

А. А. СМIRНОВ

### ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 18 VI 1947)

Работами Keilin и Mann (<sup>1, 2</sup>) установлено, во-первых, что в состав молекулы угольной ангидразы входит цинк, и, во-вторых, что весь цинк, находящийся в эритроцитах, принадлежит этому ферменту. Это позволяет количество угольной ангидразы в эритроцитах определять по цинку.

Количество цинка в эритроцитах очень невелико. Пользуясь дитизоновым методом, нами ранее было установлено, что в 1 г эритроцитов человека находится цинка, в среднем, около 13  $\gamma$ , собаки — 9  $\gamma$ , кролика — 7,5  $\gamma$  и гуся — 6,5  $\gamma$ . Трудоемкость дитизонового метода побудила нас применить для этой цели поляррографический метод Гейровского (<sup>3</sup>). Этот метод позволяет, при наличии определенных условий, за 5—8 минут количественно определить не одно, а даже несколько веществ, находящихся в растворе в малых концентрациях (до  $10^{-5}$  мол.). Вычисление концентрации вещества, определяемого поляррографическим методом, производится по величине предельного (диффузионного) тока согласно уравнению Ильковича (<sup>4</sup>).

В своих исследованиях мы пользовались поляррографом завода «Геологоразведка». Капельный электрод изготовлялся по способу Гейровского. Образование максимумов на цинковой волне предупреждалось прибавлением метиленовой красной. Кислород из определяемого раствора удалялся перед поляррографированием продуванием электролитического водорода. Миграционный ток устранялся хлористым калием.

Пробы эритроцитов для анализа сжигались в  $H_2SO_4$ . Чтобы избежать потери цинка при озолении в пробе приходилось оставлять около 0,1 мл  $H_2SO_4$ . Озоленные пробы содержали железа примерно в 135 раз больше, чем цинка. При такой большой концентрации ионов  $SO_4^{--}$  и железа определять цинк в малых концентрациях нельзя. Для преодоления этих затруднений нами разработаны специальные приемы, которые проверялись в контрольных опытах на растворах цинка в условиях, точно повторяющих анализ эритроцитов. Эти контрольные опыты состояли в следующем. Колбы шоттовского стекла емкостью 40—50 мл с горлышком длиной 8—9 см обрабатывались горячей концентрированной HCl. После многократной промывки бидестиллированной водой, в три высушенных колбы вливалось по 4 мл. концентрированной  $H_2SO_4$  и по 0,5 мл раствора  $ZnSO_4$ , содержащего 20  $\gamma$  Zn в 1,0 мл. В каждую колбу вливалось также по 0,5 раствора  $Fe_2(SO_4)_3$ , содержавшего 1,5 мг железа. Те же растворы, за исключением  $ZnSO_4$ , и в таких же объемах вливались еще в две колбы (слепой опыт). Все пять проб «сжигались» на плитке под тягой в течение 5—6 часов.

После охлаждения внутренняя поверхность горлышка колбы ополаскивалась 4—5 мл бидестилированной воды. Затем пробы нагревались до кипения, охлаждались и нейтрализовались 1 N КОН. Индикатором служила метиленовая красная. При нейтрализации большая часть железа переходила в гидраты закиси и окиси. Подкисленные 0,15—0,2 мл 0,1 N HCl до явно кислой реакции пробы подщелачивались 0,5 мл 0,2 N NH<sub>4</sub>OH. Затем пробы выпаривались в термостате при температуре не выше 90—95° С до постоянного веса.

Высушенные пробы растворялись при нагревании на водяной бане в 2—2,5 мл бидестилированной воды. Для удаления из определяемой пробы большого избытка K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, который мешает полярографированию цинка, в пробу вливалось по 2,5 мл 2,5 N KCl (т. е. 0,466 г KCl). Такое количество KCl прибавлялось из того расчета, что в 1,0 мл H<sub>2</sub>O при полном насыщении может раствориться при 20° С 0,0143 г K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,3345 г KCl. Избыток H<sub>2</sub>O удалялся выпариванием на водяной бане.

