

На правах рукописи



Попова Валентина Александровна

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТ-ИОНОВ И
S-НИТРОЗОТИОЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент Короткова Елена Ивановна

Официальные оппоненты:

Иванова Алла Владимировна, доктор химических наук, доцент, доцент кафедры аналитической химии, Химико-технологический институт, «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург

Бакибаев Абдигали Абдиманович, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории органического синтеза, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Защита состоится «11» февраля 2021 года в «17.00»

на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина 43 а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: dis.tpu.ru

Автореферат разослан «__» декабря 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета



Е. В. Дорожко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Соединения азота, в частности, оксид азота II (NO) и образующиеся после его окисления нитрит-ионы, а также его субстраты S-нитрозотиолы, играют важную роль в биохимических процессах организма. Особая роль этих соединений обусловлена, прежде всего, стимуляцией иммунной системы организма, которая распознает и уничтожает чужеродные тела и раковые клетки. Однако злокачественное новообразование способно к избеганию иммунологического надзора организма. Более того, клетки иммунной системы могут способствовать росту опухоли через индукцию иммуносупрессии противоопухолевых механизмов и усиление ангиогенеза. Существует ряд клеток иммунной системы, которые в зависимости от их функционального статуса могут быть связаны как опухолеподдерживающей, так и противоопухолевой активностью иммунной системы.

Макрофаги являются важными клетками системы врожденного иммунитета, выполняющими ряд функций, среди которых индукция иммунного ответа, регенерация тканей и т.д. В зависимости от выполняемой функции различным популяциям макрофагов присущи различные свойства. Существует два типа макрофагов: M1 и M2-поляризованные формы. Образование оксида азота в результате действия фермента индуцибельной NO-синтазы, является одним из ключевых факторов, позволяющих различить M1 и M2 поляризованные макрофаги. В свою очередь, оксид азота является эффекторной молекулой, обуславливающей цитотоксичность M1-поляризованных макрофагов, макрофаги M2 типа оксид азота не продуцируют. Управление сигнальными путями, по которым образуются макрофаги M1 или M2 предоставит возможность манипулировать фенотипом и, прежде всего, функцией макрофага при раке, направляя их в сторону предпочтительного M1-типа и улучшения исхода заболевания.

Известно также, что образование NO в организме человека может происходить посредством высвобождения этой молекулы из S-нитрозотиолов. Считается, что S-нитрозотиолы являются донорами NO и играют важную роль при транспортировке и выделении этой молекулы в организме человека. Разнообразие биологических функций S-нитрозотиолов постоянно раскрывается. Таким образом, механизм разложения S-нитрозотиолов имеет большое значение для понимания биохимии организма человека. Важным вопросом в этом является эффективная и быстрая система детекции для фиксирования происходящих в клетке изменений.

На сегодняшний день в литературе имеется достаточное количество методов по определению нитрит-ионов. Однако, в биологических жидкостях их определение затруднено в связи с мешающим влиянием компонентов матрицы. Что касается S-нитрозотиолов, то до сих пор не существует золотого стандарта по определению этих соединений в биологических объектах. Это связано с тем, что в биологических средах количество нитрозотиолов варьируются от десятой нмоль до менее десяти мкмоль в литре. Несмотря на обилие исследований в этой области, представляется актуальной разработка новых, более простых и

чувствительных методов для мониторинга метаболитов и субстратов оксида азота в биологических жидкостях.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является исследование физико-химических закономерностей окисления-восстановления нитрит-ионов и S-нитрозотиолов на графитовом модифицированном электроде (ГМЭ) и разработка вольтамперометрических методик их количественного определения.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Изучить физико-химические закономерности влияния различных факторов (рН фонового электролита, потенциала и времени накопления, скорости развертки потенциала) на процесс электроокисления нитрит-ионов на ГМЭ;

2. Разработать вольтамперометрическую методику определения нитрит-ионов как метаболитов оксида азота на ГМЭ для применения ее к биологическим жидкостям. Оценить метрологические характеристики методики;

3. Изучить мешающее влияние компонентов биологической матрицы на аналитический сигнал нитрит-ионов;

4. Провести сравнительное определение нитрит-ионов в надклеточных жидкостях M1 и M2 поляризованных макрофагов вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами;

5. Изучить физико-химические закономерности окисления-восстановления S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) как представителя S-нитрозотиолов на ГМЭ;

6. Разработать методику определения S-нитрозотиолов как субстратов оксида азота для применения ее к биологическим жидкостям. Оценить метрологические характеристики методики;

7. Провести сравнительное определение S-нитрозотиолов в крови человека вольтамперометрическим и флуориметрическим методами.

Научная новизна работы:

1. Исследованы закономерности электроокисления нитрит-ионов на ГМЭ. Разработан вольтамперометрический подход для экспрессного определения нитрит-ионов как метаболитов оксида азота в макрофагах, выделенных из моноцитов периферической крови человека.

2. Исследованы закономерности и предложен вероятный механизм электровосстановления S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламина на поверхности ГМЭ. Показано, что процесс электровосстановления носит необратимый двухстадийный характер. Лимитирующая стадия процесса характеризуется переносом первого электрона.

3. Впервые разработан вольтамперометрический подход для экспрессного определения S-нитрозотиолов в модельных средах как субстратов оксида азота на ГМЭ. Проведена оценка метрологических характеристик методики. Разработанная методика применена для определения S-нитрозотиолов в биологических жидкостях.

Практическая значимость.

Разработанная вольтамперометрическая методика определения нитрит-ионов на ГМЭ применена для их определения как NO-метаболитов в надклеточных жидкостях макрофагов M1 и M2 типов. Проведена оценка метрологических характеристик методики. Результаты исследования показали принципиальную возможность использования разработанного вольтамперометрического метода для оценки содержания нитрит-ионов в супернатантах культуры индуцированных макрофагов для оценки их фенотипа.

Полученные результаты рекомендованы к применению в онкодиспансерах для оперативного мониторинга терапии онкологических заболеваний по содержанию NO-метаболитов в супернатантах моноцитов и макрофагов, выделенных из периферической крови человека. Экономическая эффективность внедряемой методики обусловлена простотой в использовании, низкой себестоимостью анализа, экспрессностью и высокой чувствительностью.

Разработана вольтамперометрическая методика экспрессного определения S-нитрозотиолов как субстратов оксида азота на ГМЭ, которая нашла применение для количественного обнаружения этих соединений в биологических жидкостях. Рассчитаны метрологические характеристики методики.

