

Л. И. Митькина, И. И. Зайцева

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИД-ИОНОВ В РАСТВОРАХ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

НПЦ "Фармзащита", Химки, Московская область

Высокополимерная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является перспективной основой препаратов медицинского назначения [1]. По технологии выделения [2] в качестве основной примеси ионного характера натриевая соль ДНК (ДНК-Na) содержит хлористый натрий.

Определение хлорид-ионов в ДНК в литературе не описано. В [3] приведена методика определения суммарного количества ионных примесей в препаратах ДНК ионообменным методом. Селективное определение хлорид-ионов в ДНК обычными титриметрическими методами (аргентометрический, меркуриметрический) не представляется простым вследствие известных комплексообразующих свойств ДНК по отношению к ионам металлов [4, 5]. Целью настоящей работы была проверка возможности использования указанных титриметрических методов для определения хлорид-ионов в растворах ДНК.

В настоящей работе предлагаются три методики определения хлорида натрия в растворах ДНК-Na: меркуриметрическое титрование в присутствии ионов Ni^{2+} в качестве блокирующего агента и две методики аргентометрического титрования с амперометрической и потенциометрической индикацией конечной точки титрования.

Экспериментальная часть

В работе использовали водные и изотонические растворы натриевой соли высокомолекулярной ДНК с молекулярной массой $12 - 15 \cdot 10^6$, выделенной из молок осетровых рыб по методике [2], и низкомолекулярной с молекулярной массой $0,3 - 0,6 \cdot 10^6$ — по методике [6].

Отработку методик проводили на модельных растворах, состоящих из обессоленных растворов ДНК и растворов хлорида натрия известной концентрации. Обессоливание растворов ДНК осуществляли пропусканием через смесь катионита КУ-2 в H^+ -форме и анионита Дауэкс-2 в OH^- -форме [3].

Амперометрическое титрование проводили на установке типа ПАТ с максимальной чувствительностью гальванометра $5 \cdot 10^{-8}$ А/деление шкалы по току катодного восстановления серебра. В качестве индикаторного электрода использовали графитовый электрод, импрегнированный парафином. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод. При потенциометрическом титровании использовали твердофазные хлоридселективные индикаторные электроды: электрод ИСЭТ производства НИИХ ЛГУ, электроды фирм Radiometer и Corning. Титрование прово-

дили соответственно на иономере И-120М, автотитраторе фирмы "Radiometer" и рН-метре фирмы "Corning". Электродом сравнения служил хлорсеребряный или каломельный электрод. Электрод сравнения соединяли с анализируемым раствором посредством солевого ключа, заполненного 1 н. раствором нитрата калия.

Для понижения комплексообразующих свойств ДНК определение хлорид-ионов проводили в кислой среде. В целях установления наличия систематической ошибки определения проводили "холостой" опыт — титрование обессоленного раствора ДНК. При меркуриметрическом определении хлорид-ионов в ДНК установлено наличие взаимодействия ионов Hg^{2+} с ДНК. Были предприняты попытки блокирования реакционноспособных групп ДНК с помощью различных ионов металлов (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Bi^{3+} , Cd^{2+}). Только в присутствии эквивалентного и большего количества ионов Ni^{2+} (нуклеотид: $Ni^{2+} = 1:1 - 1:10$) затрачивается меньшее количество титранта, чем в его отсутствие, что можно объяснить блокированием реакционноспособных групп ДНК ионами Ni^{2+} . Нами были оценены константы устойчивости ДНК с ионами Ni^{2+} и Hg^{2+} по методу Скетчарда, описанному в работе [4]. Константы устойчивости комплексов Ni-ДНК и Hg-ДНК практически одинаковы. Прибавление ионов никеля приводит к коагуляции комплексов Ni-ДНК, что выводит ДНК из последующего взаимодействия с ионами Hg^{2+} . Следовательно, при соотношении Ni^{2+} : ДНК от 1:1 до 1:10 ионы Ni^{2+} практически полностью блокируют способные к взаимодействию с ионами Hg^{2+} группы ДНК.