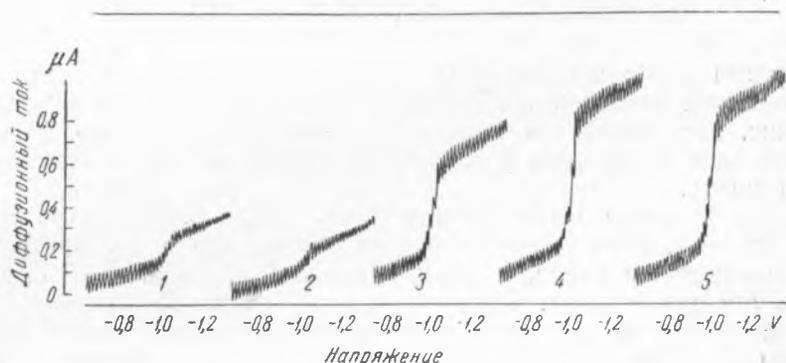


Рис. 1. Кривые 1 и 2 получены на слепых опытах, 3, 4, 5 — на контрольных пробах, в которые прибавлен Zn. Полярографирование производилось в 0,3 мл раствора. Чувствительность гальванометра  $1,515 \times 10^{-8}$  А/мм. Характеристика капельного электрода:  $m=2,4$  мг,  $t=4$  сек.,  $m^2/s^2t^3=2,26$ ,  $t=19^\circ\text{C}$

Выпаривание прекращалось, когда в колбе оставалось раствора оксю 1 мл. После выпаривания колбы с наружной поверхности тщательно осушались. Внутренняя поверхность горлышка осушалась кусочком фильтровальной бумаги. Колбы помещались на 30—40 мин. в эксикатор и затем взвешивались. Зная вес колбы с пробой, высушенной до постоянного веса, и вес ее с H<sub>2</sub>O и KCl, можно вычислить количество H<sub>2</sub>O, в котором растворена проба. Определение веса воды в пробе, подготовленной для полярографирования, требовалось для дальнейших количественных расчетов цинка.

Раствор пробы насыщен в отношении солей KCl и K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Количество остальных компонентов раствора, концентрация которых менялась, было очень небольшое. Поэтому соотношение между весом воды и объемом раствора пробы оставалось постоянным при этих условиях во всех пробах. Эмпирически было установлено, что при температуре 20° С 1,21 мл раствора пробы содержит 1 г H<sub>2</sub>O. Исходя из этого соотношения, по найденному весу H<sub>2</sub>O вычислялся объем раствора проб, подготовленных для полярографирования.

Проба из колбы переносилась пипеткой в узкую стеклянную пробирку. После отстаивания взвешенных частиц 0,15 мл раствора брались для полярографирования. К нему прибавлялось 0,02 мл 0,02% спиртового раствора натровой соли метиленовой красной, 0,01—0,04 мл 0,04 N NH<sub>4</sub>OH и бидестилированной H<sub>2</sub>O до общего объема 0,3 мл. NH<sub>4</sub>OH прибавлялась для доведения реакции раствора до pH = 5,5—6,0 (переход окраски индикатора).

Типичные результаты анализа приведены на рис. 1 и в табл. 1.

Таблица 1

№№ кривых	Колич. $H_2O$ , в котором растворена проба, в г	Объем раствора пробы, в мл	Диффузионный ток, в $\mu A$	Количество Zn, вычисленное по формуле Ильковича		Колич. Zn в пробе с учетом поправки на слепой опыт, в $\gamma$
				в 0,15 мл раствора в $\gamma$	во всей пробе в $\gamma$	
1	0,840	1,016	0,106	0,31	2,10	—
2	1,307	1,582	0,076	0,22	2,32	—
3	1,332	1,612	0,401	1,16	12,47	10,26
4	0,882	1,067	0,583	1,69	12,02	9,81
5	0,888	1,074	1,583	1,69	12,10	9,89

Данные табл. 1 характеризуют точность определения цинка полярографическим методом в усложненных условиях, близких к анализу эритроцитов. Они показывают, что при наличии в пробе 10  $\gamma$  Zn можно распределять его с точностью  $\pm 2-3\%$ . Чувствительность метода может быть еще более повышена за счет уменьшения объема раствора (до 0,5 мл), т. е. без увеличения количества цинка в анализируемой пробе.