Личный вклад автора: состоял в изучении и систематизации литературных данных по методам выделения, определения NO-метаболитов и S-нитрозотиолов, а также в проведении экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования влияния различных факторов (рН фонового электролита, потенциала и времени накопления, скорости развертки) на процесс электрохимического окисления нитрит-ионов на ГМЭ;

2. Результаты исследования влияния компонентов биологической матрицы на электрохимическое окисление нитрит-ионов;

3. Вольтамперометрическая методика определения нитрит-ионов на ГМЭ Метрологические характеристики методики;

4. Результаты исследования влияния различных факторов (рН фонового электролита, потенциала и времени накопления, скорости развертки потенциала) на процесс электрохимического восстановления S-Нитрозо-N-ацетилпенициллина как представителя S-нитрозотиолов на ГМЭ;

5. Вольтамперометрическая методика определения S-нитрозотиолов на ГМЭ в модельных средах. Метрологические характеристики методики.

Апробация результатов работы: Результаты работы были представлены и обсуждались на XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2017); VI Международной научной конференции «Теоретическая и экспериментальная химия» (Караганда, 2017); XIX Международной научно-практической конференции "Химия и химическая технология в XXI веке" студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2018); 17 Международной конференции по электроанализу

(ESEAC 2018), (Родос, 2018); 14 Международной научной конференции «Современные методы аналитической химии» (Прага, 2018); XX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2019); 7 Региональном симпозиуме по электрохимии (RCE-SEE) и 8 симпозиуме Курта Швабе (Сплит, 2019); X Международной научной конференции «Современные методы в теоретической и экспериментальной химии» (Плес, 2019); 15 Международной научной конференции «Современные методы аналитической химии», (Прага, 2019).

Публикации: По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах, 2 из которых в журнале, рекомендованном ВАК и входящем в базу данных Web of Science, и 1 статья в журнале 1 квартала, индексируемом базой данных Scopus, а также 10 тезисов докладов.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.х.н., доценту Коротковой Е.И. за постановку цели и помощь при написании диссертации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и ЧНФ в рамках научного проекта № 19-53-26001; Госзадания «Наука» № 4.5752.2017; Госзадания «Наука» № FSWW-2020-0022.

Структура и объём работы: Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста и включает 23 рисунка, 63 таблицы и список литературы состоящий из 158 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, обозначена цель работы, сформулированы задачи исследования, отражена научная и практическая значимость исследований.

В первой главе проведен анализ литературы по истории открытия, биологической роли, физико-химическим свойствам оксида азота и нитрит-ионов, как его метаболитов, а также нитрозотиолов. Описаны различные методы прямого и косвенного определения оксида азота, нитрит-ионов и нитрозотиолов. Большое внимание уделено электрохимическому подходу. В частности, подробно рассматриваются различные электродные материалы и способы их модификации, применяемые для количественного определения соединений азота. Цели и задачи работы сформулированы на основании проведенного обзора.

Во второй главе приводится описание используемого в работе оборудования, электродов, посуды, реактивов, методик проведения эксперимента, подготовки биологических жидкостей, приготовления растворов и модификатора.

Третья глава посвящена исследованию поверхности модифицированного электрода и изучению влияния физико-химических закономерностей на электроокисление нитрит-ионов, как метаболитов оксида азота на ГМЭ.

Для вольтамперометрического определения нитрит-ионов и нитрозотиолов в качестве рабочего электрода предлагается использовать импрегнированный графитовый электрод, модифицированный углеродными чернилами. Изучение морфологии поверхности электродов проводили при помощи сканирующей

электронной микроскопии. Эффективность модификации оценивали с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})]^{4-}$. Модификация графитового электрода углеродными чернилами (ГМЭ) приводила к возрастанию сигналов окисления/восстановления, что свидетельствует об увеличении чувствительности электрода.

Для подбора оптимальных условий получения аналитического сигнала от этилнитрита, взятого в качестве стандарта для определения нитрит-ионов на ГМЭ исследовано влияние ряда факторов, таких как рН фонового электролита, параметры накопления, скорость развертки потенциала на анодный сигнал нитрит-ионов.

Влияние рН

Для установления оптимального значения водородного показателя при окислении нитрит-ионов на ГМЭ использовали универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона (БР) со следующими значениями рН: 2,11; 3,19; 4,02; 4,93; 5,82; 6,86; 8,0; 9,18 (Рис. 1).

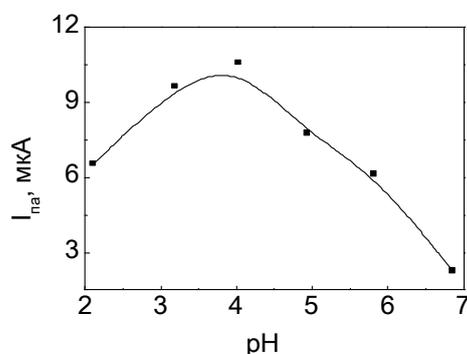


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности тока электроокисления NO_2^- на ГМЭ от рН среды. $C(\text{NO}_2^-) = 0,3$ ммоль/дм³. $v = 80$ мВ/с

В ходе эксперимента было выявлено, что анодный сигнал NO_2^- сильно зависит от рН фонового электролита. С увеличением рН фонового электролита от 2,0 до 4,02 происходит увеличение тока пика окисления нитрит-ионов, который достигает максимального значения при рН 4,02. При смещении рН в нейтральную и щелочную область интенсивность тока уменьшается, поскольку количество протонов не является достаточным для окисления нитрита. В сильнощелочной среде при рН $> 8,0$ сигнала окисления нитрит-ионов на электродах не наблюдалось. Так как максимальный ток электроокисления нитрит-ионов был получен в среде с рН 4,02 то в дальнейших исследованиях использовали фоновый электролит – универсальный буферный раствор БР с рН 4,02. Достаточно надежные результаты были получены и при рН $4,0 \pm 0,1$.

Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления)

При подборе потенциала накопления исследовали область значений в диапазоне от -1 В до $+1$ В. Экспериментальным путем было установлено значение потенциала накопления равное $0,4$ В. При смещении потенциала накопления в более положительную область величина регистрируемого тока практически не изменялась.

Для определения времени накопления исследовали область значений от 1 до 60 с. Оптимальное значение составило 4 с.

Механизм электроокисления нитрит-ионов на ГМЭ

Для установления механизма электроокисления NO_2^- на ГМЭ были построены зависимости тока (I) от $v^{1/2}$ и потенциала пика от $\ln(v^{1/2})$ в диапазоне скоростей развертки потенциала от 10 до 200 мВ/с (Рис. 2). Линейная зависимость тока пика от $v^{1/2}$ характерна для обратимых и необратимых процессов (Рис. 2 а).

