

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Попова Валентина Александровна

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

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук,
доцент

Короткова Елена Ивановна

Томск, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 Оксид азота. История открытия и биологическая роль.....	11
1.2 Физические и химические свойства оксида азота	13
1.3 Биологический синтез оксида азота в организме человека	14
1.4 Методы определения оксида азота и его метаболитов	15
1.4.1 Спектроскопические методики.....	16
1.4.2 Электрохимические сенсоры для определения оксида азота и продуктов его окисления	22
1.4.2.1 Прямое определение оксида азота на различных электродах	24
1.4.2.2 Косвенное определение оксида азота через нитрит-ионы	33
1.5 S-нитрозотиолы. Значение S-нитрозотиолов в биологических системах .	36
1.6 Методы определения нитрозотиолов в биологических системах	37
ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	40
2.1 Оборудование, электроды, химическая посуда	40
2.2 Реактивы	42
2.3 Растворы и модификатор	43
2.4 Подготовка модифицированного электрода	46
2.5 Объекты исследования.....	46
2.6 Методика приготовления надклеточных жидкостей макрофагов	47
2.7 Методика подготовки образцов крови для вольтамперометрического определения нитрозотиолов	48
2.8 Методика эксперимента.....	48

2.9 Методика проведения микроскопических исследований поверхности электродов 50

2.10 Статистическая обработка данных 51

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ НИТРИТ-ИОНОВ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ ЭЛЕКТРОДЕ 52

3.1 Характеристика модифицированного электрода и исследование его поверхности методом сканирующей микроскопии..... 52

3.2 Влияние различных факторов на сигнал электроокисления нитрит-ионов 54

3.2.1 Влияние рН фонового электролита на сигнал электроокисления нитрит-ионов 54

3.2.2 Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления) на сигнал электроокисления нитрит-ионов 55

3.3 Исследование механизма электроокисления нитрит-ионов на графитовом модифицированном электроде 56

3.4 Исследование влияния адсорбционной составляющей на процесс электроокисления нитрит-ионов на модифицированном электроде..... 57

ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВОССТАНОВЛЕНИЯ SNAP 59

4.1 Оценка электрохимических свойств SNAP 59

4.2 Влияние рН фонового электролита на электровосстановление SNAP..... 60

4.3 Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления) на электровосстановление SNAP 62

4.4 Исследование механизма восстановления SNAP на модифицированном электроде 63

4.5 Влияние адсорбционной составляющей на электровосстановление SNAP 65

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТ-ИОНОВ И НИТРОЗОТИОЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ	67
5.1 Вольтамперометрическое определение нитрит-ионов на ГМЭ.....	67
5.2 Оценка мешающего влияния компонентов биологической матрицы на вольтамперометрическое определение нитрит-ионов и пробоподготовка объектов	68
5.3 Определение нитрит-ионов методом спектрофотометрии	69
5.4 Оценка функционального статуса макрофагов, определение нитрит-ионов в надклеточных жидкостях макрофагов	71
5.5 Вольтамперометрическое определение нитрозотиолов на ГМЭ.....	73
5.6 Определение S-нитрозотиолов методом флуориметрии.....	75
5.7 Определение нитрозотиолов в биологических жидкостях	75
5.8 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики определения нитрит-ионов на ГМЭ	77
5.9 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики определения SNAP	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88
Приложение А (оценка повторяемости и воспроизводимости методики анализа)	105

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. Существует два типа макрофагов: M1 и M2-поляризованные формы [2,3]. Образование оксида азота в результате действия фермента индуцибельной NO-синтазы (iNOS), является одним из ключевых факторов, позволяющих различить M1 и M2- поляризованные макрофаги [3,4,8]. Оксид азота является эффекторной молекулой, обуславливающей цитотоксичность M1-поляризованных макрофагов [2,3,5], макрофаги M2 типа оксид азота не продуцируют [3,5].

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 [6–8]. 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 оксида азота или продуктов его окисления в виде нитрит-ионов, а также в виде его субстратов S-нитрозотиолов, 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 актуальным разработка новых, более простых и чувствительных методов для мониторинга метаболитов и субстратов оксида азота в биологических жидкостях.

На основании вышеизложенного, **целью 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.

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.

Положения, выносимые на защиту.

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

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

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

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.

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

Степень достоверности и апробация результатов.

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 квартиля, индексируемом базой данных Scopus, а также 10 тезисов докладов.

Структура диссертации.

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

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.

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.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Оксид азота. История открытия и биологическая роль

Оксид азота (II) был известен в течение многих лет как токсичный загрязнитель паров выхлопных газов автомобилей и сигаретного дыма. Однако в 1977 году Ф. Мурад обнаружил, что NO повышает активность гуанилциклазы и расслабляет гладкие мышцы [9]. В 1979 году Л. Игнарро зафиксировал расслабляющее воздействие NO на гладкую мускулатуру кровеносного сосуда [10]. Это наблюдение было сделано путем подачи газообразной смеси NO и азота (либо аргона) с помощью газонепроницаемого микролитрового шприца в ванну для органов, содержащую изолированные, предварительно суженные полоски коронарной артерии крупного рогатого скота [7,11].

Биологическая значимость NO, как сигнальной молекулы, была доказана в 1980-х годах. В 1980 году Р. Фурчготт обнаружил, что эндотелий высвобождает вещество, которое расслабляет кровеносные сосуды [10–11]. В 1987 году С. Монкадо и Л. Игнарро независимо друг от друга опубликовали доказательства о том, что NO – это тот самый эндотелиальный сосудорасширяющий фактор [14,15]. Эти ученые также сообщили, что NO продуцируется эндотелиальными клетками в кровеносных сосудах и диффундирует в соседние гладкие мышцы, вызывая расширение сосудов. В 1992 году NO стала молекулой года по версии журнала Science [16], а в 1998 году Р. Фурчготт, Л. Игнарро и Ф. Мурад получили Нобелевскую премию за открытие оксида азота как сигнальной молекулы в кардиоваскулярной системе.

Оксид азота играет ключевую роль в регуляции физиологических и патофизиологических механизмах, в том числе в центральной нервной системе (ЦНС) [17], сердечнососудистой [18], иммунной [19], мочевыделительной [20] системах, желудочно-кишечном тракте.

В ЦНС NO действует как нейромедиатор [17], и было показано, что он регулирует чувство боли [21], аппетит [22], цикл сна-бодрствования [23], терморегуляцию [24], синаптическую пластичность [25,26] и нервную секрецию

[27]. В зависимости от концентрации в тканях, NO может действовать в качестве нейропротекторного (предупреждать разрушение) или разрушающего агента для нейронов [28–30].

В сердечно-сосудистой системе NO играет важную роль в стимулировании агрегации тромбоцитов, пролиферации клеток гладких мышц и окислении холестерина [13,31–33]. Это связано с тем, что NO, продуцируемый в эндотелиальных клетках, диффундирует в межклеточное пространство, где захватывается эритроцитами и переносится в мышечные клетки, вызывая вазодилатацию последних [34]. Увеличение проницаемости сосудов, адгезия тромбоцитов, миграция клеток гладких мышц – эффекты, которые также вызывает NO [35].

Роль NO в иммунной системе человека заключается в его в противомикробном и противоопухолевом действии. Экспрессия NO иммунными и эпителиальными клетками снижает рост и убивает инфекционные агенты [19,36]. Например NO, образованный макрофагами, может приводить к старению и гибели опухолевых клеток [19,37], а цитотоксические лимфоциты (Т-лимфоциты) индуцируют образование NO непосредственно в опухолевых клетках с помощью интерферона- γ и фактора некроза опухоли, что также приводит к их старению и смерти [19,38].

Однако, как это ни парадоксально, опухолевые клетки нередко имеют конститутивную экспрессию NO, способствуя росту опухоли за счет увеличения неоваскуляризации и выработки ДНК-зависимых протеинкиназ, которые необходимы для восстановления поврежденных участков ДНК [19,39,40]. Кроме того, большие концентрации NO могут способствовать таким процессам, как нейродегенерация, воспаление и повреждение тканей. Измененная экспрессия NO может привести к путанице в отношении роли NO в ходе прогрессирования заболевания.

В мочевыделительной системе NO отвечает за регулирование кровяного давления и притока крови к почкам [41]. NO также вовлечен в натрийурез

(снижение концентрации натрия в крови) и диурез благодаря его способности ингибировать транспортировку натрия в почке [20].

В желудочно-кишечном тракте NO защищает эпителий желудка, стимулируя секрецию слизистой оболочки и бикарбоната [42–44]. NO также может придавать защиту слизистому слою путем ингибирования секреции желудочной кислоты и адгезии лейкоцитов к эпителию [19,42,45,46].