**Методика определения хлорида натрия в
растворах высокомолекулярной ДНК
меркуриметрическим методом**

Около 25 г (точная навеска) водного или 5 г (точная навеска) изотонического раствора ДНК-Na помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл воды в случае изотонического раствора ДНК-Na, 5 мл раствора азотнокислого никеля, 1 мл 1 н. раствора азотной кислоты, 5 капель 1 % спиртового раствора дифенилкарбазона и титруют 0,05 н. или 0,1 н. раствором нитрата окисной ртути до перехода окраски из желто-зеленой в серо-синюю или сиреневую в случае водного и изотонического раствора ДНК-Na соответственно. Раствор азотнокислого никеля готовят растворением 3,0 г металлического никеля (ГОСТ 849-70) в 20 мл разбавленной (1:1) азотной кислоты при кипячении. Объем полученного раствора доводят водой до 1 л. При определении содержания примеси хлорида натрия в водных растворах ДНК-Na необходимо вводить поправку на объем раствора нитрата ртути, затра-

Таблица 1
Результаты определения хлорида натрия в модельных растворах высокомолекулярной ДНК-Na меркуриметрическим методом

Введено NaCl, мг/мл	Определено NaCl, мг/мл	Относительная ошибка, %
9,03	9,13	1,1
9,00	9,11	1,2
7,45	7,45	0
7,45	7,55	1,3
9,00	9,01	0,1
0,334	0,337	0,9
0,334	0,335	0,3
0,334	0,339	1,5
0,177	0,181	2,3
0,220	0,221	0,5
0,173	0,178	2,9
0,173	0,180	4,0

чиваемый на титрование обессоленного раствора ДНК — результат холостого опыта, что объясняется большим содержанием ДНК в титруемом растворе (по сравнению с хлоридом натрия), затрудняющим фиксирование перехода окраски индикатора. Для раствора ДНК-Na концентрации 3 мг/мл V_0 составляет 0,2 мл.

В табл. 1 приведены результаты определения хлорида натрия в модельных растворах ДНК меркуриметрическим методом в присутствии ионов никеля. Как видно из табл. 1, при уменьшении содержания хлорида натрия в растворах ДНК-Na ошибка определения возрастает. Поскольку такая ошибка определения вызвана визуальной индикацией конечной точки титрования (КТТ), то исследовали возможность определения хлорид-ионов в ДНК-Na с электрометрической индикацией КТТ (амперометрическое и потенциометрическое титрование). Использовали аргентометрический метод. Результаты титрования по методу Фольгарда (обратное титрование) показали, что имеется взаимодействие ДНК с ионами Ag^+ в условиях титрования. Попытки маркирования реакционноспособных групп ДНК с помощью различных ионов металлов (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Bi^{3+}) не дали положительных результатов. Прямое титрование обессоленных растворов ДНК с амперометрической или потенциометрической индикацией КТТ показало возможность определения хлорид-ионов аргентометрическим методом (табл. 2 и 3).

Таблица 2
Результаты определения хлорида натрия в модельных растворах высокомолекулярной ДНК-Na методом амперометрического титрования

Введено NaCl, мг/мл	Определено NaCl, мг/мл	Относительная ошибка, %
0,374	0,373	0,27
0,150	0,150	0
0,0749	0,0738	1,47
0,0374	0,0368	1,60

Таблица 3
Результаты определения хлорида натрия в модельных растворах низкомолекулярной ДНК-Na методом потенциометрического титрования

Введено NaCl, мг/мл	Определено NaCl, мг/мл	Относительная ошибка, %
0,500	0,501	0,2
0,250	0,255	2,0
0,450	0,454	0,9
0,450	0,455	1,1
8,18	8,21	0,4
8,72	8,68	0,5
8,40	8,43	0,4

Титрование проводили после предварительного кипячения раствора ДНК-Na в 0,5 н. растворе хлорной кислоты в течение 20 мин, которое приводит к получению прозрачных растворов. При амперометрическом титровании потенциал индикаторного электрода был выбран равным нулю в соответствии с литературными данными [7, 8].