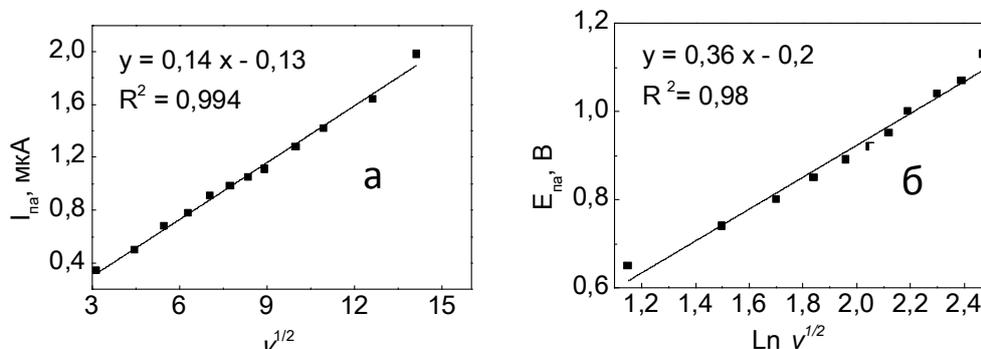


Рисунок 2 – Зависимости интенсивности тока электроокисления NO_2^- от скорости развертки потенциала $v^{1/2}$ (а) и потенциала электроокисления от $\ln(v^{1/2})$ (б). $C = 5,0$ мкмоль/дм³

Линейная зависимость потенциала пика электроокисления нитрит-ионов от $\ln(v^{1/2})$ со смещением потенциала в положительную область указывает на необратимость процесса (Рис. 2 б).

Таким образом, смещение потенциала пика в положительную область при увеличении скорости развертки потенциала и линейность зависимости потенциала пика от натурального логарифма квадратного корня скорости развертки потенциала указывают на необратимый характер процесса. Согласно вышеизложенным фактам, предполагаемый механизм окисления нитрит-ионов на поверхности ГМЭ в водных средах следующий:



Исследование влияния адсорбционной составляющей на процесс электроокисления нитрит-ионов на ГМЭ

Влияние скорости развертки потенциала на сигнал электроокисления нитрит-ионов изучали в диапазоне от 10 до 200 мВ/с в буфере БР с рН 4,02 при потенциале накопления 0,4 В и времени накопления 4 с (Рис. 3 а). Нелинейность данной зависимости указывает на то, что адсорбция не является лимитирующей стадией электродного процесса. Логарифмическая зависимость интенсивности тока от скорости развертки потенциала (Рис. 3 б) носила линейный характер. Однако, критерий Семерано (тангенс угла наклона зависимости $\lg I$ от $\lg v$) составил 0,56, что указывает на наличие адсорбционного процесса при окислении нитрит-ионов на поверхности электрода.

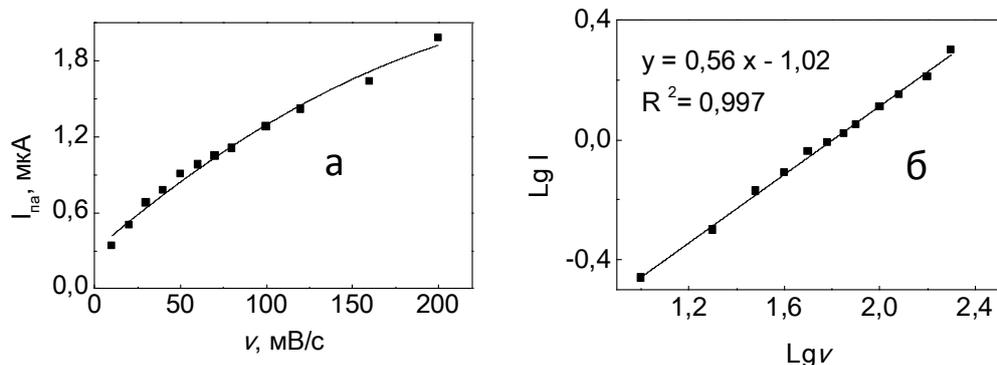


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности тока окисления NO_2^- от скорости развертки потенциала в буферном растворе БР (рН 4,02) на ГМЭ при $E_{\text{нак}} = 0,4$ В.
 $C(\text{NO}_2^-) = 5,0$ мкмоль/дм³

Из приведенных результатов исследования можно сделать вывод, что на поверхности ГМЭ наблюдается адсорбция этилнитрита, однако, она не лимитирует электродный процесс и не оказывает существенного влияния на диапазон линейности градуировочной характеристики при определении нитрит-ионов в растворе. Для дальнейших сравнительных исследований была выбрана скорость развертки 100 мВ/с.

Таким образом, в результате проведенных исследований были подобраны рабочие условия вольтамперометрического определения NO_2^- . Дальнейшее определение нитрит-ионов проводили на импрегнированном ГМЭ в универсальном буферном растворе БР с рН 4,02 при $E_{\text{нак}} = 0,4$ В, $t_{\text{нак}} = 4$ с. Вольтамперограммы снимали в режиме первой производной постоянно-токовой анодной вольтамперометрии при скорости развертки потенциала 100 мВ/с.

В четвертой главе обсуждаются результаты по исследованию закономерностей окисления-восстановления нитрозотиолов на ГМЭ. Показано влияние различных факторов (рН фонового электролита, потенциала и времени накопления, скорости развертки потенциала) на аналитический сигнал нитрозотиолов и предложен механизм электродных реакций. В качестве стандартного вещества для исследований электрохимических свойств S-нитрозотиолов был взят S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP).

Предварительное исследование электрохимических свойств SNAP проводили с использованием ЦВА на ГМЭ в деоксигенированном фосфатном буферном (ФБ) растворе (рН 7,4) с 0,1 моль/дм³ ЭДТА при концентрации SNAP 0,01 ммоль/дм³.

Как следует из полученных циклических вольтамперограмм (Рис. 4), SNAP может быть электрохимически восстановлен на поверхности ГМЭ, давая необратимую катодную волну при потенциале $-0,58$ В (отн. Ag/AgCl). Анодного пика при этом не наблюдалось.