Интерес к его непосредственному измерению в реальном времени возник в результате исследований его роли в качестве физиологического посредника и цитотоксического агента в биологических системах.

1.2 Физические и химические свойства оксида азота

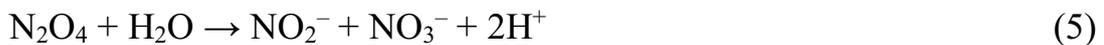
NO в нормальных условиях представляет собой бесцветный газ, состоящий на 46,68 % из N и на 53,32 % из O, молекулярная масса которого 30,01 г/моль. Его температура кипения 151,7 °C, температура замерзания – 163,6 °C. Газообразный NO является одной из самых простых известных парамагнитных молекул. Азот и атом кислорода связаны двойной связью. Согласно теории молекулярных орбиталей, NO имеет три полностью занятые связывающие орбитали и четвертую несвязывающую орбиталь с неспаренным электроном. Длина связи и энергия связи составляют 1,2 А и 149,9 ккал/моль [47]. NO проявляет низкий уровень растворимости в воде (~ 1,7 ммоль/дм³) [48].

Как и другие оксиды азота, NO термодинамически нестабилен. В результате синтез NO из его элементов N₂ и O₂ происходит только при высоких температурах. Несмотря на термодинамическую нестабильность, газ может храниться неопределенно долго при давлении 1 атм. и комнатной температуре без заметного разложения.

Электростатическое поле NO отталкивает ионы водорода, что объясняет гидрофобные свойства этой молекулы, которые позволяют ей свободно диффундировать через биологические мембраны. Наличие неспаренного электрона обуславливает высокую реакционную способность этой молекулы. При

взаимодействии с другими свободными радикалами NO через ковалентные связи образует разнообразные высокореактивные промежуточные соединения. Известно участие NO в образовании стабильных комплексов, например, с гемоглобином, сывороточным альбумином [47].

В водных растворах NO в присутствии кислорода окисляется до NO₂, а далее почти полностью трансформируется до нитрит-иона:



Реакции (3) и (4) протекают значительно быстрее, чем (5), поэтому нитрат-аниона образуется сравнительно немного [49].

Реакция NO с супероксидом приводит к образованию пероксинитрита:



Реакционная способность NO – одна из особенностей, которая делает его эффективной сигнальной молекулой, и также чрезвычайно затрудняет количественную оценку [50,51]. Период полураспада NO в большей степени зависит от микросреды, в которую он выделяется. Среды с низким содержанием доступных биореактивных молекул значительно увеличивают период полураспада NO [52]. В результате, нет согласованных данных о точном периоде полураспада NO в биологических системах [53,54]. Тем не менее, общепринятый период полураспада для NO в крови составляет 0,05–1 миллисекунды [55,56].

1.3 Биологический синтез оксида азота в организме человека

В организме человека NO, в основном, образуется из L-аргинина под действием фермента NO-синтазы (рисунок 1) [57].

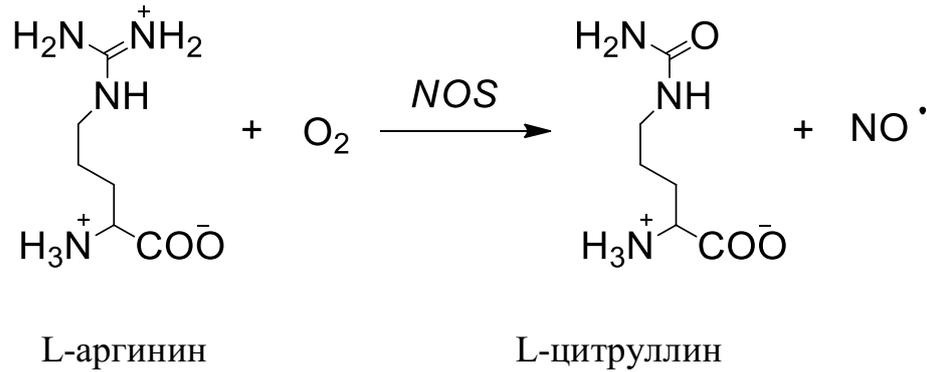


Рисунок 1 – Общая схема образования NO из L-аргинина под действием фермента NOS

У млекопитающих были идентифицированы три разные изоформы этого фермента: нейрональная nNOS (или NOS I), индуцибельная iNOS (или NOS II) и эндотелиальная eNOS (или NOS III) [58,59].

nNOS – фермент с низким выходом NO, который конститутивно экспрессируется в нейронах и некоторых других типах клеток.

iNOS – это фермент с высоким выходом NO, экспрессия которого может быть вызвана цитокинами и другими агентами, локализован в активированных макрофагах. Его активность в значительной степени зависит от количества Ca^{2+} .

eNOS также является ферментом с низким выходом NO, который конститутивно экспрессируется в эндотелиальных клетках и мало в других типах клеток.

L-аргинин является субстратом для всех изоформ NOS; молекулярный кислород и восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат являются косубстратами.

1.4 Методы определения оксида азота и его метаболитов

Наиболее распространенные подходы для определения NO можно разделить на спектроскопические и электрохимические методы анализа. Спектроскопические методы включают либо косвенное определение через побочные продукты (реакция Грисса, хемилюминесценция), либо прямое (флуоресценция, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса) [60,61]. Электрохимические методы

также подразделяются на прямые и косвенные. Прямые методики основаны на непосредственном электровосстановлении, электроокислении и каталитическом электроокислении NO [62]. Установление концентрации NO через определение его метаболитов относят к косвенным подходам.

1.4.1 Спектроскопические методики

Методы обнаружения NO, основанные на его оптических свойствах, имеют ряд преимуществ, включая простоту анализа, доступность оборудования и возможность мониторинга в биологических системах.

Определение NO на основе металлопротеинов

Спектроскопический метод количественного определения NO, впервые описанный в 1985 году [63], основан на его взаимодействии с оксигемоглобином с образованием метгемоглобина и нитрата (NO_3^-), что приводило к спектральному сдвигу:



В работе [64] Жанг и соавторы измеряли уровни NO через гемоглобин при проведении внутримозгового микродиализа в мозге крысы. Авторы помещали коаксиальные микродиализные зонды с целлюлозной мембраной в гиппокамп анестезированных крыс и перфузировали зонды буфером Кребса, содержащим 10 мкмоль/дм³ HbO₂. Спектральные сдвиги в собранном микродиализате указывали на высокие концентрации NO в мозге после введения каиновой кислоты, вещества, ответственного за повышенную выработку NO. Предел обнаружения для анализа составлял 7 нмоль/дм³. Данный метод после некоторых модификаций может применяться для мониторинга уровня NO в ряде тканей и органов.

Реакция Грисса

Одним из наиболее распространенных методов обнаружения NO в широком спектре образцов и матриц является анализ диазотирования, также известный как реакция Грисса. Впервые описанный Гриссом в 1864 году, этот метод фактически измеряет NO_2^- . Как уже было сказано, высокая реакционная способность NO

приводит к образованию NO_2^- в кислородсодержащих средах посредством следующих реакций:



Метод Грисса заключается в реакции нитрита с ароматическими аминами в кислых средах в две стадии, в результате чего образуется фиолетовый азокраситель. Данный подход широко распространен, поскольку его легко использовать в любой лаборатории без использования крупногабаритных и дорогих аналитических установок.

Обнаружение NO по реакции Грисса применяется и для анализа биологических образцов [60,65]. Реакция, разработанная Гриссом, основана на взаимодействии NO_2^- с сульфаниловой кислотой и α -нафтиламином в кислой среде с получением азокрасителя, концентрацию которого затем можно использовать в качестве косвенного индикатора концентрации NO_2^- (и NO) в образце [65].

Позднее анализ был модифицирован [66] заменой сульфаниламида и N- (1-нафтил) этилендиамина на сульфаниловую кислоту и α -нафтиламин, соответственно. Этот метод, который является широко используемой сегодня процедурой, привел к большей чувствительности и воспроизводимости, а также к более быстрому времени анализа.

Современный вариант реакции Грисса включает в себя сначала реакцию NO_2^- с сульфаниламидом в кислых средах с образованием промежуточного соединения соли диазония [60,65]. Затем к промежуточному соединению соли диазония приливают этилендиамин для образования стабильного водорастворимого азокрасителя (λ_{max} 540 нм). Количество NO_2^- определяется по калибровочному графику зависимости интенсивности оптической плотности раствора азокрасителя от известных концентраций NO_2^- . Предел обнаружения NO_2^- при использовании реакции Грисса составляет приблизительно 0,5 мкмоль/дм³ [60]. Поскольку анализ Грисса косвенно определяет количество NO, он не подходит для мониторинга NO

в реальном времени. Кроме того, для данной процедуры необходимо проводить тщательные контрольные эксперименты, чтобы точно зафиксировать уровень NO_2^- , образованного в результате окисления NO. Также этот метод имеет некоторые ограничения, главным образом из-за недостаточной чувствительности и высокого предела обнаружения.

