

## Вольтамперометрия суммарных липидов с парамагнитными свойствами из морских организмов

Ю. А. Усс<sup>1,\*</sup>, Б. Н. Крашенинников<sup>2</sup>, В. Т. Минлигареев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Филиал Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.  
Россия, 299001, Севастополь, ул. Героев Севастополя, д. 7

<sup>2</sup>Институт природно-технических систем. Россия, 299011, Севастополь, ул. Ленина, д. 28

<sup>3</sup>Институт прикладной геофизики имени академика Е. К. Фёдорова.  
Россия, 129128, Москва, ул. Ростокинская, д. 9

(Поступила в редакцию 03.05.2021; подписана в печать 20.08.2021)

Представлен и обоснован вариант метода трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии для применения в исследованиях антиоксидантов в природных липидах. Вольтамперометрический анализ суммарных липидов гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus acanthias* показал, что они имеют одну сходную анодную волну с потенциалом окисления +0.60 В. Отличие же между исследованными гидробионтами связана с регистрацией еще одной анодной волны с потенциалом окисления +1.20 В в липидах гонад мидии и +0.90 В в липидах печени катрана. Сделано предположение, что первая анодная волна с потенциалом пика окисления +0.60 В в липидах гонад мидии и печени катрана может принадлежать альфа-токоферолу. Возможно, именно альфа-токоферол участвует в формировании обнаруженного в суммарных липидах гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus acanthias* молекулярного комплекса с переносом заряда с парамагнитными свойствами.

PACS: 87.14.Cc      УДК: 577.352.3

Ключевые слова: морские организмы, гонады мидии, печень катрана, липиды, антиоксиданты, вольтамперометрия, альфа-токоферол.

### ВВЕДЕНИЕ

Уровень окислительного стресса биологических объектов определяется соотношением проокислительной и антиокислительной активностей их молекулярных структур [1]. Оценку общего прооксидант/антиоксидантного статуса организма связывают с определением суммарного уровня антиокислительной активности [2]. Такой подход учитывает функциональное и структурное разнообразие природных соединений с антиокислительной активностью, которая определяется по наличию одновременно в организме их окисленных и восстановленных форм.

Методы вольтамперометрии напрямую определяют донорно-акцепторные взаимодействия исследуемых молекулярных структур и оценивают их антиокислительную активность [3]. Они характеризуются: высокой чувствительностью ( $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М), широким диапазоном исследуемых концентраций вещества (от  $10^{-12}$  до  $10^{-1}$  М), возможностью проводить одновременно качественный и количественный анализ, определением аналитов органических и неорганических в одной пробе, исследованием смеси соединений близких по структуре и свойствам, способностью проводить измерения в водных и неводных растворителях, рассчитывать кинетические параметры реакции [4]. Это помогает изучить химические свойства антиоксидантов, электрохимическое поведение молекул, взаимовлияние

и взаимодействие с окисгенированными частицами.

Тем не менее, очевидный недостаток вольтамперометрии заключается в том, что результат количественного определения образца с антиокислительной активностью не всегда учитывает возможность одновременного присутствия в пробах антиоксидантов в окисленной и восстановленной формах. Измеряемые параметры зависят от типа электрода, растворителя, фонового электролита и механизма окислительно-восстановительной реакции на поверхности электрода [5].

Окислительно-восстановительные свойства жирорастворимых витаминов группы А (ретинол, ретиналь, ретиноевая кислота), группы D (эргокальциферол, холекальциферол), группы Е (альфа-токоферол) и группы К (филлохинон, менахинон) подробно исследованы методами вольтамперометрии [6]. Интересно, что витамины группы А, группы Е и группы К известны как природные антиоксиданты [7]. Однако природные липиды изучены в целом очень мало рассматриваемым методом [1]. Это связано со сложным составом природных липидов и необходимостью проводить анализ в безводных органических растворителях для их полного растворения вместе с фоновым электролитом [8].

При окислении суммарных липидов гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus acanthias* диоксидом свинца в толуоле методом ЭПР-спектроскопии были зарегистрированы при температуре +24°C стабильные свободные радикалы с идентичным редокс-фрагментом [9]. Тожественность полученных сверхтонких спектров электронного парамагнитного резонанса

\* ussyuri@gmail.com

нанса (ЭПР) окисленных суммарных липидных экстрактов *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) позволила сделать вывод о наличии в них близких по строению природных антиоксидантов. Исследование их донорно-акцепторных свойств методом вольтамперометрии предоставит возможность провести качественную и количественную оценку антиокислительной активности новой группы полярных липидов.