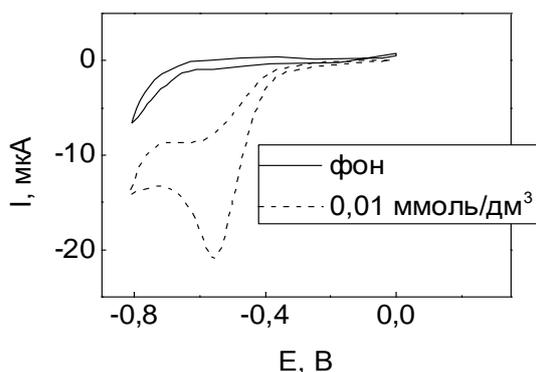


Рисунок 4 – ЦВА SNAP на ГМЭ в ФБ растворе с pH 7,4; $\nu = 80$ мВ/с

Для подбора условий определения SNAP на графитовом модифицированном электроде использовали катодную вольтамперометрию в режиме инверсии, позволяющую фиксировать высоту катодного тока в области положительных значений.

Влияние pH фонового электролита на электровосстановление SNAP

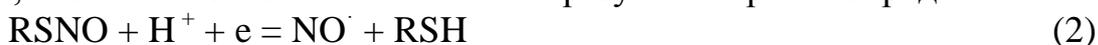
В данной работе было изучено электровосстановление SNAP в кислой, нейтральной и щелочной средах. В таблице 1 приведены значения потенциала пика электровосстановления SNAP на ГМЭ в буферном растворе БР при различных значениях pH.

Все растворы буферного электролита содержали $0,1$ моль/дм³ ЭДТА, который необходим для подавления примесей ионов металлов и предотвращения каталитического разложения SNAP, особенно от ионов меди.

Таблица 1 – Потенциалы пиков восстановления при различном pH и концентрации SNAP 1 ммоль/дм³ при 80 мВ/с

pH	$E_{пк}, В$
2,1	-0,490
4,0	-0,525
5,5	-0,552
6,5	-0,550
7,4	-0,571
8,5	-0,575
10,0	-0,575

При увеличении pH до 7,4 потенциалы пиков смещаются в более отрицательную область, а в более щелочных растворах потенциал пика изменяется незначительно и от pH среды не зависит. В буферном растворе с pH 7,4 был зафиксирован пик восстановления при потенциале $-0,57$ В. При pH 4,0 наблюдается сдвиг потенциала пика электровосстановления SNAP на $0,05$ В в более положительную область. Однако в кислой среде при восстановлении нитрозотиола скорее всего участвует протон, который способствует образованию свободного NO, что может оказывать влияние на результат при их определении:



В более щелочных средах электрохимическое восстановление похоже на наблюдаемое при pH 7,4, однако интенсивность пика окисления значительно ниже. Это связано с плохой стабильностью SNAP при высоком pH, поэтому в нейтральной среде наблюдается сигнал восстановления с максимальной

интенсивностью. В связи с вышесказанным, разработку методики определения SNAP проводили при pH 7,4, а в качестве фонового электролита использовали ФБ раствор.

Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления) на электровосстановление SNAP

Для установления влияния потенциала накопления на сигнал восстановления SNAP исследовали область значений потенциала в диапазоне от 0 до $-0,8$ В в ФБ при pH 7,4 и времени накопления 30 с. Установлено, что значение тока достигает максимума при потенциале $-0,6$ В, а при более положительных потенциалах интенсивность сигнала значительно уменьшается. Далее рассматривали влияние времени накопления на сигнал электровосстановления при потенциале накопления $-0,6$ В. После накопления более 20 с интенсивность сигнала изменяется незначительно, однако после накопления более минуты происходит уменьшение интенсивности, что предположительно связано с низкой стабильностью нитрозотиола. Таким образом, установлены параметры накопления: потенциал $-0,6$ В, время 30 с.

Механизм электровосстановления SNAP на ГМЭ

Для установления механизма восстановления SNAP на ГМЭ исследовали влияние скорости развертки потенциала на интенсивность и потенциал катодного пика. Увеличение скорости развертки потенциала приводило к увеличению интенсивности пика электровосстановления SNAP и сдвигу потенциала пика в более отрицательную область значений.

Для описания механизма восстановления были построены зависимости тока (I) от $v^{1/2}$ и потенциала пика от $\ln(v^{1/2})$ в диапазоне скоростей развертки от 10 до 160 мВ/с (Рис. 5). Линейная зависимость тока пика от $v^{1/2}$ характерна для обратимых и необратимых процессов, а линейность зависимости потенциала пика от натурального логарифма квадратного корня скорости развертки указывает на необратимость процесса.

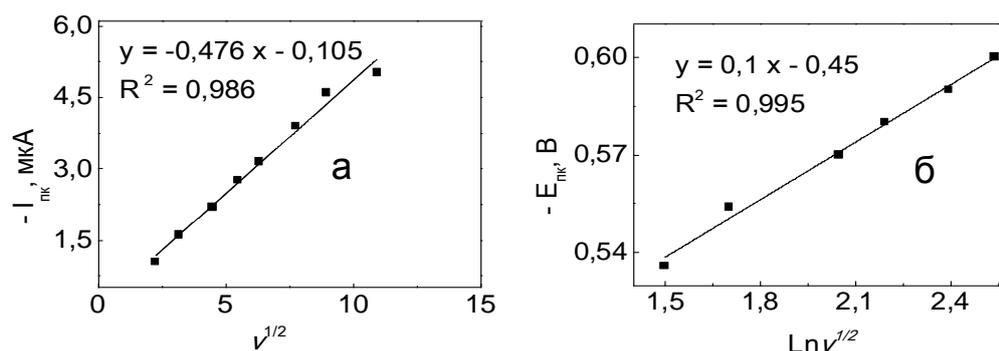


Рисунок 5 – Зависимости интенсивности тока электровосстановления SNAP от скорости развертки потенциала $v^{1/2}$ (а) и потенциала электровосстановления от $\ln(v^{1/2})$ (б). $C(SNAP) = 0,5$ мкмоль/дм³

Таким образом, учитывая проведенные исследования, сделан вывод о необратимости процесса на основании отсутствия анодного пика, смещения потенциала пика в отрицательную область и линейной зависимости потенциала пика от натурального логарифма скорости развертки. Расчет коэффициента

переноса для необратимого процесса производили из Тафельской зависимости (зависимость $\ln|I_{\text{red}}|$ от потенциала пика) по формуле:

$$\text{Наклон} = \frac{\alpha F}{RT} \quad (3)$$

Где, α – коэффициент переноса.

В результате расчетов получено значение коэффициента переноса равное 0,36. Полученное значение указывает на то, что в лимитирующей стадии процесса участвует первый электрон.

Для необратимого процесса число электронов рассчитали по формуле:

$$|E_{\text{п}} - E_{\text{п}/2}| = \frac{47,7}{\alpha n}; [\text{мВ}] \quad (4)$$

Где,

$$E_{\text{п}} = -0,57 \text{ В}$$

$$E_{\text{п}/2} = -0,635 \text{ В}$$

Получили значение равное 2,04, т.е. близкое к 2.

