

УДК 543.553.4

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТАХ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ АМПЕРОМЕТРИИ

© Н. М. Дубова, Г. Б. Слепченко, И. О. Максимчук,  
С. С. Бойченко, А. А. Орешина, Т. И. Щукина<sup>1</sup>

*Статья поступила 15 апреля 2016 г.*

Впервые показана возможность применения метода амперометрии для определения молочной кислоты на основе ингибирования процесса восстановления молибдена (VI) и амперометрического титрования с регистрацией диффузионного тока восстановления молочной кислоты на платиновом электроде. Оценено влияние различных факторов на величину диффузионного тока восстановления молочной кислоты (МК) и выбраны рабочие условия ее амперометрического определения. Изучено влияние различных органических кислот на определение МК методом амперометрического титрования. На основании полученных результатов предложены методики определения молочной кислоты в ветеринарных препаратах и сыворотке крови. Диапазон определяемых концентраций —  $3,0 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$  моль/дм<sup>3</sup> ( $S_r$  — не более 15 %). Правильность методики подтверждена методом «введено – найдено».

**Ключевые слова:** молочная кислота; амперометрия; методика определения; ветеринарные препараты; сыворотка крови.

Молочная кислота (МК) — одна из простейших гидроксикарбоновых одноосновных кислот. Основные процессы, происходящие с участием молочной кислоты, — гликолиз и глюконеогенез, и благодаря этим процессам концентрация молочной кислоты в биологических жидкостях находится в строго определенном диапазоне. Например, среднестатистическое содержание МК в крови человека — от 0,6 до 1,3 мМ/дм<sup>3</sup>, и превышение этого значения является маркером нарушений в функционировании организма [1, 2]: гипоксии, сердечной недостаточности и др.

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия; e-mail: microlab@mail.ru

Молочную кислоту также используют в ветеринарии как основу лекарственных препаратов для животных и в целях обеззараживания кормов и воды для них. В связи с этим простое и экспрессное определение молочной кислоты является актуальной задачей. Последние десятилетия проводится большое количество изысканий с целью создания методик определения МК в разнообразных, в том числе, ветеринарных и биологических объектах титриметрическими, хроматографическими и другими методами. Известен метод одновременного определения *d*- и *l*-энантиомеров молочной кислоты в плазме крови человека с использованием высокоэффективной жидкостной хромато-

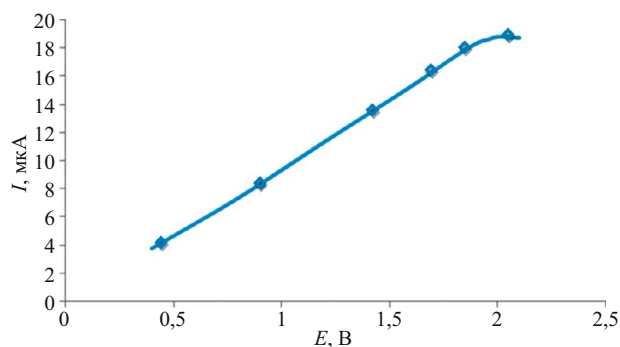


Рис. 1. Катодная поляризационная кривая для Mo (VI): фон — 0,1 М раствор  $\text{NaNO}_3$ ; pH = 1;  $C(\text{MoO}_4^{2-}) = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>

графии с флуоресцентным детектированием в диапазоне концентраций 10 – 200 мкмоль/дм<sup>3</sup> [3]. Весьма перспективными методами для решения указанных задач являются экспрессные и достаточно чувствительные электрохимические методы анализа. Предложены способы определения различных органических кислот с пределами обнаружения в интервале 0,1 – 1,6 мкмоль/дм<sup>3</sup> с использованием электрофореза с кондуктометрическим детектором [4], капиллярного электрофореза [5, 6], электрохимических сенсоров [7 – 11]. Находят применение в анализе различные новые биосенсоры: золотой или платиновый печатный электрод SensLab, поверхность которого иммобилизована оксидазой лактата (предел обнаружения МК составляет 10 мкмоль/дм<sup>3</sup>) и др. [8 – 11]. Известен полярографический способ определения МК на ртутном каплюющем электроде [12], основанный на ингибировании процесса восстановления молибдена. Способ вольтамперометрического определения молочной кислоты, предложенный в работе [13], основан на использовании реакции электровосстановления МК на ртутно-пленочном или стеклоуглеродном электроде. Предложенный способ прост и обладает удовлетворительными метрологическими характеристиками, однако диапазон определяемых концентраций составляет от 2,3 ммоль/дм<sup>3</sup> до 2,0 моль/дм<sup>3</sup>, что не позволяет определять нормальные содержания МК в сыворотке крови. Поэтому возникает необходимость в разработке более чувствительного, простого и экспрессного электрохимического метода определения МК, например, амперометрического.

