оценена эффективность медикаментозной терапии, в том числе и дополнительной антиоксидантной.

9. Предложенные электрохимические способы оценки интегральной АОЕ биологических жидкостей являются универсальными. С их помощью можно

проводить первичный скрининг и качественную оценку состояния здоровья человека и проводимого лечения через антиокислительный статус.

Выражаю благодарность к.м.н., зав. отделением гемодиализа Центра внепочечных методов очищения организма Талгату Султановичу Танееву, к.м.н. Дине Дамировне Гайнетдиновой, д.м.н., зав. кафедрой медицинской генетики КГМУ, профессору Валерию Васильевичу Семенову, а также д.ф.-м.н., зав. лабораторией аналитической спектроскопии, профессору Альберту Харисовичу Гильмутдинову, к.ф.-м.н., ассистенту кафедры общей физики Александру Викторовичу Волошину, к.х.н., старшему научному сотруднику ИОФХ им. А.Е.Арбузова Анатолию Андреевичу Лапину, д.х.н., профессору Евгению Николаевичу Офицерову за проявленный интерес к работе и плодотворное сотрудничество.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Зиятдинова, Г.К. Определение интегральной антиоксидантной емкости крови методом гальваностатической кулонометрии [Текст] / Г.К. Зиятдинова, И.Ф. Абдуллин, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // XVII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (21-26 сентября 2003г.). Казань, 2003.- Тез. докл.- Т.4.- С.236.

2. Погорельцев, В.И. Интегральная антиоксидантная емкость крови в первичном скрининге патологического процесса в организме человека [Текст] / В.И. Погорельцев, Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // Объединенная международная научная конференция "Новая геометрия природы" (25 августа - 5 сентября 2003г.). Казань, 2003. Труды конф.- Т.2.- С.273-275.

3. Зиятдинова, Г.К. Электрохимическое определение жирорастворимых антиоксидантов в сыворотке крови человека [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Д.М. Гильметдинова // IV Всероссийская конференция молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" (23-25 июня 2003г.). Саратов, 2003.- Тез. докл.- С.157.

4. Зиятдинова, Г.К. Кулонометрическое определение сывороточного альбумина в крови человека [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // III Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (14-15 февраля 2003г.). Казань, 2003.- Тез. докл.- С.40.

5. Зиятдинова, Г.К. Определение глутатиона в крови человека методами кулонометрии и вольтамперометрии [Текст] // VIII Научно-практическая конференция молодых ученых КГМУ (27 июня 2003г.). Казань, 2003.- Тез. докл.- С.26.

6. Зиятдинова, Г.К. Применение кулонометрии для оценки антиоксидантной емкости крови больных хронической почечной недостаточностью [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // X Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" (7-11 апреля 2003г.). Москва, 2003.- Тез. докл.-С193.

7. Зиятдинова, Г.К. Эффективность проведения антиоксидантной терапии ксимедоном и витамином Е при хронической почечной недостаточности [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // X Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" (7-11 апреля 2003г.). Москва, 2003.- Тез. докл. - С.193.

8. Зиятдинова, Г.К. Определение интегральной антиоксидантной емкости плазмы крови по ее реакции с супероксид анион-радикалом [Текст] / IV Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра

Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (16-17 марта 2004г.). Казань, 2004.- Тез. докл.- С.34.

9. Зиятдинова, Г.К. Вольтамперометрическое определение рутина и кверцетина [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // VI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием (23-27 мая, 2004г.). Уфа, 2004.- Тез. докл.- С.8-9.

10.Зиятдинова, Г.К. Электрохимическая оценка интегральной антиоксидантной емкости биологических жидкостей [Текст] / IX Всероссийская научно-практическая конференция "Молодые ученые в медицине" (20-21 апреля, 2004г.). Казань. 2004.- Тез. докл.-С. 127-128.

11.Погорельцев, В.И. Определение антиоксидантной емкости крови у больных легкой патологией [Текст] / В.И. Погорельцев, Л.Н. Копылов, И.С. Саркаров, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // XIII Национальный конгресс по болезням органов дыхания (10-14 ноября, 2003г.). Санкт-Петербург, 2003.-Тез. докл.- С.253.

12.Абдуллин, И.Ф. Кулонометрия в фармацевтическом анализе: от аналита к обобщенным показателям [Текст] / И.Ф. Абдуллин, Г.К. Будников, Н.Н. Чернышева, Г.К. Зиятдинова / Международный Форум "Аналитика и аналитики" (2-6 июня 2003г.). Воронеж, 2003.- Каталог рефератов и статей.- Т.2.- С.380.

13.Зиятдинова, Г.К. Возможности электрохимических методов в оценке антиоксидантной емкости некоторых биологических жидкостей [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // Всероссийская конференция "Аналитика России" (27 сентября - 1 октября, 2004г.). Москва, 2004.- Тез.докл.- С.210.