На основании проведенных исследований предположили следующий механизм электровосстановления нитрозотиолов в ФБ растворе при pH 7,4 на графитовом модифицированном электроде на примере SNAP:



Влияние адсорбционной составляющей на электровосстановление SNAP

При разработке методики также была проведена оценка влияния адсорбционной составляющей на процесс электровосстановления SNAP на модифицированном графитовом электроде (Рис. 6).

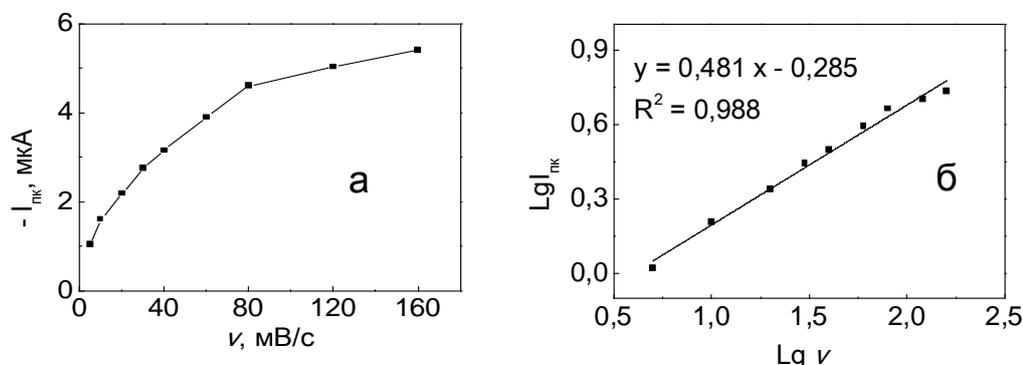


Рисунок 6 – Зависимость интенсивности тока электровосстановления SNAP от скорости развертки (а) и логарифмическая зависимость интенсивности тока от скорости развертки (б). С (SNAP) = 0,5 мкмоль/дм³

Из полученной и представленной на рисунке 6 а нелинейной зависимости тока от скорости развертки потенциала и найденному критерию Семерано (Рис. 6 б) равному 0,48 можно сделать вывод, что адсорбция не является лимитирующей стадией процесса. Таким образом, процесс восстановления нитрозотиолов на ГМЭ происходит при участии двух электронов при потенциале $-0,57 \text{ В}$ в ФБ растворе с pH 7,4. Лимитирующей стадией процесса является электрохимическая реакция с переносом первого электрона.

Пятая глава посвящена разработке вольтамперометрических методик определения нитрит-ионов и нитрозотиолов на ГМЭ и применение их к биологическим объектам.

Вольтамперометрическое определение нитрит-ионов на ГМЭ

Вольтамперограммы электроокисления нитрит-ионов снимали в растворе БР при рН 4,02 на ГМЭ. Развертку потенциалов проводили в диапазоне от 0,4 В до 1,2 В со скоростью 100 мВ/с при использовании анодной линейной вольтамперометрии в режиме производной первого порядка. Предварительно осуществляли стадию накопления при $E_{\text{нак}} = 0,4$ В и $t_{\text{нак}} = 4$ с.

Градуировочные зависимости NO_2^- были построены в диапазоне концентраций от 2 до 9 мкмоль/дм³ (Рис. 7) с соответствующим уравнением регрессии $y = 0,768x - 0,048$. Рассчитанный предел обнаружения ($S/N = 3$) составил 0,38 мкмоль/дм³.

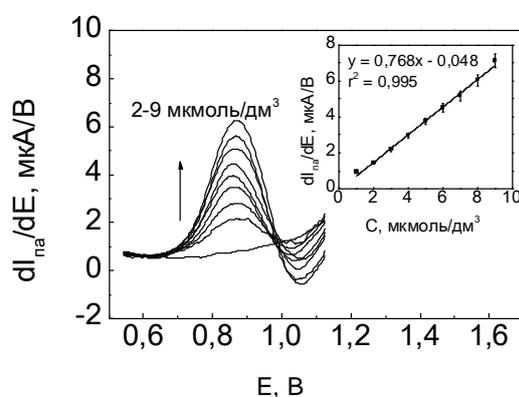


Рисунок 7 – Анодные вольтамперограммы NO_2^- в диапазоне концентраций 2–9 мкмоль/дм³ в буфере БР рН 4,02. $v = 100$ мВ/с

При увеличении концентрации нитрит-ионов в растворе происходит пропорциональное увеличение тока электроокисления. Очевидно, что разработанная методика определения нитрит-ионов на импрегнированном ГМЭ обладает хорошей чувствительностью и низким пределом обнаружения.

Оценка мешающего влияния компонентов биологической матрицы на вольтамперометрическое определение нитрит-ионов и пробоподготовка объектов

В связи с тем, что объектами исследования являлись надклеточные жидкости макрофагов, при создании методики оценивалось мешающее влияние всех компонентов биологической матрицы на аналитический сигнал нитрит-ионов, а именно, полной культуральной среды, телячьей сыворотки (10%), ИЛ-4, ЛПС, пенициллина, стрептомицина и L-глутамина.

Аликвоту исследуемого компонента (50 мкл) добавляли в электрохимическую ячейку, содержащую 10 см³ 3 мкмоль/дм³ раствора с нитрит-ионами в буферном растворе БР с рН 4,02. Анодный ток от NO_2^- регистрировали до и после добавления сопутствующего компонента. Результаты мешающего влияния компонентов матрицы на вольтамперометрический сигнал при определении нитрит-ионов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Исследование влияния компонентов матрицы на сигнал окисления NO_2^- , $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{\text{табл}} = 2,57$

Ток окисления NO_2^- перед добавлением компонента биологической матрицы (мкА/мВ)	Компонент	Соотношение концентрации NO_2^- к компонентам биологических жидкостей	Ток окисления NO_2^- после добавления компонента биологической матрицы (мкА/мВ)	$t_{\text{эксп}}$
0,762 ± 0,010	Культуральная среда	1:100	0,757 ± 0,008	1,25
	Телячья сыворотка (10%)	1:50	0,797 ± 0,038	1,84
	ЛПС	1:1000	0,755 ± 0,015	0,83
	ИЛ-4	1:1000	0,743 ± 0,027	1,97
	Пенициллин	1:100	0,761 ± 0,012	2,04
	Стрептомицин	1:100	0,749 ± 0,021	2,16
	L-глутамин	1:100	0,752 ± 0,023	2,1

Из полученных данных можно сделать вывод, что 50-кратный избыток 10 % телячьей сыворотки и 100-кратный избыток остальных компонентов биологической жидкости не оказывает существенного влияния на электрохимический сигнал нитрит-ионов.