Целью исследования является разработка условий и методик определения МК в биологических и ветеринарных объектах амперометрическим методом.

Определение МК методом амперометрии проводили с использованием вольтамперометрического комплекса для аналитических измерений СТА (ООО «ИТМ», г. Томск). В качестве индикаторного электрода использовали платиновый электрод; электрод сравнения — хлоридсеребряный.

Мы исследовали возможность использования эффекта ингибирования молочной кислотой процес-

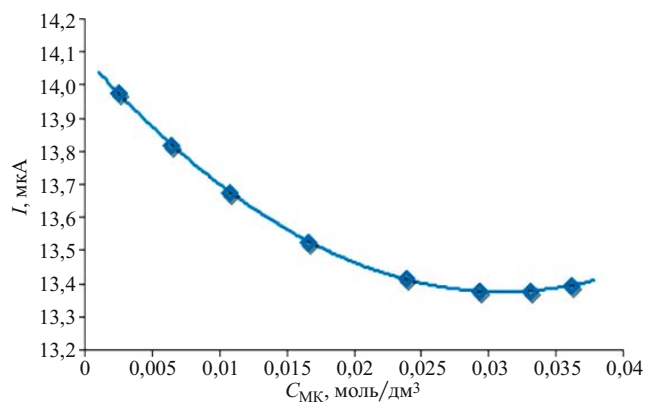


Рис. 2. Зависимость тока восстановления молибдена (VI) от концентрации МК: фон — 0,1 М раствор  $\text{NaNO}_3$ , pH = 1;  $C(\text{MoO}_4^{2-}) = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>

са восстановления Mo (VI) для ее амперометрического определения на платиновом электроде, поскольку применение РКЭ нежелательно. Изучено влияние различных фоновых электролитов:  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_4$  (с pH от 1 до 9) на процесс восстановления Mo (VI) на платиновом электроде. С этой целью регистрировали поляризационные кривые восстановления Mo (VI) в интервале потенциалов от 1,0 до –2,1 В. Воспроизводимые поляризационные кривые восстановления Mo (VI) удалось зарегистрировать в 0,1 М растворе  $\text{NaNO}_3$ , pH = 1 (кислую среду создавали добавлением азотной кислоты).

Диффузионный ток восстановления Mo (VI) ( $I_{\text{диф}}$ ) наблюдался при значении  $E = -1,8$  В (рис. 1).

Добавление МК вызывает ингибирование процесса электровосстановления молибдена и, соответственно, уменьшение его диффузионного тока (рис. 2) в интервале концентраций молочной кислоты 0,005 – 0,03 моль/дм<sup>3</sup>. Этот эффект можно использовать для определения МК в объектах с достаточно высоким ее содержанием. Указанным методом мы проанализировали ветеринарную 40 %-ную молочную кислоту.

Результат определения МК в ветпрепарате составил  $(40,3 \pm 0,6)$  %, правильность способа проверена методом «введено – найдено».

С учетом экспериментальных данных, приведенных в работе [12], представляло интерес изучение способности МК к электропревращениям на платиновом электроде в целях дальнейшего использования этих свойств для ее определения методом амперометрического титрования (АТ).

Для этого регистрировали анодные и катодные поляризационные кривые для МК на платиновом электроде от 1,0 до –2,0 В и наоборот в перечисленных ранее фоновых электролитах. В боратном буферном растворе (pH = 9,18) получены четко выраженные катодные поляризационные кривые МК. Диффузионный ток электровосстановления МК (рис. 3), связанный, вероятно, с электропревращениями в карбоксильной группе, регистрировали при