H.Ziyatdinova, G.K Correlation between total antioxidant capacity of plasma and microelements contents [Text] / G.K. Ziyatdinova, A.A. Lapin, H.C. Budnikov, V.N. Zelenkov // International congress and exhibition "Advanced methods of diagnosis, prophylactics and treatment" (19-21 november, 2004). Hannover, 2004.- Book of Abstr.- P.95-96.

15.Зиятдинова, Г.К: Вольтамперометрическая оценка интегральной антиоксидантной емкости плазмы крови. // V Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (26-27 апреля 2005г.). Казань, 2005.- Тез. докл.- С.47.

16.Зиятдинова, Г.К. Электрохимическое определение липоевой кислоты [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // Журн. аналит. химии. 2004.- Т.59, №3.- С.324-326.

17.Зиятдинова, Г.К. Определение сывороточного альбумина в крови методом гальваностатической кулонометрии с применением электрогенерированных окислителей [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // Журн. аналит. химии. 2004.- Т.59, № 7.- С.742-744.

18.Будников, Г.К. Электрохимическое определение глутатиона [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова, Я.Р. Валитова / Журн. аналит. химии. 2004.- Т.59, № 6.- С.645-648.

19.Абдуллин, И.Ф. Интегральная антиоксидантная емкость крови по данным метода гальваностатической кулонометрии [Текст] / И.Ф. Абдуллин, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. 2003.- № 3.- С.35-39.

20.Будников, Г.К. Определение некоторых жирорастворимых антиоксидантов методами кулонометрии и вольтамперометрии [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова, Д.М. Гильметдинова//Журн. аналит. химии. 2004.- Т.59, № 7.- С.736-741.

21. Зиятдинова, Г.К. Кулонометрическое определение индивидуальных низкомолекулярных антиоксидантов в присутствии компонентов матрицы сложной биологической природы [Текст] / П.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. 2004.- № 1,- С.48-51.

22. Чернышева, Н.Н. Обобщенные показатели объектов анализа и возможности электрохимических методов [Текст] / Н.Н. Чернышева, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. 2004.- № 1.- С.54-61.

23. Зиятдинова, Г.К. Реакции супероксид анион-радикала с антиоксидантами и их применение в вольтамперометрии [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Д.М. Гильметдинова, Г.К. Будников // Журн. аналит. химии. 2005.- Т.60, № 1.- С.56-59.

24. Зиятдинова, Г.К. Определение некоторых катехоламинов методами кулонометрического титрования и циклической вольтамперометрии [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Журн. аналит. химии. 2005.- Т.60, № 5.- С.501-506.

25. Зиятдинова, Г.К. Оценка состояния антиоксидантной защиты организма человека при наличии воспалительных процессов по данным кулонометрических измерений [Текст] // Г.К. Зиятдинова, В.И. Погорельцев, Г.К. Будников // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2005.- № 1.- С.42-44.

26. Будников, Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // Журн. аналит. химии. 2005.- Т.60, № 7.- С.701-715.

27. Ziyatdinova, G.K. The evaluation of the total antioxidant capacity of human plasma using constant-current coulometry [Text] // G.K. Ziyatdinova, V.N. Zelenkov, A.A. Lapin, H.C. Budnikov // In: Functional foods for cardiovascular diseases ed. by D.M. Martirosyan (USA). 2004.- P.58-64.

28. Погорельцев, В.И. Применение метода гальваностатической кулонометрии в клинической диагностике антиоксидантного статуса организма человека [Текст] / В.И. Погорельцев, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Казань: Изд-во КГМУ, 2004.- 47с.

29. Погорельцев, В.И., Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Способ определения интегральной антиоксидантной емкости биологических жидкостей [Текст]. / В.И. Погорельцев, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Заявка на патент РФ № 2002134634 от 23.12.02. с положительным решением о выдаче патента.

30. Будников, Г.К. Антиоксиданты: медико-биологические и химико-аналитические аспекты [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. 2005.- № 1.- С.3-16.

31. Ziyatdinova, G.K. Electrochemical determination of total antioxidant capacity of human plasma [Text] // G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, V.I. Pogoreltzev // Anal. Bioanal. Chem. 2005.- V.381, № 8.- V.1546-1551.

Соискатель



Г.К.Зиятдинова

Сдано в набор 3.05.2005 г.
Подписано в печать 4.05.2005 г.
Формат 60x84 1/16
Бумага офсетная №1
Печать на ризографе
Гарнитура Times NR, 11
Печ.л.1,75
Тираж 100 экз.
Заказ №19

Издательство Казанского университета
420008 Казань, ул.Кремлевская, 18



949

09 WCH 2005