Хемилюминесценция

Хемилюминесцентные датчики можно использовать для обнаружения NO как в жидких, так и в газообразных образцах [67–70]. Общая схема обнаружения NO в жидких образцах с помощью хемилюминесценции заключается в активации гуанилилциклазы под воздействием NO, что приводит к превращению гуанозинтрифосфата в гуанозин-3',5'-циклический монофосфат. В результате этой реакции происходит высвобождение пирофосфата, который затем может взаимодействовать с аденозинтрифосфатсульфурилазой с образованием аденозинтрифосфата (АТФ). АТФ, в свою очередь, взаимодействует с системой люциферин-люцифераза, излучая свет при 560 нм.

Преимущество хемилюминесцентного подхода заключается в том, что он позволяет обнаруживать NO при концентрациях нмоль/дм³ [69,70]. Хемилюминесцентные зонды имеют некоторые недостатки, в том числе невозможность обнаружить NO *in vivo*.

Флуориметрия

Флуориметрические методы на основе флуоресцентных датчиков нашли широкое применение благодаря возможности детекции NO в физиологических средах, таких как клетки и кровь [55,71].

По механизму обнаружения NO можно выделить методики, основанные на фотоиндуцированном переносе электронов, флуоресцентном резонансном переносе энергии и флуоресцентном отклике на реакцию с открытым или закрытым кольцом. Флуоресцентные методики также можно классифицировать по различным типам датчиков, например, на основе органических материалов,

комплексов благородных металлов, сенсоров на основе квантовых точек и углеродных нанотрубок.

Датчики для NO на органической основе часто состоят из двух элементов: NO-реактивного фрагмента и флуорофора. NO-реактивный фрагмент служит модулятором в механизме фотоиндуцированного переноса электронов, который гасит флуоресценцию флуорофоров до тех пор, пока он не вступит в реакцию с NO или NO-окисленными продуктами [72].

Одними из наиболее популярных сенсоров такого типа являются датчики на основе *o*-диамина [73–78]. Впервые серию молекул, содержащих *o*-диаминовые функциональные группы, разработала группа Нагано [79]. *O*-диаминовая группа вступает в реакцию с окисленной формой NO с образованием флуоресцентного производного триазола с низким содержанием электронов. Обнаружение NO происходит за счет фотоиндуцированного переноса электронов. Линейная зависимость между сигналом флуоресценции и концентрацией NO наблюдалась до 1000 нмоль/дм³ с пределом обнаружения 5 нмоль/дм³. К сожалению, многие *o*-диамино-сенсоры имеют чувствительность к окислителям и антиоксидантам [80–82]. Это может вносить значительный вклад в общую интенсивность флуоресценции в эндотелиальных клетках с низкими концентрациями NO (от 100 пмоль/дм³ до 5 нмоль/дм³), что отразится на качестве определения [72]. Кроме того, некоторые факторы, такие, как температура и pH, могут увеличить время анализа [81,83].

Чтобы преодолеть вышеупомянутые ограничения был разработан ряд других флуоресцентных датчиков на основе органических соединений, содержащих другие функциональными группы. Например, исследовательская группа Шиар в 2010 году разработала новый датчик NO, названный NO550, который обладает высокой специфичностью, не реагирует на присутствие белков и не чувствителен к различным значениям pH среды, что является преимуществом, поскольку значение pH в зависимости от области клетки может быть различно [84–86]. NO550 продемонстрировал увеличение сигнала флуоресценции в 1500 раз и

индифферентность к другим активным соединениям кислорода и азота. Однако применение такого сенсора возможно только в неводных средах, что ограничивает его использование в биологических исследованиях [86]. Кроме того, большинство датчиков на основе органических люминесцентных индикаторов необратимо взаимодействуют с NO, либо вступают в реакцию с продуктами его окисления. Для исследования кинетики образования NO в живых клетках необходима обратимость. Во втором случае взаимодействие индикаторов не с самим NO приводит к получению неточной информации об его образовании в режиме реального времени.

Альтернативным подходом детекции оксида азота является использование датчиков на основе комплексов переходных металлов. В этом случае флуорофор связан с переходным металлом, давая при этом слабый сигнал, но взаимодействие с NO вызывает вытеснение флуорофора и увеличение сигнала флуоресценции [87,88]. Недостатком таких сенсоров является ограниченность применения их для биологических объектов в виду плохой растворимости комплексов переходных металлов в воде. В связи с этим, группа Нагано разработала люминесцентный комплекс лантаноидов, который показал 50-кратное увеличение люминесценции в присутствии 50 мкмоль/дм³ водного NO [71]. Преимущество сенсора Нагано над ранее разработанными заключается в том, что он функционирует в водных системах, имеет длину волны возбуждения, которая может быть получена с помощью двухфотонной технологии, и имеет длину волны излучения в ближней инфракрасной области, где вода и кровь поглощают минимальное количество света.

Еще один тип NO-сенсоров – на основе квантовых точек (КТ), хорошо описан в литературе. КТ – представляют собой класс наночастиц, которые могут флуоресцировать на различных длинах волн (с узкими спектрами излучения), медленно фотообесцвечиваться и излучать свет в 100 раз сильнее, чем органические красители [89,90]. Также недавно разработанный NO-сенсор, на основе КТ CdSe-ZnS, показал свою стабильность в течение часа и специфичность

к NO в присутствии нитритов, нитратов и других активных форм азота и кислорода [91]. Основным недостатком является то, что покрытие необратимо изменяется под воздействием NO и, следовательно, может использоваться только для одного испытания.

Известно применение одностенных углеродных нанотрубок (УНТ) при флуориметрическом определении NO. Исследовательская группа Страно [92] разработала датчики NO путем обертывания одностенных УНТ специальными полимерами, которые показывают изменение интенсивности флуоресценции при воздействии NO. Датчики на основе УНТ имеют множество преимуществ по сравнению с другими флуоресцентными датчиками, включая отсутствие фотообесцвечивания, способность обнаруживаться посредством комбинационного рассеяния в дополнение к их флуоресцентному сигналу и излучение в ближнем инфракрасном диапазоне, где кровь и вода практически не поглощают свет. Недостаток существующих датчиков NO на основе УНТ состоит в том, что они отключают флуоресцентные датчики. Это создает дополнительные трудности при долгосрочном обнаружении NO в системе.

Как было показано, каждый тип флуоресцентного датчика имеет как преимущества, так и недостатки. Большинство флуориметрических подходов имеют проблемы с селективностью и чувствительностью, а также сложности при детекции NO *in vivo* из-за побочных процессов.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

ЭПР-спектроскопия (спектроскопия электронного парамагнитного резонанса) применяется для обнаружения парамагнитных молекул. В данном случае детекция основана на связывании этих молекул специальным соединением, называемым спиновой ловушкой, что приводит к стабилизации радикала, который можно охарактеризовать по спектрам ЭПР-спектроскопии. Посредством метода ЭПР может быть получена как качественная, так и количественная информация.

Как свободный радикал с неспаренным электроном, NO легко детектируется с помощью спектроскопии ЭПР [93–95]. Данный подход является

высокоселективным по отношению к NO в присутствии NO_2^- и NO_3^- в сложных биологических матрицах, таких как ткани и органы. Например, Дикалов и другие [93] сообщили об использовании HbNO для мониторинга NO через ЭПР как в цельной крови, так и в эритроцитах. Калибровочная зависимость была построена для надклеточных жидкостей промытых эритроцитов, инкубированных с известными количествами донора NO_2^- . Эту методику затем использовали для мониторинга уровней HbNO у мышей, получавших пищу с низким и высоким содержанием $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$. В аналогичном исследовании [96] Хол и соавторы методом ЭПР в сочетании с реакцией Грисса анализировали HbNO и MetHb *ex vivo*. По полученным результатам сделан вывод, что гипертермия у крыс приводит к количественному увеличению NO до уровней, наблюдаемых при септическом шоке и введении эндотоксина.

1.4.2 Электрохимические сенсоры для определения оксида азота и продуктов его окисления

В настоящее время разработка химических и биологических сенсоров является одним из наиболее бурно развивающихся направлений в аналитических исследованиях. Электрохимические сенсоры находят широкое применение во многих областях, таких как медицина, промышленность, экология и сельское хозяйство [97,98]. Это связано с тем, что электрохимические датчики дешевы, миниатюрны, просты в изготовлении, обладают низким пределом обнаружения, быстрым откликом и позволяют проводить измерения *in vivo* в режиме реального времени.