На основании проведенных исследований для вольтамперометрического определения нитрит-ионов в биологических жидкостях пробоподготовку анализируемых образцов проводили по следующей методике: к 1 см³ слегка окрашенной исследуемой надклеточной жидкости макрофагов добавляли 1 см³ 20 % трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут для осаждения белковой фракции. Центрифугат смешивали с 5 см³ дистиллированной воды и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут. Затем, отбирали аликвоту совершенно прозрачного центрифугата (1-1,5 см³) для количественного определения нитрит-ионов в биологических жидкостях.

Оценка функционального статуса макрофагов, определение нитрит-ионов в надклеточных жидкостях макрофагов

Общая схема оценки функционального статуса макрофагов представлена на рисунке 8.

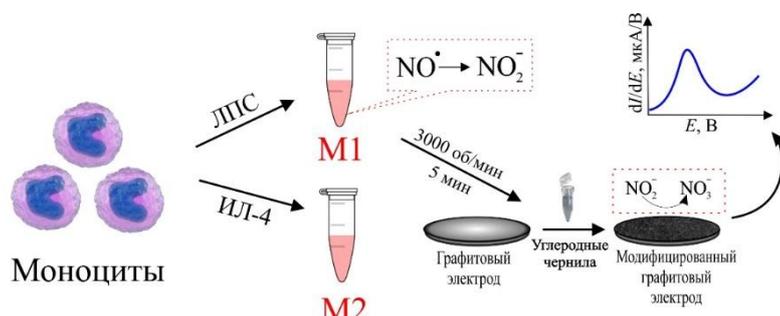


Рисунок 8 – Общая схема оценки функционального статуса макрофагов через определение концентрации нитрит-ионов в супернатантах клеточных культур

Количественное определение нитрит-ионов проводилось методом стандартной добавки (Рис. 9). Время анализа одного образца составляло менее 20 минут, включая подготовку образца. Пик окисления NO_2^- был зарегистрирован при потенциале +0,89 В. В качестве метода сравнения использовали спектрофотометрию.

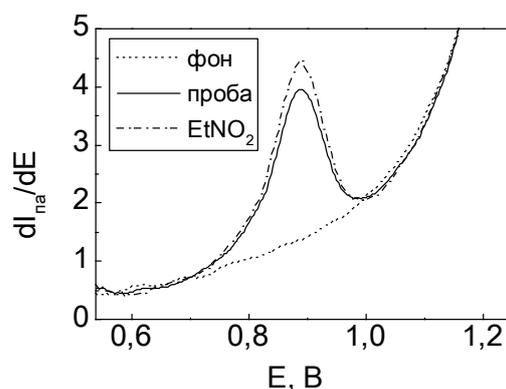


Рисунок 9 – Анодные вольтамперограммы исследуемого образца супернатанта клеточных культур, соответствующие окислению NO_2^- на ГМЭ в растворе БР с pH 4,02, до и после добавки $0,05 \text{ мкмоль/дм}^3 \text{ NO}_2^-$; $\nu = 100 \text{ мВ/с}$

Данные по оценке количественного содержания нитрит-ионов в супернатантах клеточных культур вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты определения нитрит-ионов в супернатантах клеточных культур (макрофагах), выделенных из моноцитов периферической крови больных раком легкого до начала лечения вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами, $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{\text{табл}} = 2,57$

Номер пациента	Тип поляризации	Концентрация нитритов, мкмоль/дм^3		$t_{\text{эксп}}$
		Вольтамперометрия	Спектрофотометрия	
1	фон	$71,1 \pm 4,8$	$69,0 \pm 3,5$	0,69
	M1	$205,4 \pm 18,2$	199 ± 21	2,08
	M2	$85,3 \pm 2,5$	$92,1 \pm 7,7$	1,87
2	фон	$116,6 \pm 7,3$	$120,4 \pm 8,6$	1,89
	M1	192 ± 13	190 ± 11	2,10
	M2	$123,1 \pm 8,8$	$125,8 \pm 6,7$	1,56
3	фон	$49,4 \pm 4,1$	$43,3 \pm 5,4$	2,40
	M1	$111,8 \pm 7,4$	$108,7 \pm 7,6$	2,47
	M2	$62,1 \pm 5,1$	$59,6 \pm 5,2$	1,81
4	фон	115 ± 10	$112,5 \pm 8,6$	1,63
	M1	223 ± 19	$231,1 \pm 15,4$	1,29
	M2	$97,5 \pm 4,5$	$93,7 \pm 4,0$	1,91
5	фон	$98,4 \pm 5,9$	$94,7 \pm 7,6$	2,04
	M1	$124,9 \pm 7,4$	$128,9 \pm 6,5$	2,30
	M2	$97,3 \pm 2,1$	$96,8 \pm 2,9$	1,99
6	фон	$65,5 \pm 5,1$	$61,1 \pm 4,8$	1,05
	M1	119 ± 16	105 ± 12	2,13
	M2	$37,3 \pm 5,3$	$31,4 \pm 4,6$	1,41
7	фон	$81,4 \pm 6,7$	$76,2 \pm 6,5$	1,65
	M1	$177,6 \pm 8,9$	182 ± 11	1,23
	M2	$71,0 \pm 7,8$	$65,0 \pm 7,6$	0,92

По количественному содержанию нитрит-ионов в пробах косвенно судили о количестве продуцируемого оксида азота в клетках. Уровень оксида азота в надклеточных жидкостях макрофагов без добавления индукторов поляризации и с добавлением ИЛ-4 – индуктора M2-поляризации не имел статистически значимых различий (таблица 5). Однако добавление M1-индуктора ЛПС в культуру индуцируемых макрофагов сопровождалось увеличением количества оксида азота в кондиционных средах макрофагов (таблица 5). Полученные данные говорят о том, что оценка уровня оксида азота в надклеточных жидкостях макрофагов

может служить маркером М1 макрофагов. Данный подход может быть использован для дифференциации не стимулированных М1-поляризованных макрофагов от макрофагов, поляризованных по М2-типу.