Методика определения хлорида натрия в водном растворе ДНК-Na методами амперометрического или потенциометрического титрования

5 мл раствора ДНК-Na помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты и кипятят на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 20 мл полученного раствора помещают в химический стакан вместимостью 50 мл, в случае амперометрического титрования добавляют 2–3 капли раствора желатина 0,1 %, погружают в раствор индикаторный электрод и электролитический ключ и проводят амперометрическое или потенциометрическое титрование 0,02 н. раствором нитрата серебра, прибавляя по 0,1 мл титранта. При амперометрическом титровании объем нитрата серебра, пошедший на титрование, определяют графическим путем экстраполяцией прямолинейных участков на кривой зависимости силы тока от объема добавленного титранта. При потенциометрическом титровании точку эквивалентности определяют расчетным путем

Таблица 4
Результаты определения хлорида натрия в растворах высокомолекулярной ДНК-Na ($n = 3$)

Меркуриметрический метод				Метод амперометрического титрования			
\bar{X} , мг/мл	S	ϵ	A, %	\bar{X} , мг/мл	S	ϵ	A, %
0,245	0,0017	0,005	1,63	0,247	0,0010	0,002	0,81
0,389	0,0045	0,011	2,83	0,403	0,0007	0,002	0,50
0,154	0,0020	0,005	3,25	0,157	0,0010	0,002	1,27
0,169	0,0020	0,005	2,96	0,174	0,0007	0,002	1,15
0,093	0,0026	0,006	6,45	0,097	0,0007	0,002	2,06
8,68	0,012	0,003	0,35	8,32	0,036	0,09	1,08
14,13	0,017	0,04	0,28	14,09	0,046	0,11	0,81
8,34	0,026	0,06	0,72	8,11	0,020	0,05	0,62

[9] или по дифференциальной кривой в случае автоматической записи. Титр 0,02 н. раствора нитрата серебра проверяют в день его употребления по раствору натрия хлорида известной концентрации соответствующим методом, соблюдая условия титрования, указанные выше.

При меркуриметрическом титровании низкомолекулярной ДНК (молекулярная масса $0,3 - 0,6 \cdot 10^6$) установление КТТ затруднено из-за получения мелкодисперсного осадка ДНК в условиях титрования и вследствие этого сильной мутности раствора. Для анализа растворов низкомолекулярной ДНК с успехом могут быть использованы методы амперометрического и потенциометрического титрования. Метод амперометрического титрования вследствие его высокой чувствительности рекомендуем использовать для определения хлорида натрия в водных растворах ДНК-На с низкой концентрацией соли, метод потенциометрического титрования — для анализа растворов ДНК на изотоническом растворе. Использование осадительного потенциометрического титрования с индикацией конечной точки с помощью твердофазного хлоридселективного электрода и автоматической записью кривых позволяет проводить определение хлорид-ионов в растворах ДНК-На с достаточной точностью и в сравнении с амперометрическим титрованием суще-

ственно сократить время проведения анализа. В табл. 4 приведены результаты определения хлорида натрия в растворах высокомолекулярной ДНК-На различными методами.

Таким образом, разработанные методики позволяют проводить определение хлорид-ионов в растворах как высокомолекулярной, так и низкомолекулярной ДНК в широком диапазоне концентраций хлористого натрия с погрешностью определения порядка 2 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Е. Чеботарев, Э. З. Рябова, В. М. Индык, *Защитное и лечебное действие экзогенной ДНК при облучении быстрыми нейтронами*, Киев (1974) сс. 45 – 102.
2. А. К. Реброва, И. Г. Аносова, Ю. П. Вайнберг, Л. Б. Шагалов, *Хим.-фарм. журн.*, **16**(7), 67 – 70 (1982).
3. С. М. Филиппов, Р. Х. Хамизов, А. И. Кузнецов, *Деп. ВИНТИ № 4504 – 77 от 25.11.77*, Москва (1977).
4. А. С. Полинский, *Дисс. канд. хим. наук*, Москва (1982).
5. К. Б. Яцимирский, Е. Е. Крисс, в сб.: *Молекулярные основы жизненных процессов*, Киев (1966).
6. Ю. П. Вайнберг, Л. Б. Шагалов, И. Г. Аносова и др. А. с. № 1410494 СССР, заявл. 19.06.86 № 4107952, опубл. 15.03.88.
7. В. М. Масалович, *Зав. лаб.*, **37**(5), 525 – 527 (1971).
8. Р. А. Мухамедшина, М. И. Чумаченко, *Узбекский химич. журн.*, № 3, 22 – 24 (1966).
9. *Государственная Фармакопея СССР*, XI изд., вып. 1., Москва (1987), с. 120.

Поступила 05.12.02