При измерении концентрации NO, амперометрический подход является наиболее распространенным из аналитических методов. Он позволяет регистрировать низкий ток (в том числе пА), возникающий в результате окисления NO с течением времени при фиксированном потенциале напряжения. Время отклика составляет всего несколько секунд, и в сочетании с высокой чувствительностью подход обеспечивает быстрое количественное измерение

небольших концентраций NO. Известно также применение дифференциально импульсной вольтамперометрии (ДИВ), постоянно-токовой и квадратно-волновой вольтамперометрии.

Благодаря высокой активности, NO может быть как электрохимически восстановлен, так и окислен на поверхности электрода. В связи с этим, разработаны биосенсоры на основе гемовых белков, использующие каталитическое восстановление NO, которые могут эффективно минимизировать потенциальные помехи от окисленных частиц, присутствующих в биологических системах [99]. Белки гема, например, включая гемоглобин, миоглобин и цитохром с, могут способствовать прямому переносу электронов благодаря наличию редокс-активных групп.

Электроокисление NO наиболее предпочтительно при качественном и количественном определении, и основано на превращении NO в NO⁺ посредством одноэлектронного процесса [100], благодаря наличию неспаренного электрона [101].

На данный момент основное внимание разработчиков NO-сенсоров сфокусировано на изготовлении новых мембранно-модифицированных электродов. Стоит отметить, что применение ионно-проницаемых мембран, таких как нафион, приводит к селективному определению NO. Подобные материалы широко используются для устранения возможных анионных помех (нитрит- и нитрат-ионы), что очень важно для медицинских целей [102].

Проводящие полимеры также считаются перспективными электрокаталитическими материалами, которые имеют ряд преимуществ при разработке электрохимических сенсоров. Различные фталоцианины металлов были исследованы в качестве катализаторов электрохимического мониторинга различных аналитов из-за их макроциклической природы (расширенные р-системы) и быстрых окислительно-восстановительных процессов. Кроме того, известны работы, в которых тщательно изучены металлы, оксиды металлов и

наноматериалы на основе углерода (например, УНТ, графен) для определения NO в различных объектах [103,104].

Поэтому в данном обзоре рассматриваются различные электродные материалы и способы их модификации, применяемые для количественного определения оксида азота как прямым так косвенным методами.

1.4.2.1 Прямое определение оксида азота на различных электродах

В литературе описаны разные типы электрохимических датчиков для прямого определения NO [105]. Наиболее распространены электроды на основе золота [106], платины [107], различных форм углерода [108].

Платиновые электроды

Платина – драгоценный металл, показывающий свою стабильность в электроанализе. Однако чувствительность голых платиновых электродов для определения NO недостаточно высокая. Следовательно, модифицирование поверхности различными композитными наноматериалами может привести к улучшению характеристик электрохимических NO датчиков. Среди известных платиновых электродов для определения NO распространены дисковые и стержневые (проволочные) платиновые электроды [101]. Многие исследователи стремятся к миниатюризации, поэтому микроэлектроды на основе платины и планарные (screen-printed) электроды также нашли широкое применение при создании NO-сенсоров.

Например, Ха и соавторы [109] использовали микросенсор на основе платины для определения NO на поверхности кожи. Электрод электрохимически покрывали пористым слоем платины для улучшения чувствительности. Предварительно производили накопление при потенциале +0,75 В. Приготовленный плоский микродатчик NO располагали над интересующим участком кожи, на который была нанесена капля фосфорного буферного раствора (рН = 7,4, 15 мкл). Чувствительность сенсора составляла $5,36 \pm 0,34$ нА / мм рт. ст. (n = 5).

Планарный дисковый платиновый амперометрический микросенсор использовался для одновременного количественного определения NO и CO в почках мышей [110]. На поверхность платинового электрода дополнительно электрохимически осаждали слой Sn, в течение 1 часа при перемешивании при $-0,6$ В в водном растворе, содержащем $0,01$ моль/дм³ SnCl₄ и 3 моль/дм³ H₂SO₄. Двойной датчик состоял из герметичного стекла с рабочим Pt электродом и хлоридсеребряными электродами (ХСЭ) в качестве электродов сравнения и вспомогательного, который расположен за внешней политетрафторэтиленовой газопроницаемой мембраной. Линейная зависимость интенсивности тока от концентрации сохранялась в широком диапазоне концентраций (от нмоль/дм³ до мкмоль/дм³), а предел обнаружения разработанного датчика составил 1 нмоль/дм³.

Амперометрический платиновый NO сенсор, описанный в работе [107], применяли для косвенного обнаружения нитрозотиолов. Этот датчик готовили с использованием электрополимеризованных композитных пленок *m*-фенилендиамин / резорцин и Nafion на поверхности платинового электрода. Используя оптимизированные скорости потока и концентрации реагентов, можно обнаружить различные уровни RSNO в диапазоне $0,25$ – 20 мкмоль/дм³. Чувствительность данного электрода составляла $0,026$ мкА/мкмоль/дм³.

Микробиосенсор оксида азота на основе цитохрома *c* и гемного белка, иммобилизованного на слое функционализированного проводящего полимера, был изготовлен для измерения NO *in vivo*. Определение NO, основанное на прямом переносе электрона при помощи цитохрома *c*, было изучено с использованием циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии [111]. Мешающее влияние посторонних веществ, таких как кислород и перекись водорода, было минимизировано посредством нанесения пленки Nafion. Предел обнаружения составил 13 ± 3 нмоль/дм³ ($S/N = 3$). Циклические вольтамперограммы от NO, полученные с использованием данного электрода, показывали пик восстановления при $-0,7$ В. Микробиосенсор вводили в мозг крысы для мониторинга изменения концентрации NO, вызванного употреблением препарата, содержащего кокаин.

Графитовые электроды

Графитовые электроды имеют ряд преимуществ перед другими типами электродов и широко используются для определения NO. В качестве достоинств графитовых электродов можно отметить высокую химическую стойкость, широкий диапазон потенциалов, доступность модификации поверхности.

Для определения NO наиболее широко распространено использование электродов на основе стеклоуглерода (СУЭ). Это инертный электрод с хорошей проводимостью, высокой твердостью, высоким перенапряжением выделения водорода, химической стабильностью.

Для каталитического окисления NO на СУЭ применяют различные полимерные пленки, например, полибриллиантовый крезильный синий [112] (линейность в диапазоне от 90 нмоль/дм³ до 60 мкмоль/дм³, предел обнаружения 12 нмоль/дм³, легкие крысы), поли-*p*-фениленвинилен [113] (линейность в диапазоне от 0,18 мкмоль/дм³ до 100 мкмоль/дм³, предел обнаружения 23 нмоль/дм³, сердце крысы), композит поли-(эозин *b*) ионной жидкости гексафторфосфата 1-гексил-3-метилимидазолия [114] (в почках крысы, предел обнаружения 18 нмоль/дм³).

Ким и соавторы [115] представили сенсор на основе поли(2,2':5',2''-тертиофен-(3'-(*n*-бензойной кислоты))), синтезированной с помощью метода легкой электрополимеризации, в которой восстановленный оксид графена (ВОГ) был введен для повышения проводимости. Полимерное покрытие было дополнительно модифицировано пористыми наночастицами ZnO для увеличения электроактивной поверхности и облегчения процесса переноса электронов. Представленный датчик показал хорошую селективность определения NO в присутствии аскорбиновой кислоты, ацетаминофена, супероксида, H₂O₂, L-аргинина и мочевой кислоты. Предел обнаружения составил $77 \pm 4,3$ нмоль/дм³.

NO сенсоры на основе композитных покрытий из хитозана, наночастиц металлов и УНТ находят широкое применение для различных биологических

объектов [116–120]. Такие композитные покрытия позволяют добиться лучшей чувствительности определения в широком диапазоне концентраций.

Например, Ю. Фей и соавторы [117] представили химически модифицированный электрод на основе окислительно-восстановительной полимерной пленки, содержащей комплекс осмия, нанесенной на электрод, модифицированный одностенными УНТ. Амперометрическое измерение NO проводилось при потенциале +0,80 В, линейная зависимость тока электроокисления NO от его концентрации сохранялась в диапазоне от 0,2 мкмоль/дм³ до 40 мкмоль/дм³, с пределом обнаружения от 50 нмоль/дм³.

Совсем недавно белок гем-шелка был включен в многостенные УНТ для создания высокостабильного биосенсора NO с диапазоном концентраций от 19 до 190 нмоль/дм³ и низким пределом обнаружения 2 нмоль/дм³. Датчик также продемонстрировал хорошую селективность и долговременную стабильность из-за присутствия гема в структуре белка [121].

Браун и Шенфиш [122] исследовали каталитические свойства ряда фталоцианиновых комплексов металлов, включая Fe (II), Co (II), Ni (II) и Zn (II), для обнаружения NO, выявив что Fe (II) обладает самой высокой каталитической активностью в отношении окисления NO.