Вольтамперометрическое определение нитрозотиолов на ГМЭ

Съемку вольтамперограмм проводили на ТА-2 при использовании катодной вольтамперометрии в режиме производной первой порядка в ФБ растворе с рН 7,4, содержащем 0,1 ммоль/дм³ ЭДТА в диапазоне потенциалов от 0 В до -1 В. Предварительно осуществляли стадию накопления при скорости $v = 80$ мВ/с, $E_{нак} = -0,6$ В и $t_{нак} = 30$ с. В качестве рабочего электрода использовали ГМЭ, вспомогательного и электрода сравнения – хлорид-серебряные электроды.

Затем в электрохимическую ячейку, состоящую из ГМЭ и двух ХСЭ вносили аликвоты исследуемого водного раствора SNAP. Все измерения проводились в закрытых кварцевых стаканчиках, чтобы избежать разложения исследуемого вещества под действием света. Исследуемый раствор перемешивали, а затем снимали вольтамперограммы восстановления нитрозотиолов по описанной выше методике. Пик восстановления SNAP при подобранных условиях в режиме первой производной был получен при потенциале -0,57 В. Для предотвращения окисления исследуемого вещества и конечных продуктов растворенным или свободным кислородом перед электрохимическими экспериментами раствор продували азотом.

Градуировочная зависимость была построена в диапазоне концентраций от 0,2 до 2,5 мкмоль/дм³ (Рис. 10) с соответствующим уравнением регрессии $y = 7,457x - 0,138$ ($R^2 = 0,995$). Исследуемый диапазон соответствует концентрациям нитрозотиолов в биологических объектах. Рассчитанный предел обнаружения ($S/N = 3$) составлял 0,067 мкмоль/дм³.

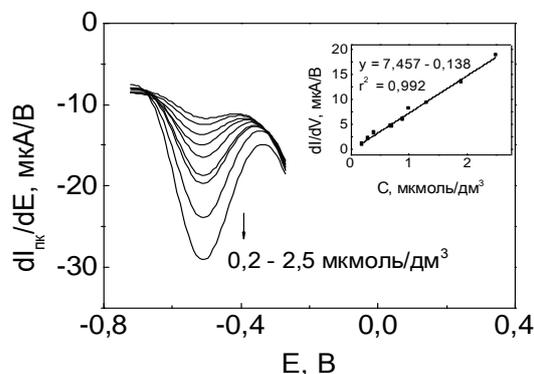


Рисунок 10 – Катодные вольтамперограммы и градуировочная зависимость SNAP в диапазоне концентраций 0,2–2,5 мкмоль/дм³ в ФБ с рН 7,4 и 0,1 моль/дм³ ЭДТА

Разработанный метод определения SNAP на импрегнированном графитовом электроде обладает достаточно высокой чувствительностью, низким пределом обнаружения и может быть рекомендован для определения суммарного содержания нитрозотиолов в биологических объектах.

Определение нитрозотиолов в биологических жидкостях

Определение нитрозотиолов проводили в разбавленных образцах свежей крови человека, которую отбирали и проводили пробоподготовку: образцы крови центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Затем к анализируемым

образцам добавляли 20 % раствор трихлоруксусной кислоты в объемном соотношении 1:1. Через 10 мин полученный раствор снова центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин. Прозрачный центрифугат использовали для вольтамперометрического определения нитрозотиолов. Электрохимические измерения проб проводились в течение 2 часов после забора. Температура проб соответствовала комнатной температуре.

Непосредственно для вольтамперометрического определения, образцы биологических жидкостей после пробоподготовки приливали к раствору ФБ (рН 7,4) в объемных отношениях 1 к 4. Разведения проводили при барботировании азотом в темноте. Далее аликвоту полученного раствора анализировали методом катодной вольтамперометрии в режиме производной первой порядка в ФБ растворе с рН 7,4, содержащем 0,1 ммоль/дм³ ЭДТА, при скорости сканирования потенциала 80 мВ/с, потенциале накопления –0,6 В и времени накопления 30 с.

Определение нитрозотиолов, как субстратов оксида азота, в крови осуществлялось методом стандартной добавки. Время анализа одного образца, как и в случае с нитритами, составляло менее 20 минут. Сигнал восстановления нитрозотиолов в биологическом объекте фиксировали при потенциале –0,57 В. Добавление аликвоты стандартного раствора SNAP в ячейку приводило к увеличению интенсивности пика восстановления при том же потенциале. В качестве метода сравнения использовали флуориметрию. Результаты, полученные при анализе объектов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Определение нитрозотиолов в биологических объектах методом вольтамперометрии и флуориметрии n = 6, p = 0,95, t_{табл} = 2,57

Номер пробы	Концентрация нитрозотиолов, мкмоль/дм ³		t _{экс}
	Вольтамперометрия	флуориметрия	
1	6,21 ± 0,49	5,61 ± 0,70	2,16
2	5,14 ± 0,62	5,74 ± 0,93	1,88
3	8,19 ± 0,89	7,89 ± 0,66	1,07
4	16,7 ± 1,8	15,9 ± 1,7	2,1

Стоит отметить, что обнаруженные концентрации нитрозотиолов в крови согласуются с зарегистрированными концентрациями RSNO в плазме крови человека. Как уже было продемонстрировано выше, данный метод можно применить для оценки содержания RSNO в биологических жидкостях, в частности в крови.

Этот метод измерения может использоваться, например, для прогнозирования эффективности применения препаратов, основанных на реакции S-нитрозилирования. Данные препараты применяются в клинических испытаниях, связанных с модулированием эффектов NO при различных заболеваниях.

Метрологические характеристики вольтамперометрических методик определения нитрит-ионов и нитрозотиолов на ГМЭ

При подготовке методики к метрологической аттестации необходимо оценить следующие метрологические характеристики: показатель повторяемости, показатель промежуточной прецизионности, показатель точности методики.

Обобщенные результаты показателей качества методик определения нитрит-ионов и нитрозотиолов представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Метрологические характеристики методики определения нитрит-ионов ($p = 0,95, n = 2, l = 15$)

Концентрация, мкмоль/дм ³	Показатель повторяемости, σ_r^* , %	Показатель промежуточной прецизионности, $\sigma_{Rл}^*$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0,95$), $\pm\Delta$, %
1,00	14,6	15,1	39,3
2,00	6,19	6,41	13,2
3,00	3,32	3,43	8,68
4,00	2,37	2,45	6,56
5,00	4,04	4,12	9,40
6,00	1,51	1,56	1,60
7,00	1,14	1,18	2,04
8,00	2,70	2,79	4,69
9,00	1,20	1,24	4,66

Таблица 6 – Метрологические характеристики методики определения нитрозотиолов ($p = 0,95, n = 2, l = 15$)

Концентрация, мкмоль/дм ³	Показатель повторяемости, σ_r^* , %	Показатель промежуточной прецизионности, $\sigma_{Rл}^*$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0,95$), $\pm\Delta$, %
0,2	10,9	11,3	31,4
0,4	15,1	15,6	37,4
0,7	10,6	11	29,5
0,9	7,44	7,7	24,3
1,9	5,79	5,99	18,4
2,5	5,95	6,16	20,1

Как видно из таблиц 5 и 6, при определении нитрит-ионов и нитрозотиолов показатель точности не превышает 40 %, показатель повторяемости – 15 %, промежуточной прецизионности – 16 %.