Цель работы - разработка варианта метода трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии для применения в исследовании новой группы природных антиоксидантов, полярных липидов, с парамагнитными свойствами в суммарных липидах гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus achantias*.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ткани *Mytilus galloprovincialis* L. (гонады) и *Squalus achantias* (печень) перед экстракцией замораживали в морозильной камере при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  минимум на 2 часа. После размораживания ткани гомогенизировались в фарфоровой ступке до сметанообразного состояния и заливали смесью очищенных органических растворителей гексан:изопропанол (соотношение 2:1). Пропорция ткань/экстракционная смесь (г/мл) — 1:10. Такое соотношение ткань-экстрагент является оптимальным, и полнота экстракции составляет 97-98% [9]. Экстракцию вели в стеклянных центрифужных пробирках объемом 100 мл. Осветление экстракта и отмытку дважды дистиллированной водой в соотношении 1:2 (липидный экстракт:вода) осуществляли центрифугированием при 3000 об/мин при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ . Отмытый экстракт липидов в гексане упаривали на ротаторном испарителе в вакууме при температуре  $+30^{\circ}\text{C}$  и перерастворяли в гексане.

Для электрохимического исследования 100 мг липидов в гексане упаривали в токе азота досуха и перерастворяли в 2 мл смеси хлороформ:метанол (соотношение 2:1), содержащей в качестве фонового электролита 0.1 М перхлората лития безводного (ХимСинтез, Россия). Вольтамперограмму снимали на анализаторе полярнографическом РА-2 (Чехословакия) методом трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии. При проведении электрохимического анализа этим вариантом импульсной вольтамперометрии на линейно изменяющееся постоянное напряжение через одинаковые промежутки времени подают одинаковые дополнительные импульсы. Силу тока измеряют до подачи импульса и в его конце. Вольтамперограмма имеет вид первой производной вольтамперометрической волны. Максимум на вольтамперограмме соответствует потенциалу полуволны. Потенциал анодной волны окисления измерялся в пределах 0 — 1.5 В. Скорость разверстки поляризующего электрода 10 мВ/с и амплитуда переменного напряжения 50 мВ. Чувстви-

тельность — 4. Результат фиксировали на двухкоординатном самописце ПДП 4-002 (Украина). В качестве электрода сравнения использовали насыщенный каломельный электрод, модифицированный графитом. Электроды рабочий и вспомогательный были сделаны из платиновой проволоки разной длины, запаянной в трубки из кварцевого стекла. Применялись электроды фирмы OrigaLys ElectroChem SAS (Франция). Измерения проводились при комнатной температуре.

Приготовление стандарта витамина Е для вольтамперометрии — растворяли 5 мг стандарта альфа-токоферола в 2 мл смеси хлороформ:метанол (соотношение 2:1) с перхлоратом лития (0.1 М) в качестве фонового электролита.

Использованный стандарт витамина Е состоял из  $\alpha$ -Tocopherol,  $\geq 95.5\%$ , Synonym: ( $\pm$ )- $\alpha$ -Tocopherol, DL-all-rac- $\alpha$ -Tocopherol, Vitamin E, CAS Number 10191-41-0, Empirical Formula (Hill Notation) C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, Molecular Weight 430.71, Beilstein/REAXYS Number 94012, EC Number 233-466-0, MDL number MFCD00006848, eCI@ss 34058016, PubChem Substance ID 57648149, Sigma-Aldrich.

В исследовании использовались органические растворители гексан, изопропанол, хлороформ и метанол фирмы PANREAC (Испания).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

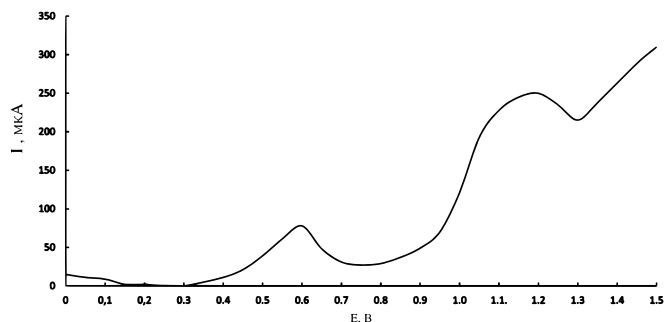


Рис. 1. Вольтамперограмма суммарных липидов гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L.