Золотые электроды

Электроды на основе Au также широко используются для обнаружения NO. Это связано с тем, что небольшие функциональные молекулы могут быть легко иммобилизованы на поверхности золотого электрода через связь S-Au.

В работе [106] Пашай и соавторы сообщили о создании золотого электрода, модифицированного цитохромом, хитозаном и наночастицами (НЧ) золота. NO детектировался косвенно, посредством каталитической окислительно-восстановительной реакции с хорошей селективностью и стабильностью, а также с низким пределом обнаружения (45 нмоль/дм³).

В 2017 году Юн и др. [123] предложили новый электрохимический золотой биосенсор для определения NO, покрытый амино-модифицированными НЧ MoS₂,

оксидом графена и гибридом миоглобина. Как одноцепочечный гемовый белок, миоглобин обладает хорошими каталитическими свойствами по отношению к NO из-за железосодержащего порфирина в его ядре. Наночастицы MoS₂ были модифицированы цистеамином, где аминная группа обеспечивала благоприятную ориентацию иммобилизованного Mb, что облегчало эффективный перенос электронов и усиливало электрохимический сигнал. Данный электрод показал высокую стабильность, улучшенный амперометрический отклик по сравнению с подобными электродами и селективное зондирование NO с пределом обнаружения 3,6 нмоль/дм³.

Ли и др. [124] разработали усовершенствованный трехмерный пористый золотой микроэлектрод, изготовленный с помощью метода легкого электрохимического сплавления/расплавления (разложения) для мониторинга NO, выделяемого из живых клеток в режиме реального времени. Изготовленная пористая наноструктура золота может эффективно дифференцировать NO от аскорбиновой кислоты, цистеина и мочевой кислоты с хорошей воспроизводимостью и стабильностью. Разработанный сенсор продемонстрировал высокую стабильность, чувствительность и низкий предел обнаружения NO ($18,1 \pm 1,22$ нмоль/дм³) методом ДИВ.

Совсем недавно Чжао и соавторы [125] предложили гибкий электрод для обнаружения NO на основе наноструктурированной пленки золота и полидиметилсилоксана, демонстрирующий широкий диапазон определяемых концентраций от 10 до 1,295 нмоль/дм³ и низкий предел обнаружения 1 нмоль/дм³.

Тем временем Ванг и др. [126] изготовили гибкий датчик на основе многослойной нанотрубки Au и нанопроволоки TiO₂, где была применена фотокаталитическая стратегия для решения проблем загрязнения и пассивации, возникающих в результате окислительно-восстановительных реакций или секреции клеток; был достигнут рециркулируемый в реальном времени мониторинг выбросов NO эндотелиальными клетками пупочной вены человека.

Однако недавнее исследование подтвердило, что НЧ золота являются цитотоксичными для клетки. НЧ золота, защищенные тиолированным полиэтиленгликолем, обладали меньшей цитотоксичностью в отличие от наночастиц золота с цитратным покрытием при обнаружении внеклеточного NO, выделяющегося макрофагами.

В таблице 1 представлены электрохимические методы определения оксида азота. В качестве параметров сравнения взяты: тип материала электрода, модификатор, потенциал окисления, диапазон линейности градуировочной зависимости, предел обнаружения, объект исследования.

Как видно из таблицы 1, в литературе достаточно большое внимание уделено электрохимическому определению оксида азота на разных типах электродов с разной модификацией. Все они имеют свои преимущества и недостатки. Основным недостатком прямого метода определения оксида азота в биологических объектах является либо низкая селективность, либо сложная пробоподготовка объектов.

Таблица 1 – Электрохимические методы определения NO

Материал электрода	Модификатор	Методика	Еп	Электролит (рН)	Диапазон, мкмоль/дм ³	Предел обнаружения, нмоль/дм ³	Объект	Ссылка
Платина дисковый	Политетрафлуорэтилен/пористый слой платины	ВА	0,75	7,4 ФБ ¹	–	1	Кожа человека	[109]
	ПТФЭ/Sn/Pt	ВА, ХА ²	0,75	7,4 ФБ	0,001 – 1	1	Почки мышей	[110]
Платина проволочный	Нафион/м-фенилендиамин	ВА, ХА	0,75	7,0 ФБ	0,25 – 20	-	Нитрозотиолы	[107]
	Цитохром/ПТТКК ³	ВА, ХА	0,7	7,4 ФБ	2,4 – 55	13±3	мозг мышей	[111]
Стеклоуглерод	полибриллиантовый крезильный синий/Нафион	Амперометрия	0,7	7,4 ФБ	0,09 – 60	12	легкие крысы	[112]
	поли-п-фениленвинилен	ХК ⁴ , амперометрия, ДИВ	0,85	7,4 ФБ	0,18 – 100	23	сердце крысы	[113]
	поли-(эозин b)/гексафторфосфата 1-гексил-3-метилимидазолия (НММРФ6)/дидодецил диметиламмонийбромид	ЦВА ⁵	0,8	7,4 ФБ	0,036 – 130	18	почки крысы	[114]

¹ Фосфатный буфер² Хроноамперометрия³ Поли-5,2',5',2''-тертиофен-3'-карбоксильная кислоты⁴ Хронокулонометрия⁵ Циклическая вольтамперометрия

	поли(2,2':5',2''-тертиофен-(3'-(п-бензойной кислоты))/VOГ ⁶ /ZnO НЧ	Амперометрия	-0,9	7	0,019–76	7,7 ± 0,4	клетки человека	[115]
	поли-CoII/ Многостенные УНТ/Хитозан	ДИВ	0,85	7,4 ФБ		2,99	персик	[116]
	Одностенные УНТ/PVP-Os-EA	ЦВА	0,8	-0,2	0,2 – 40	50	раствор NO	[117]
	Хитозан/НЧ Au	ДИВ	0,74	7,4 ФБ	0,036 – 43,2	7,2	почки крысы	[118]
	Монослой 1,8,15,22-тетрааминофталациано кобальт (II)	ЦВА, ДИВ	0,82	2,5	3,0 – 30,0	0,14	сыворотка крови	[119]
	МУНТ/Хитозан-НЧ Au/Нафион	Амперометрия	0,85	7,4 ФБ	0,019 – 54 10	7,6	живые ткани	[120]
	МУНТ/расвор шелка/Fe	ВА	0,84	3	0,019 – 0,19 10	2	-	[121]
	Fe	ДИВ	0,8	7,4 ФБ	-	-	-	[122]
Золото	НЧ Au/хитозан/ цитохром с /нафион	ЦВА, ДИВ	-0,7	7,0 ФБ	0,1 – 2,15 10	45	модельные среды	[106]
	MoS ₂ / ОГ/ миоглобин	ХА	-	ФБ	-	3,6	модельные среды	[123]

⁶ Восстановленный оксид графена

	золото	ДИВ	0,75	7,2 ФБ	-	18,1 ± 1,2	Клетки сердца и раковые клетки	[127]
	Наноструктуры Au-полимерная пленка-полидиметилсилоксан	Амперометрия	0,85	-	0,01 – 1.295 10	1	Эндотелиальные клетки пупочной вены человека	[125]
	Нанотрубки Au/TiO ₂	Амперометрия	0,8	-	0,005 – 0,5	2,2	Живые клетки и ткани	[126]

1.4.2.2 Косвенное определение оксида азота через нитрит-ионы

Как уже было сказано ранее, высокая реакционная способность NO затрудняет его селективное определение в реальных образцах [50,51]. Зачастую, альтернативой прямым методам определения являются косвенные методики, основанные на количественной оценке нитрит-ионов. Электрохимические методы для мониторинга NO_2^- в различных объектах широко применяются из-за их высокой чувствительности и селективности.

Для этих целей используют различные электроды и модификаторы. Например, нанокompозитный углеродно-пастовый электрод, модифицированный Ag, галуазитовой нанотрубкой и MoS_2 применяли для электрокаталитического определения нитритов в водных растворах с помощью ЦВА с низким пределом обнаружения ($0,7 \text{ мкмоль/дм}^3$) и широким линейным диапазоном отклика от 2 до 425 мкмоль/дм^3 [128].

Также, в качестве модификатора для каталитического определения NO_2^- на СУЭ были использованы биметаллические сетки из наночастиц золото-медь [129] с широким линейным диапазоном от $0,1$ до 4 ммоль/дм^3 и низким пределом обнаружения ($0,2 \text{ мкмоль/дм}^3$).

Электрохимический сенсор на основе наночастиц меди на многослойных нанолистах из многостенных УНТ с восстановленным ОГ на СУЭ использовали для определения NO_2^- с пределом обнаружения $0,03 \text{ мкмоль/дм}^3$ и диапазоном линейности от $0,1$ до 45 мкмоль/дм^3 [130].