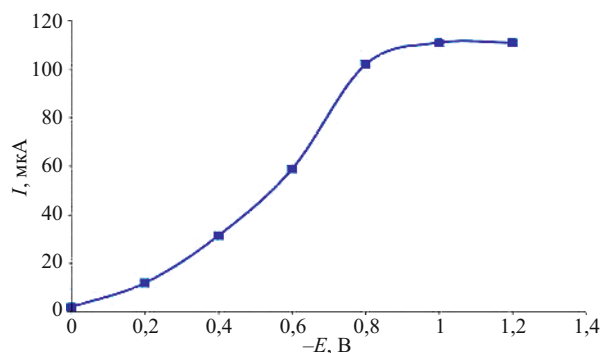


Рис. 3. Катодная поляризационная кривая МК: фон — боратный буферный раствор (рН = 9,18); Pt-электрод;  $C_{МК} = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>

$E = -0,9$  В. Указанное значение потенциала использовали в дальнейшем в методе амперометрического титрования (АТ).

Определение МК методом амперометрического титрования включает регистрацию катодного диффузионного тока восстановления МК на платиновом электроде при постоянном потенциале  $E = -0,9$  В в процессе титрования исследуемого раствора щелочью (0,01 – 0,1 М КОН) и построение кривой амперометрического титрования в координатах: диффузионный ток МК — объем титранта (эквивалентный объем щелочи, затраченной на титрование МК, нашли графическим способом) (рис. 4).

Количество щелочи (ммоль), затраченное на титрование МК, прямо пропорционально ее содержанию в растворе в диапазоне концентраций  $3,0 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$  моль/дм<sup>3</sup>, следовательно, в этом интервале концентраций возможно определение МК разработанным способом. При использовании метода АТ диапазон определяемых концентраций МК на 2 – 3 порядка величины шире, чем для описанного выше метода и метода вольтамперометрии [13], что расширяет возможность определения МК в биологических объектах.

Известно, что определению МК мешает присутствие в растворе различных органических кислот, в том числе уксусной.

Нами изучено влияние уксусной кислоты на определение МК методом АТ в выбранных условиях и установлено, что уксусная кислота не влияет на определение МК в соотношении 1:1.

На основе полученных данных по амперометрическому поведению МК разработана методика ее определения для осуществления эффективного контроля

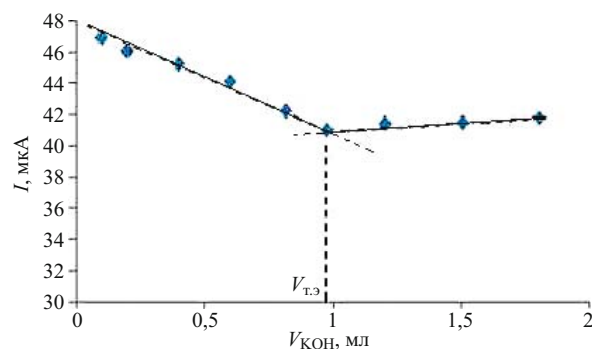


Рис. 4. Кривая амперометрического титрования МК на платиновом электроде: фон — боратный буферный раствор (рН = 9,18);  $C_{МК} = 2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>

за содержанием МК в биологических объектах (сыворотке крови).

Сущность методики состоит в следующем: к 1 – 10 см<sup>3</sup> пробы добавляют 10 – 15 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и 0,4 см<sup>3</sup> соляной кислоты концентрации 6 – 7 моль/дм<sup>3</sup> порциями по 0,1 см<sup>3</sup>. Смесь слегка перемешивают и оставляют на 15 мин, после чего разливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 15 мин при скорости 6000 мин<sup>-1</sup>. Центрифугат сливают в коническую колбу и добавляют 2 – 3 г сульфата аммония порциями по 1 г, каждый раз перемешивая содержимое колбы стеклянной палочкой до растворения соли. Колбу с пробой оставляют на 20 мин, после чего содержимое колбы разливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 15 мин при скорости 6000 мин<sup>-1</sup>. Центрифугат фильтруют в чистую мерную колбу объемом 50 мл через двойной слой бумажного фильтра (синяя лента) и разбавляют содержимое фоновым электролитом (боратным буферным раствором, рН = 9,18) до метки.