Вольтамперометрический анализ суммарных липидов гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. (рис. 1) и печени черноморского катрана *Squalus achantias* (рис. 2) показал, что они имеют одну сходную анодную волну с потенциалом окисления  $+0.60$  В. Отличие же между исследованными гидробионтами связана с регистрацией еще одной анодной волны с потенциалом окисления  $+1.20$  В в липидах гонад мидии и  $+0.90$  В в липидах печени катрана. Ранее, при исследовании суммарных липидов гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus achantias*, методом циклической трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии на фоне

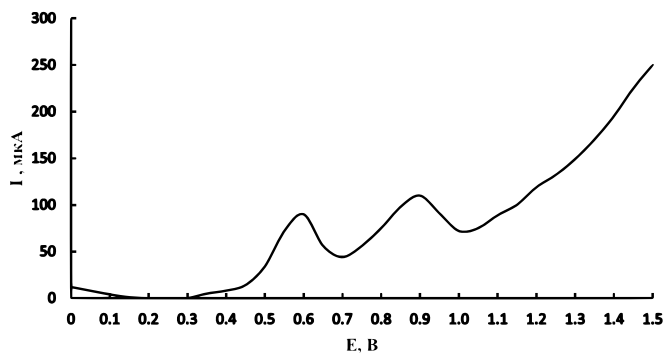


Рис. 2. Вольтамперограмма суммарных липидов печени черноморского катрана *Squalus acanthias*

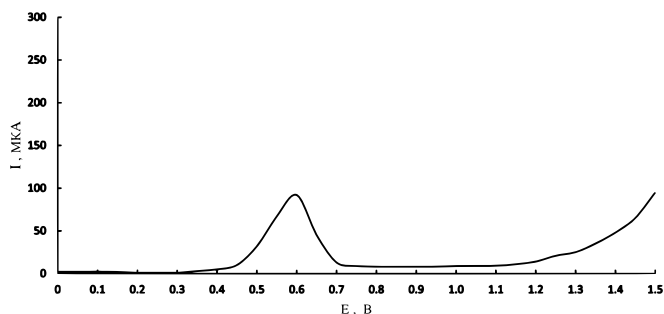


Рис. 3. Вольтамперограмма альфа-токоферола

0.1 М раствора перхлората тетрабутиламмония в хлористом метиле было зарегистрировано только по одной частично обратимой анодной волне с потенциалами окисления соответственно +1.33 В и +1.40 В [10]. Отличие в потенциалах анодного окисления можно объяснить различием в условиях проведения вольтамперометрического анализа и методах экстракции липидов из тканей, так как в этом исследовании применялся стандартный метод Фолча и его модификации [11].

Использование в вольтамперометрии природных липидов в качестве растворителя смеси хлороформ:метанол вместо хлористого метилена обусловлено несколькими причинами. Хлористый метилен более летучий и количественные измерения в нем провести сложно. На свету в хлористом метиле возможно образование активных химических радикалов, которые могут взаимодействовать с антиоксидантами в липидах, изменяя их исходную концентрацию и электрохимические свойства.

Сравнение условий электрохимического анализа липидов гонад мидии и печени катрана в разных растворителях позволило сделать заключение, что на фоне перхлората тетрабутиламмония в хлористом метиле уже через 10 мин. уменьшаются значения потенциала анодного окисления липидов. В смеси хлороформ:метанол, в присутствии в качестве фонового электролита перхлората лития, характеристики вольтамперограммы не менялись в течение 24 часов. При-

менение в качестве фонового электролита перхлората лития вместо перхлората тетрабутиламмония связано с плохой растворимостью последнего в смеси хлороформ:метанол. В целом внесенные изменения в метод трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии повысили его чувствительность и воспроизводимость.

Вольтамперометрические свойства витамина Е (альфа-токоферола) широко изучаются на протяжении уже более 50 лет [6]. В отсутствие кислоты или основания на фоне тетрабутиламмония в ацетонитриле или хлористом метиле альфа-токоферол окисляется при потенциале  $+0.5(\pm 0.1)$  В.