СУЭ, модифицированный нанокластерами золота с гистидиновым покрытием (Гис / Au) и вОГ был успешно применен для определения нитрита с использованием ДИВ [131] с линейным диапазоном от $2,5$ до 5700 мкмоль/дм^3 и пределом обнаружения равным $0,5 \text{ мкмоль/дм}^3$.

Раджакришнан и соавт. использовали СУЭ, модифицированный композитом Fe_2O_3 / вОГ, для обнаружения нитритов в диапазоне концентраций от $0,05$ до $780,0 \text{ мкмоль/дм}^3$ с пределом обнаружения $0,015 \text{ мкмоль/дм}^3$ [132].

Известно также множество методов определения нитрит-ионов на поверхностях электродов без применения модификаторов. Например, в работе [133] описана вольтамперометрическая методика совместного определения нитритов и нитратов в водах. Концентрацию нитритов определяли методом добавок на графитовом электроде (ГЭ) в 0,1 моль/дм³ Na₂SO₄. Линейность градуировочной зависимости сохранялась в диапазоне от 3 до 14 мкмоль/дм³. Нижняя граница определяемых содержаний составила 3 мкмоль/дм³.

В таблице 2 представлены электрохимические методы определения нитрит-ионов для косвенного определения оксида азота. В таблице показан сравнительный анализ методов по типу электрода, модификатору, потенциалу окисления, диапазону линейности градуировочной зависимости, пределу обнаружения и объекту исследования.

Как видно из таблицы 2, электрохимические методы определения нитрит-ионов широко распространены в аналитической химии. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки, поэтому разработка нового альтернативного более простого, экспрессного, чувствительного и менее ресурсозатратного метода определения нитрит-ионов как метаболитов оксида азота в биологических объектах имеет свою актуальность и по сей день.

Таблица 2 – Электрохимические методы определения нитрит-ионов

Электрод	Модификатор	Методика	Еп	Электролит (рН)	Диапазон мкмоль/дм ³	Предел обнаружения, мкмоль/дм ³	Объект	Ссылка
Углеродно-пастовый	Ag/HNT/MoS ₂	ЦВА	0,8	ФБ, 4,0	2 – 425	0,7	Модельные растворы	[128]
СУЭ	AuCu нанопепи	ЦВА	0,85	ФБ 7,0	0,1 – 4	0,2	Продукты питания, вода	[129]
	Cu/МУНТ/ВОГ	КВВ ⁷	0,62	Na ₂ SO ₄ /H ₂ SO ₄ , рН = 3.0	0,1 – 45	0,03	Продукты питания	[130]
	Гистидин@Au/в ОГ	ДИВ	0,8	ФБ 7,0	2,5 – 5700	0,5	Продукты питания	[131]
	Fe ₂ O ₃ /ВОГ	ДИВ	0,8	ФБ 7,0	0,05 – 780	0,015	Модельные растворы	[132]
Графитовый	-	АВ ⁸	0,9	Na ₂ SO ₄ 0,1 моль/дм ³	3 – 14	2,9	вода	[133]

⁷ КВВ – квадратно-волновая вольтамперометрия⁸ АВ – анодная вольтамперометрия

1.5 S-нитрозотиолы. Значение S-нитрозотиолов в биологических системах

S-нитрозотиолы соответствуют общей формуле RSNO, где R – цистеинсодержащий пептид, и представляют собой ковалентные аддукты тиолат-аниона (RS⁻) и нитрозо-группы (NO⁻) [8].

Интерес к S-нитрозотиолам возрос с момента их идентификации как ключевых биологически важных участников реакций, индуцируемых оксидом азота. Дело в том, что синтезированные RSNO широко использовались в качестве доноров NO и играли важную роль в исследовании NO-зависимых механизмов передачи сигналов. Эти ранние исследования были, в основном, сфокусированы на RSNO как на промежуточном звене при образовании NO [11].

Действительно, понимание того, как регулируется процесс S-нитрозилирования, и разработка новых терапевтических средств на основе S-нитрозилирования приводит к новым возможностям модулирования эффектов NO при различных заболеваниях.

Однако, изучение механизмов, посредством которых нитрозотиолы образуются и метаболизируются, а также разработка протоколов, позволяющих идентифицировать RSNO по конкретным белкам привели к выводу, что эти соединения являются более значимыми, чем просто доноры NO, и должны рассматриваться как отдельная единица на основе тиола, которая регулирует функцию белка.

Таким образом, зафиксировано значительное увеличение числа исследований, в которых изучаются возможные последствия использования RSNO в клинических испытаниях при терапии сердечно-сосудистых, респираторных и нейродегенеративных заболеваний. Сообщалось, что дисбаланс уровней RSNO связан с несколькими патологиями [134].

Тем не менее, роль NO и RSNO в биологических системах находится в стадии активного изучения. Поэтому точное обнаружение и количественная

оценка RSNO жизненно важны для понимания их физиологических функций при нормальном функционировании и при патологических процессах.

К сожалению, нестабильный характер как RSNO, так и NO усложняет изучение их физиологической роли. Особенно, обнаружение RSNO в биологических образцах является сложным, подвержено ошибкам и исследователи все еще ищут новые методы решения этих проблем [7].

1.6 Методы определения нитрозотиолов в биологических системах

Независимо от исследуемой модели (клеточные культуры, субклеточные фракции, биологический материал клинического происхождения) требуются адекватные аналитические подходы для получения точной качественной и количественной информации. Однако, количественное определение RSNO в биологических пробах представляет собой сложную задачу [135] поскольку всегда следует тщательно рассматривать возможные взаимодействия используемых реагентов с компонентами матрицы [136].

Прямые методы

УФ-спектрофотометрическое обнаружение нитрозотиолов при 334 нм, часто связанное с процедурами разделения, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или капиллярный электрофорез, является широко используемым методом для непосредственного определения нитрозотиолов. Прямые методы позволяют избежать процедуры дериватизации, но из-за довольно низкого молярного коэффициента поглощения S-нитрозогруппы УФ-спектрофотометрия ограничивается обнаружением микромолярных уровней [137,138].

Масс-спектрометрия (МС) может быть использована как для определения концентрации RSNO, так и для идентификации отдельных молекулярных частиц, при условии, что процедуры подготовки образцов могут гарантировать целостность связи S-NO. Идентификация производится путем выборочного

анализа соответствующего соотношения массы / заряда (m/z) молекулярных частиц.

Когда анализ МС связан с жидкостной хроматографией (ЖХ-МС) и подвижная фаза является кислотой, важно исключить искусственное образование RSNO из введенных тиолов и нитритов, возможно присутствующих в колонке. Также необходим анализ стандартного ^{15}N -меченного RSNO, а также образцов, ранее подвергнутых фотолизу или обработанных HgCl_2 (отрицательный контроль) [6]. Системы ЖХ-МС использовались для определения S-нитрозоглутатиона (GSNO) в плазме [139], но метод еще не был запатентован. МС также может быть связан с газовой хроматографией (ГХ-МС) для анализа RSNO с низкой молекулярной массой, но процедуры требуют превращения RSNO в нитрит с последующей его дериватизацией с пентафторбензилом [139].

Кроме того, прямое обнаружение RSNO также осуществлялось с помощью плоских амперометрических датчиков [140].

Что касается методов, основанных на иммунологии, поли- и моноклональные антитела, распознающие группировку SNO, использовались для выявления RSNO *in situ* в исследованиях иммуногистохимии [11].

Косвенные методы

Определение и количественная оценка RSNO могут быть произведены косвенно после расщепления связи S-NO, через анализ высвобожденных метаболитов. Разложение RSNO получают путем химического восстановления или фотолиза, а продукты разложения (NO^\cdot или нитрит) можно определять различными методами (спектрофотометрия, хемилюминесценция, флуориметрия, электрохимическое обнаружение, электронный спиновый резонанс, масс-спектрометрия); подробности отдельных процедур по определению нитритов и NO представлены в разделе 1.4.2 настоящей работы, а также широко описаны в [7,141].

В целом преимущество косвенных методов заключается в их хорошей чувствительности, хотя необходимо учитывать несколько недостатков, которые обычно связаны с длительностью и сложностью процедур, повышающих вероятность дополнительного образования RSNO, мешающим влиянием нитритов и металлов и, в некоторых случаях, с низкой чувствительностью. Важный недостаток многих из этих анализов заключается в использовании HgCl_2 для разрыва связи S–NO. Это связано с признанной токсичностью этого соединения, что небезопасно как для операторов, так и для окружающей среды.

Также в литературе описаны методы, направленные на определение тиоловых фрагментов после разложения нитрозотиолов. Например, глутатион, полученный восстановлением GSNO β -меркаптоэтанолом может быть количественно определен с помощью флуориметрического подхода [142].