Измерение проводят следующим образом. В электрохимическую ячейку переносят содержимое мерной колбы, погружают очищенный в концентрированной азотной кислоте платиновый электрод и хлоридсеребряный электрод. При потенциале  $E = -0,9$  В проводят титрование, добавляя к полученному раствору по 0,1 – 0,05 см<sup>3</sup> 0,01 – 0,1 М КОН, измеряют предельный ток восстановления МК и строят кривую амперометрического титрования  $I(МК) = f(V_{КОН})$ . Из кривой амперометрического титрования находят объем щелочи  $V_{т.э.}(КОН)$ , затраченный на титрование молочной

Результаты определения МК методом амперометрического титрования в модельных растворах с добавкой МК и в сыворотке крови методом «введено – найдено» ( $n = 5$ ;  $P = 0,95$ )

Объект	$C(МК) \cdot 10^3$ , моль/дм <sup>3</sup>		
	В пробе	Введено	Найдено
Модельный раствор с добавкой $0,30 \cdot 10^{-3}$ моль/дм <sup>3</sup> МК	$0,27 \pm 0,03$	0,20	$0,48 \pm 0,06$
Модельный раствор с добавкой $0,40 \cdot 10^{-3}$ моль/дм <sup>3</sup> МК	$0,44 \pm 0,06$	0,20	$0,61 \pm 0,07$
Сыворотка крови	$0,12 \pm 0,01$	0,20	$0,31 \pm 0,04$

кислоты, и по закону эквивалентности рассчитывают ее концентрацию в растворе:

$$C(\text{МК}) = \frac{C(\text{КОН})V_{\text{т.э}}(\text{КОН})}{V},$$

где  $V$  — объем ячейки с учетом разбавления пробы.

Правильность методики проверяли методом «введено — найдено». Результаты приведены в таблице. Модельный раствор приготовлен из бидистиллированной воды с добавлением МК.

Погрешность определения МК не превышала 10–15%. Диапазон определяемых содержаний молочной кислоты методом амперометрии составляет от  $3,0 \cdot 10^{-5}$  —  $1 \cdot 10^{-1}$  моль/дм<sup>3</sup>.

Таким образом, исследована возможность амперометрического определения молочной кислоты при использовании эффекта ингибирования МК процесса электровосстановления Мо (VI) на платиновом электроде. Данный способ рекомендован для контроля содержания МК в ветеринарных препаратах. Показана возможность определения МК методом АТ с регистрацией диффузионного тока восстановления МК на платиновом электроде при постоянном потенциале  $E = -0,9$  В в процессе титрования исследуемого раствора щелочью (0,1 — 0,01 М КОН). Установлено, что чувствительность определения МК методом АТ превышает чувствительность определения МК в первом случае на 2–3 порядка величины. Предложенный способ определения МК на платиновом электроде методом АТ позволил разработать методику определения МК в сыворотке крови в диапазоне концентраций  $3,0 \cdot 10^{-5}$  —  $1 \cdot 10^{-1}$  моль/дм<sup>3</sup> с относительной погрешностью 15–20%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Волков А. И., Жарский И. М. Большой химический справочник. — М.: Современная школа, 2005. — 608 с.
2. Осипова Е. А. Электроаналитические методы и проблема охраны окружающей среды / Сорский образовательный журнал. 2011. Т. VII. № 2. С. 48–54.
3. Cevasco G., Patek A. M., Scapolla C., Thea S. A simple, sensitive and efficient assay for the determination of *d*- and *l*-lactic acid enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography / J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218. N 6. P. 787–792.
4. Danč L., Bodor R., Troška P., et al. Determination of metabolic organic acids in cerebrospinal fluid by microchip electrophoresis / Electrophoresis. 2014. Vol. 35. N 15. P. 2146–2154.
5. Truičá (Badea) G., Teodor E. D., Radu G. L. Organic acids assessments in medicinal plants by capillary electrophoresis / Rev. Roum. Chim. 2013. Vol. 58. N 9–10. P. 809–814.
6. Голубенко А. М., Никоноров В. В., Никитина Т. Г. Определение гидроксикарбоновых кислот в продуктах питания методом капиллярного электрофореза / Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 9. С. 866–870.
7. Кирсанов Д. О., Легин А. В., Куликова А. П. и др. Полимерные сенсоры для определения анионов органических кислот / Журн. прикл. химии. 2007. Т. 80. № 5. С. 821–826.
8. Parra A., Casero E., Vázquez L., et al. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces / Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 555. N 2. P. 308–315.
9. Горюшкіна Т. Б., Шкотова Л. В., Слост'я Е. А. и др. Оптимізація методики визначення лактату у виноматеріалі амперометричним ферментним біосенсором / Сенсор. електрон. і мікросистем. технол. 2008. N 2. P. 39–47.
10. Chen Yuquan, Guan Wenjun, Li Guang, Pan Min. Multiself-reactance touchcontrol for monitoring of diabetes / Chin. J. Anal. Chem. 2004. Vol. 32. N 9. P. 1199–1202.
11. Zanini V. P., De Mishima B. L., Labbé P., Solis V. An *l*-lactate amperometric enzyme electrode based on *l*-lactate oxidase immobilized in a laponite gel on a glassy carbon electrode. Application to dairy products and red wine / Electroanalysis. 2010. Vol. 22. N 9. P. 946–954.
12. Кулаева Л. Т., Сирко В. Н., Макарова Л. М. Полярографический анализ содержания молочной кислоты / Изв. вузов. Пищевая технология. 1999. № 5–6. С. 86–87.
13. Максимчук И. О., Слепченко Г. Б. Определение молочной кислоты методом вольтамперометрии / Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2016. Т. 82. № 3. С. 24–28.