Исследование предлагаемым вариантом метода трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии чистого препарата витамина Е (альфа-токоферола) выявило, что потенциал пика анодного окисления его равен +0.6 В (рис. 3). Это дало возможность предположить, что первая анодная волна с потенциалом пика окисления +0.60 В в липидах гонад мидии и печени катрана может принадлежать альфа-токоферолу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее известное и широко распространенное мнение состоит в том, что единственная функция витамина Е это антиоксидантная - предотвращение автоокисления липидов мембран живых клеток. Обнаружение альтернативного механизма метаболизма витамина Е, который вызвал интерес в последние годы, позволило сделать предположение о том, что возможно основная его функция в клетке — сигнальная, хотя точный химический механизм ее реализации на молекулярном уровне не установлен [6]. При электрохимическом окислении альфа-токоферола конечным продуктом этого процесса является долгоживущий диамагнитный катион [6]. Поэтому мы предполагаем, что альфа-токоферол участвует в формировании обнаруженного в суммарных липидах гонад черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* L. и печени черноморского катрана *Squalus acanthias* молекулярного комплекса с переносом заряда с парамагнитными свойствами.

Предложенный к рассмотрению модифицированный метод трехэлектродной дифференциальной импульсной вольтамперометрии может применяться как для измерения количественного содержания антиоксидантов в окисленной и восстановленной формах в природных липидах, так и определения их качественного состава. В модельных системах липидов метод может использоваться при определении концентраций жирорастворимых антиоксидантов и исследовании их электрохимического поведения в условиях различного химического окружения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и г. Севастополя (проект № 18-47-920006). Исследования выполнены без использования лаборатор-

ных животных и без привлечения людей в качестве ис-

пытываемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- 
- [1] Барсукова М.Е., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. // *Журнал аналитической химии*. 2019. **74**, №5. С. 335.
- [2] Ходос М.Я., Казаков Я.Е., Видревич М.Б., Брайнина Х.З. // *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2017. **14**, №3. С. 262.
- [3] Pisoschi A.M., Cimreanu C., Predoi G. // *Open Chemistry*. 2015. **13**. P. 824.
- [4] Eds. Frank A. Settle. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997. ISBN-10: 0-13-177338-0.
- [5] Arteaga J.F. et al. // *Molecules*. 2012. **17**. P. 5126..
- [6] Webster R.D. // *The Chemical Record*. 2012. **12**. P. 188.
- [7] Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. // Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. 1972.
- [8] Хенце Г. // Полярграфия и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика. 2008.
- [9] Усс Ю.А., Крашенинников Б.Н., Минлигареев В.Т. // *Системы контроля окружающей среды*. 2018. **34**, №14. С. 138.
- [10] Нехорошев М.В. и др. // Докл. АН УССР. Сер. Б. Геол., хим. и биол. науки. 1989. №10. С. 78.
- [11] Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. // *Journal of Biological Chemistry*. 1957. **226**. P. 497.
- 

## Voltammetry of total lipids with paramagnetic properties from marine organisms

Yu. A. Uss<sup>1,a</sup>, B. N. Krashennikov<sup>2</sup>, V. T. Minligareev<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University Sevastopol Branch  
Sevastopol 299001, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Natural and technical Systems  
Sevastopol 299011, Russia*

<sup>3</sup>*Academician E.K. Fedorov Institute of Applied Geophysics  
Moscow 129128, Russia  
E-mail: <sup>a</sup>ussyuri@gmail.com*

A variant of the method of three-electrode differential pulse voltammetry for use in studies of antioxidants in natural lipids is presented and substantiated. Voltammetric analysis of the total lipids of the gonads of the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* L. and the liver of the Black Sea katran *Squalus acanthias* showed that they have one similar anodic wave with an oxidation potential of +0.60 V. The difference between the studied aquatic organisms is associated with the registration of one more anodic wave with an oxidation potential of +1.20 V in the lipids of the mussel gonads and +0.90 V in the lipids of the liver of katran. It was suggested that the first anodic wave with an oxidation peak potential of +0.60 V in the lipids of the gonads of the mussel and liver of katran may belong to alpha-tocopherol. Probably, it is alpha-tocopherol that is involved in the formation of a molecular complex with charge transfer with paramagnetic properties found in the total lipids of the gonads of the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* L. and the liver of the Black Sea katran *Squalus acanthias*.

PACS: 87.14.Cc.

*Keywords:* marine organisms, mussel gonads, katran liver, lipids, antioxidants, voltammetry, alpha-tocopherol.

*Received 03 May 2021.*

### Сведения об авторах

1. Усс Юрий Андреевич — руководитель проекта; e-mail: ussyuri@gmail.com.
  2. Крашенинников Борис Николаевич — вед. инженер; e-mail: Bnk58@mail.ru.
  3. Минлигареев Владимир Тимурович — доктор техн. наук, доцент, зам. директора по научной работе; e-mail: metrologo@mail.ru.
-