Тем не менее, несмотря на большое количество описанных подходов количественной и качественной оценки нитрозотиолов все еще сохраняется необходимость создания новых более чувствительных методов для понимания роли этих соединений в различных процессах в организме человека.

ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Оборудование, электроды, химическая посуда

Оборудование

Для проведения электрохимических исследований использовали вольтамперметрический анализатор ТА-2 (ООО «НПЦ Техноаналит»), г. Томск, Россия» в комплекте с программным обеспечением.

ТА-2 используется для определения качественного и количественного состава электрохимически активных веществ в различных объектах, в том числе биологических (кровь, сыворотка крови человека и животных, надклеточные жидкости и др.). Прибор оснащен тремя трехэлектродными электрохимическими ячейками для проведения параллельных измерений. В данной работе электрохимические ячейки представляют собой кварцевые стаканчики объемом 20 см³, в которые налит раствор электролита и опущены электроды. Электрохимическая ячейка состоит из трех электродов: рабочего, вспомогательного и электрода сравнения. Перемешивание растворов в ячейке осуществляется посредством вибрации рабочего электрода. Для регистрации вольтамперных кривых данное оборудование позволяет применять постоянно-токовую, ступенчатую, квадратно-волновую и дифференциально-импульсную форму развертки поляризующего напряжения. Для устранения мешающего влияния кислорода перед началом эксперимента раствор барботировали газообразным азотом.

Для контроля pH использовали pH-метр/иономер «ИТАН» (ООО НПЦ «Томьаналит», г. Томск, Россия).

Взвешивание точной навески стандартных веществ и анализируемых образцов осуществляли на лабораторных аналитических весах Acculab ALC-210d4 («Sartorius Weight Technology GmbH», Германия) с I классом точности по ГОСТ 24104-2001.

Дистиллированную воду получали с использованием электрического аквадистиллятора «ДЭ-4» (Россия, Санкт-Петербург).

Центрифуга 5702 R (Eppendorf, Германия) также была использована в работе при проведении пробоподготовки биологических объектов.

Исследование морфологии электродной поверхности проводили с помощью сканирующего (растрового) электронного микроскопа JEOL JSM-7500FA с пространственным разрешением 1 нм и максимальным увеличением 1000000 крат.

Для проведения сравнительных исследований в работе использовали спектрофлуориметр «Флюорат-02 Панорама» (г. Санкт-Петербург) и спектрофотометр Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (США).

Подготовка и проверка оборудования осуществлялась согласно инструкции по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Электроды

В качестве рабочей поверхности использовали графитовый импрегнированный электрод благодаря его хорошей воспроизводимости, широкому диапазону потенциалов и доступности.

Импрегнированный графитовый электрод – цилиндрический полимерный корпус, в который встроен диск графита (ООО «ЮМХ», Томск, Россия). Материал электрода подготавливают посредством спрессовывания стружки графита с полимером под вакуумом.

В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода применялись ХСЭ, представляющие собой полые цилиндры, заполненные насыщенным раствором хлорида калия (KCl), с опущенной в него серебряной проволокой, покрытой труднорастворимой солью хлорида серебра. Вновь приготовленные ХСЭ предварительно выдерживались в течение 8 часов в насыщенном растворе KCl (молярная концентрация составляла 1 моль/дм³) с целью установления равновесного значения потенциала. Готовые электроды хранились в насыщенном растворе KCl и ополаскивались перед проведением эксперимента дистиллированной водой.

Химическая посуда

В работе использовалась следующая лабораторная стеклянная посуда: колбы мерные на 50, 100, 500 и 1000 см³, цилиндр мерный вместимостью 50 см³, стаканы для взвешивания (бюксы), стакан химический 100 см³, кварцевые стаканчики объемом 20 см³.

Отбор точных объемов жидкостей осуществлялся при помощи полуавтоматических дозаторов с переменным объёмом с одноразовыми наконечниками из полипропилена (АО «Термо Фишер Сайентифик», г. Санкт-Петербург, Россия).

Всю химическую посуду перед использованием, хорошо очищали мыльно-содовым раствором, а затем промывали дистиллированной водой и этиловым спиртом. Высушивали на воздухе. Проверка чистоты производилась перед началом эксперимента посредством регистрации вольтамперных кривых в фоновом электролите. Отсутствие пиков на вольтамперограммах в катодной и анодной областях развертки свидетельствовало о чистоте посуды и фонового электролита.

2.2 Реактивы

- Спирт этиловый;
- Вода дистиллированная;
- Этилнитрит (EtNO₂) (Sigma-Aldrich, США);
- Калий хлористый, х.ч. (ОАО «Уралкалий», Россия);
- Ледяная уксусная кислота, х.ч. (Реахим, Россия);
- Борная кислота, х.ч. (Лабтех, Россия);
- Ортофосфорная кислота, х.ч. (Реахим, Россия);
- Натрий гидроокись, х.ч. (Лабтех, Россия);
- Полистирол (Sigma-Aldrich, США);
- Микрокристаллический графит, <20мкм (Sigma-Aldrich, США);
- Микрокристаллический графит, (ЗАО Вектон, Россия);
- 1,2-дихлорэтан (Sigma-Aldrich, США);
- Гексацианоферрат калия (III) (K₃[Fe(CN)₆] (Sigma-Aldrich, США);

- Липополисахарид (ЛПС) (Sigma-Aldrich, США);
- Интерлейкин-4 (ИЛ 4) (Sigma-Aldrich, США);
- Среда RPMI-1640 (Invitrogen, США);
- Среда DMEM (BioFroxx, Германия);
- 10% инактивированная телячья сыворотка (Invitrogen, США);
- L-глутамин (Sigma, США);
- Пенициллин (Sigma, США);
- Стрептомицин (Sigma, США);
- Фикол (Amersham, США);
- L-аргинин (Solgar, США);
- S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) (Sigma, США);
- Трихлоруксусная кислота (Химмедснаб, Россия);
- S-метилметантиосульфат (ММТС) (Sigma, США);
- Диаминородамин-4М (ДАР-4М) 5 ммоль/дм³, (Sigma, США);
- Макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ) (Sigma, США);
- Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), (Sigma, США).

2.3 Растворы и модификатор

Фоновый электролит

Для приготовления кислой части буферного раствора Бриттона-Робинсона в мерную колбу вместимостью 1 дм³ вносили 2,4732 г борной кислоты, 2,65 см³ ортофосфорной кислоты и 5,69 см³ уксусной кислоты и приливали небольшое количество дистиллированной воды. После растворения объем доводили до метки. Основную часть (2 моль/дм³) готовили по следующей методике: навеску 8 г NaOH, взвешенную на аналитических весах, переносили в мерную колбу объемом 1 дм³, растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды и доводили до метки. Для достижения нужного рН к кислой среде буферного раствора добавляли 2 моль/дм³ раствор NaOH. Значение водородного показателя контролировали рН-

метром. Универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона хранили в стеклянной посуде при комнатной температуре в местах, защищенных от попадания прямых солнечных лучей. Срок хранения 6 месяцев.

Раствор хлорида калия

Для приготовления раствора хлорида калия с молярной концентрацией 1 моль/дм³ навеску калия хлорида ($7,46 \pm 0,01$) г переносили в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводили объем до метки дистиллированной водой. Раствор хлорида калия хранили в стеклянной посуде при комнатной температуре в местах, защищенных от попадания прямых солнечных лучей.

Раствор этилнитрита с концентрацией 0,035·моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещали 0,4320 г стандартного раствора этилнитрита (15 % в этаноле) и доводили объем до метки 96 % этиловым спиртом. Раствор этилнитрита хранили в стеклянной посуде при температуре +4 °С в местах, защищенных от попадания прямых солнечных лучей.

Раствор SNAP с концентрацией 0,005 моль/дм³

Навеску S-нитрозо-Нацетилпенилламина массой 11 мг вносили в мерную колбу объемом 10 см³ и доводили до метки бидистиллированной водой. Раствор хранили в местах, защищенных от попадания солнечных лучей при температуре +8 °С сутки.

Раствор № 1 – гидрофосфат натрия 1/15 моль/дм³ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Для приготовления раствора № 1 навеску $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ массой 11,866 г, переносили в мерную колбу объемом 1 дм³ и доводили до метки дистиллированной водой.

Раствор № 2 – дигидрофосфат калия 1/15 моль/дм³ ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Для приготовления раствора № 2 навеску $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ массой 9,073 г, переносили в мерную колбу объемом 1 дм³ и доводили до метки дистиллированной водой.