ВЫВОДЫ:

1. Исследован процесс модификации поверхности графитового электрода углеродными чернилами различных производителей. Показано, что после модификации происходит увеличение электроактивной поверхности электрода. Модификатор, дающий равномерную пленку с более разветвленной поверхностью получен из микрокристаллического графита производства Sigma-Aldrich.

2. Исследованы физико-химические закономерности электроокисления нитрит-ионов и подобраны условия вольтамперометрического определения на ГМЭ. Показано, что процесс носит необратимый характер в универсальном буферном растворе БР с рН 4,02 при $E_{нак} = 0,4$ В, $t_{нак} = 4$ с, $v = 100$ мВ/с.

3. Разработана методика определения нитрит-ионов на ГМЭ. Проведена оценка основных метрологических характеристик разработанной методики.

4. Изучено мешающее влияние компонентов биологической матрицы на аналитический сигнал нитрит-ионов. Показано, что 50-кратный избыток 10 % телячьей сыворотки и 100-кратный избыток остальных компонентов

биологической жидкости не оказывает существенного влияния на сигнал электроокисления нитрит-ионов.

5. Проведено сравнительное определение нитрит-ионов в надклеточных жидкостях M1 и M2 поляризованных макрофагов вольтамперометрическим спектрофотометрическим методами. Показано, что уровень нитрит-ионов в надклеточных жидкостях макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека, может служить маркером для определения преимущественного фенотипа макрофагов (M1 или M2) в организме человека.

6. Изучены физико-химические закономерности, а также вероятный механизм восстановления S-нитрозотиолов на ГМЭ на примере SNAP. Показано, что процесс носит необратимый характер при участии двух электронов в фосфатном буферном растворе с рН 7,4 при $E_{\text{нак}} = -0,6 \text{ В}$, $t_{\text{нак}} = 30 \text{ с}$, $v = 80 \text{ мВ/с}$. Лимитирующая стадия процесса характеризуется переносом первого электрона.

7. Разработана методика вольтамперометрического определения SNAP на ГМЭ и оценены основные метрологические характеристики методики.

8. Проведена оценка эндогенного нитрозотиола в крови. Найденные концентрации нитрозотиолов в крови согласуются с зарегистрированными концентрациями, указанными в литературных источниках.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. **Попова, В. А.** Вольтамперометрическое определение этилнитрита / В. А. Попова, А. А. Кривошеина, Е. И. Короткова // Изв. вузов. Химия и хим. технология. – 2019. – Т. 62. – В. 12. – С. 9–12.

2. **Попова, В. А.** Определение L-аргинина в биологически активной добавке методом вольтамперометрии / В. А. Попова, М. Н. Пономарева, Е. И. Короткова // Изв. вузов. Химия и хим. технология. – 2020. – Т. 63. – В. 7. – С. 4–9.

3. **Popova, V.** Evaluation of human macrophage functional state by voltammetric monitoring of nitrite ions / V. Popova, E. Korotkova, J. Barek, M. Stakheyeva, A. Fedorov, M. Patysheva, O. Cheremisina // Anal. Bioanal. Chem. – 2020. – Vol. 1.

4. **Попова, В. А.** Вольтамперометрическое определение этилнитрита на стеклоуглеродном электроде / В. А. Попова, М. Н. Пономарева // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П.Кулева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2017. – С. 223–224.

5. **Popova, V. A.** Voltammetric determination of ethylnitrite using a glassy carbon electrodes / V. A. Popova, E. I. Korotkova, M. N. Ponomareva // Theoretical and experimental chemistry: Abstracts of the VI International scientific conference. – Karaganda, 2017. – P. 42.

6. **Попова, В. А.** Вольтамперометрическое определение этилнитрита на модифицированных электродах / А. А. Куколева, В. А. Попова // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л. П. Кулева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2018. – С. 275.

7. **Popova, V.** Determination of ethyl nitrite by voltammetry / V. Popova, E. Korotkova, A. Gow // 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018): Book of Abstracts of 17th International Conference on Electroanalysis. – Rhodes: Publ. Rhodes Press, 2018. – P. 305.

8. **Popova, V.** Viability of human polymorphonuclear leukocytes loaded with synthetic microcapsules in vitro / V. Popova, T. A. Nevzorova, M. Yu. Nikitina, A. G. Daminova, Y. V. Tarakanchikova, D. N. Atochin, E. Korotkova, R. I. Litvinov, G. B. Sukhorukov, A. J. Gow, E. N. Atochina-Vasserman // 10th international conference on the biology, chemistry and therapeutic applications of nitric oxide. Book of abstracts 10th international conference on the biology, chemistry and therapeutic applications of nitric oxide. – Oxford, UK, 2018.

9. **Popova, V.** Development of a voltammetric method for detection of ethyl nitrite / V. Popova, A. Krivosheina, E. Korotkova // Proceedings of the 14th international students conference «Modern analytical chemistry»: Proceedings paper. – Prague: Faculty of Science, Charles University, 2018. – Vol. 14. – P. 276.

10. **Попова, В. А.** Электрохимическое определение NO в биологических объектах / В. А. Попова // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л. П. Кулева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2019. – С. 269.

11. **Popova, V.** Electrochemical determination of nitric oxide in human macrophage / Popova V., Korotkova E., Barek J. // 7th regional symposium on electrochemistry for South-East Europe: Book of abstracts. Croatia: international association of physical chemists, 2019. – P. 147.

12. **Popova, V.** Determination of L-Arginine in dietary supplement by voltammetry on glassy carbon electrode / V. Popova, M. Ponomareva, E. Korotkova // Proceedings of the 15th International Students Conference «Modern Analytical Chemistry»: Proceedings paper. – Prague: Faculty of Science, Charles University, 2019. – Vol. 15. – P. 138.

13. **Попова, В. А.** Определение NO-метаболитов в надклеточной жидкости макрофагов методом вольтамперометрии / В. А. Попова, Е. И. Короткова // X международная научная конференция «Современные методы в теоретической и экспериментальной электрохимии»: Тезисы докладов. – Иваново: Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, 2019. – С 42.