## REFERENCES

1. Volkov A. I., Zharskii I. M. Bol'shoi khimicheskii spravochnik [Large chemical reference book]. — Moscow: Sovremennaya shkola, 2005. — 608 p. [in Russian].
2. Osipova E. A. Élektroanaliticheskie metody i problema okhrany okruzhayushchei sredy [Electro-analytical methods and problem of guard of environment] / Sorov. Obrazov. Zh. 2011. Vol. VII. N 2. P. 48–54 [in Russian].
3. Cevasco G., Patek A. M., Scapolla C., Thea S. A simple, sensitive and efficient assay for the determination of *d*- and *l*-lactic acid enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography / J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218. N 6. P. 787–792.
4. Danč L., Bodor R., Troška P., et al. Determination of metabolic organic acids in cerebrospinal fluid by microchip electrophoresis / Electrophoresis. 2014. Vol. 35. N 15. P. 2146–2154.
5. Truičá (Badea) G., Teodor E. D., Radu G. L. Organic acids assesments in medicinal plants by capillary electrophoresis / Rev. Roum. Chim. 2013. Vol. 58. N 9–10. P. 809–814.
6. Golubenko A. M., Nikonorov V. V., Nikitina T. G. Determination of hydroxycarboxylic acids in food products by capillary electrophoresis / J. Anal. Chem. 2012. Vol. 67. N 9. P. 778–782.
7. Kirsanov D. O., Legin A. V., Kulikova A. P., et al. Polimernye sensory dlya opredeleniya anionov organicheskikh kislot [Polymeric touch-controls for determination of anions of organic acids] / Zh. Prikl. Khimii. 2007. Vol. 80. N 5. P. 821–826 [in Russian].
8. Parra A., Casero E., Vázquez L., et al. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces / Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 555. N 2. P. 308–315.
9. Goryushkina T. B., Shkotova L. V., Slast'ya E. A., et al. Optimizatsiya metodiki viznachennya laktatu u vinomateriali amperometricnim fermentnim biosensorom [Optimization of methods for determining lactate in the wine material using an amperometric enzyme biosensor] / Sensor. Elektron. Mikrosistem. Tekhnol. 2008. N 2. P. 39–47 [in Ukrainian].
10. Chen Yuquan, Guan Wenjun, Li Guang, Pan Min. Multiself-reactance touchcontrol for monitoring of diabetes / Chin. J. Anal. Chem. 2004. Vol. 32. N 9. P. 1199–1202.
11. Zanini V. P., De Mishima B. L., Labbé P., Solis V. An *l*-lactate amperometric enzyme electrode based on *l*-lactate oxidase immobilized in a laponite gel on a glassy carbon electrode. Application to dairy products and red wine / Electroanalysis. 2010. Vol. 22. N 9. P. 946–954.
12. Kulaeva L. T., Sirko V. N., Makarova L. M. Polyarograficheskii analiz soderzhaniya molochnoi kisloty [Polarographic analysis of the lactic acid content] / Izv. Vuzov. Pishch. Tekhnol. 1999. N 5–6. P. 86–87 [in Russian].
13. Maksimchuk I. O., Slepchenko G. B. Opredelenie molochnoi kisloty metodom vol'tamperometrii [Voltammetric determination of lactic acid] / Zavod. Lab. Diagn. Mater. 2016. Vol. 82. N 3. P. 24–28 [in Russian].