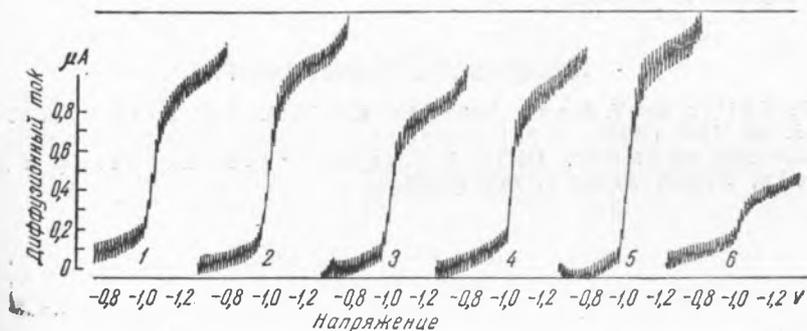


Рис. 2. Кривые 1, 2, 3, 4 и 5 получены на пробах эритроцитов, 6 — слепой опыт. Характеристика капельного электрода:  $m=2,91$ ,  $t=3,5$  сек.,  $m^2/t^3=2,51$ . Остальные параметры те же, что и на рис. 1

Определение цинка в эритроцитах. Эритроциты тщательно отмывались 0,9% раствором NaCl (без Zn). Для анализа брались навески около 1 г. Сжигание и подготовка проб для полярографирования производились так, как это делалось в контрольных опытах. Определение цинка производилось в эритроцитах кроликов. Параллельно измерялась активность угольной ангидразы крови по реакции гидратации. Для иллюстрации на рис. 2 приводятся данные одной серии анализов крови кролика на содержание цинка в эритроцитах.

В данной серии анализов использовались пробы крови кролика в одном из опытов совместной работы с Е. Ю. Ченыкаевой по изучению влияния повышенного содержания  $CO_2$  во вдыхаемом воздухе на угольную ангидразу крови.

Кривые рис. 2 по внешнему виду не отличаются от обычных поляризационных цинковых кривых (рис. 1). Результаты подсчета цинка в пробах эритроцитов кролика приведены в табл. 2.

Применяя дитизоновый метод, мы получали в 1 г эритроцитов кролика в среднем около 7,5 Zn. Данные, полученные полярографическим методом, того же порядка. Совпадение результатов определения цинка

№№ кривых	Колич. $H_2O$ , в котором растворена проба, в г	Объем раствора пробы, в мл	Диффузионный ток, $\mu A$	Количество Zn, вычисленное по формуле Ильковича		Колич. эритроцитов в пробе, в г	Колич. Zn в 1 г эритроц. с учетом поправки на следной опыт, в $\mu$	Актив. Деятельность ангидразы	% эритроцитов по гемокриту
				в 0,15 мл раствора, в $\mu$	во всей пробе, в $\mu$				
1	0,778	0,941	0,563	1,48	9,28	0,934	7,62	1,82	36,0
2	0,634	0,767	0,795	2,07	10,58	1,125	7,48	1,76	36,0
3	0,724	0,876	0,561	1,46	8,53	0,867	7,35	1,13	34,2
4	0,726	0,878	0,606	1,58	9,25	0,988	7,18	1,02	32,5
5	0,568	0,687	0,879	2,29	10,49	1,238	6,73	1,02	31,0
6	0,649	0,786	0,159	0,41	2,16	—	—	—	—

двумя принципиально разными методами говорит о достоверности полученных данных и подтверждает применимость полярографического метода для определения цинка в 0,5—1 г эритроцитов.

Физиологический институт  
им. И. П. Павлова  
Академии Наук СССР

Поступило  
18 VI 1947

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> D. Keilin and T. Mann, Nature, 144, 424 (1939). <sup>2</sup> D. Keilin and T. Mann, Bioch. J., 34, 1163 (1940). <sup>3</sup> Я. Гейровский, Полярографический метод, теория и практическое применение, ОНТИ, 1937, перев. <sup>4</sup> И. М. Кольтгоф и Дж. Дж. Лингейн, Успехи химии, 8, 1652 (1939).