Раствор фосфатного буфера (ФБ) с рН 7,4, содержащий 0,1 моль/дм³ ЭДТА

Для приготовления рабочего фосфатного буферного раствора с рН 7,4 брали 81,8 см³ раствора № 1, переносили в мерную колбу объемом 100 см³ и доводили до

метки раствором № 2. Далее навеску ЭДТА массой 2,922 г переносили в мерную колбу на 100 см³ и доводили до метки приготовленным раствором фосфатного буфера с рН 7,4.

Раствор фосфатного буфера с рН 7,4, содержащий 80 ммоль/дм³ S-метилметантиосульфоната (ММТС)

Для приготовления рабочего фосфатного буферного раствора с рН 7,4 брали 81,8 см³ раствора № 1, переносили в мерную колбу объемом 100 см³ и доводили до метки раствором № 2. Далее навеску ММТС массой 0,88 г переносили в мерную колбу на 100 см³ и доводили до метки приготовленным раствором фосфатного буфера с рН 7,4.

Приготовление 2,08 моль/дм³ раствора уксусной кислоты

Раствор готовят под тягой. Мерную колбу вместимостью 1000 см³ до половины наполняют дистиллированной водой и осторожно при перемешивании вливают 125 см³ ледяной уксусной кислоты. После охлаждения объем раствора доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора 6 месяцев при комнатной температуре.

Приготовление 10 % раствора реактива Грисса в растворе уксусной кислоты

В термостойкий химический стакан вместимостью 500 см³ помещают 25,0 г сухого реактива Грисса и растворяют в 225 см³ ледяной уксусной кислоты. Стакан помещают на магнитную мешалку и перемешивают содержимое при нагревании до полного растворения. По окончании растворения реактив Грисса фильтруют через фильтр Шотта во флакон из темного стекла. Срок хранения раствора 2 месяца при комнатной температуре.

Модификатор

Углеродные чернила подготавливали по описанной ниже процедуре. Микрористаллический графит массой 0,09 г и полистирол массой 0,01 г переносили в пробирку эппендорф, добавляли 0,5 см³ 1,2-дихлорэтана и интенсивно перемешивали с помощью шейкера в течение 10 минут до получения однородной суспензии. Раствор модификатора хранили в пробирке эппендорф при комнатной температуре в местах, защищенных от попадания прямых солнечных лучей. Срок хранения 1 неделя.

2.4 Подготовка модифицированного электрода

Рабочий импрегнированный графитовый электрод (диаметром 4,0 мм) полировали фильтровальной бумагой и очищали в ультразвуковой ванне перед каждой модификацией. Затем 0,004 см³ суспензии модификатора наносили на поверхность электрода и сушили на воздухе, получая графитовый электрод, модифицированный углеродными чернилами (ГМЭ). Поверхность электрода обновляли по необходимости после удаления модификатора кусочком фильтровальной бумаги.

2.5 Объекты исследования

В данной работе в качестве стандартного вещества для подбора условий определения нитрит-ионов использовали раствор этилнитрита (EtNO₂) – нитрита органического происхождения. Структурная формула этилнитрита приведена на рисунке 2. Константа диссоциации согласно литературным данным составляет –2,4 [143].

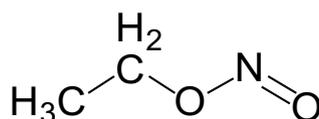


Рисунок 2 – Структурная формула

Объектами исследования являлись образцы надклеточной жидкости макрофагов, полученные из моноцитов периферической крови пациентов НИИ

Онкологии г. Томска. Моноциты выделяли из крови здоровых доноров и людей больных раком легкого.

Необходимые фенотипы при инкубировании макрофагов (M1 или M2) были получены путем добавления липополисахарида (ЛПС) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) соответственно. Был также контрольный образец без добавления каких-либо индукторов.

В качестве стандарта S-нитрозотиолов в данной работе использовали S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин, структурная формула которого представлена на рисунке 3.

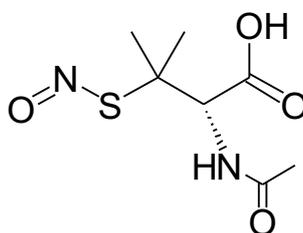


Рисунок 3 – Структурная формула S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламина

2.6 Методика приготовления надклеточных жидкостей макрофагов

Венозную кровь забирали в вакуумные системы для взятия крови, обработанные гепарином, утром натощак в количестве 20 см³ от каждого волонтера.

Гепаринизированную кровь в соотношении 1:1 смешивали со средой для отмывки, состоявшей из среды RPMI-1640, в которую предварительно были добавлены L-глутамин, пенициллин и стрептомицин. Полученную смесь в количестве 30 см³ наслаивали на 15 см³ фикола и центрифугировали при 1600 оборотах в минуту без встряхивания в течение 45 минут при 22 °С. Затем полученное интерфазное кольцо, содержащее фракцию моноцитов и лимфоцитов, аккуратно собирали при помощи пастеровской пипетки и дважды отмывали средой для отмывки при 1200 оборотах в минуту в течение 15 минут при 4°С. Отмытые мононуклеарные клетки разводили в полной культуральной среде до концентрации

$2 \cdot 10^6$ клеток/см³ (среда DMEM, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин, 10 % термически инактивированной фетальной сыворотки теленка).

Выделенные моноклеарные клетки (моноциты) в количестве $2 \cdot 10^6$ в 1 см³ полной культуральной среды помещали в лунку 24-луночного плоскодонного планшета для культивирования клеток. Для каждого исследования ставились 3 пробы: 1 – контрольная проба, 2 – проба для индукции M1-макрофагов, 3 – проба для индукции M2-макрофагов. Во все лунки добавляли M-КСФ в дозе 20 нг/см³. Через 5 суток инкубации клеток в атмосфере 5 % CO₂ во вторую и третью пробы добавляли 100 нг/см³ ЛПС или 10 нг/см³ ИЛ-4 соответственно. Через 24 часа инкубации фракцию не прилипших к пластику клеток удаляли смыванием. Прилипшие клетки – макрофаги, отделяли от дна лунки скрепером, собирали в пробирки с полной культуральной средой, фиксировали, а затем окрашивали для исследования индуцированного фенотипа макрофагов. Надклеточную жидкость исследовали на наличие метаболитов оксида азота.

2.7 Методика подготовки образцов крови для вольтамперометрического определения нитрозотиолов

Венозную кровь забирали утром натощак, в количестве 20 см³ от каждого волонтера, в вакуумные системы для взятия крови, которые предварительно были обработаны гепарином, а также защищены от попадания солнечного света. После этого 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.

2.8 Методика эксперимента

Определение нитритов как NO-метаболитов по реакции Грисса

0,5 см³ пробы доводили дистиллированной водой до 50 см³, прибавляли 2,0 см³ раствора Грисса и перемешивали. Через 30 – 40 минут измеряли оптическую

плотность раствора относительно холостой пробы при длине волны 520 нм. Измерение проводили в кювете с длиной поглощающего слоя 1 см.

Определение нитритов как NO-метаболитов методом анодной вольтамперометрии

В электрохимическую ячейку вносили 10 см³ буферного раствора Бриттона-Робинсона рН 4,02. Трехэлектродная ячейка состояла из рабочего ГМЭ электрода, ХСЭ использовали в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода. Электроды подключали к вольтамперометрическому анализатору ТА-2 и помещали в раствор буферного электролита.

Для получения чистого фона перед измерениями ГМЭ сканировали в режиме постоянно-токовой анодной вольтамперометрии с дифференцированием в диапазоне от 0,4 до 1,2 В. Сигнал окисления EtNO₂ использовали в качестве стандартного сигнала. Съемку вольтамперограмм проводили в растворе БР с рН 4,02, скорости сканирования 100 мВ/с, $E_{\text{нак}}$ 0,4 В и $t_{\text{нак}}$ 4 с.

Определение S-нитрозотиолов методом флуориметрии

К 0,1 см³ анализируемой биологической жидкости добавляли 1 см³ фосфатного буфера (рН 7,4) с 80 ммоль/дм³ S-метилметантиосульфоната (ММТС) и центрифугировали в течение 20 мин при 20000 об/мин и 4 °С. Затем 0,5 см³ супернатанта переносили в микропробирку на 2 см³, и доводили до метки охлажденным ацетоном. Раствор выдерживали 20 мин при –20 °С для осаждения белков и жиров, а затем центрифугировали еще 20 мин при 20000 об/мин и 4 °С. После этого, супернатант удаляли, а к осадку повторно добавляли 0,25 см³ фосфатного буфера (рН 7,4) с 80 ммоль/дм³ ММТС и центрифугировали еще 3 мин при 20000 об/мин и 4 °С. Далее к 0,2 см³ аликвоты полученного супернатанта добавляли 0,0015 см³ 5 моль/дм³ раствора диаминородамина-4М (ДАР-4М), чтобы достичь концентрации красителя 37,5 мкмоль/дм³ и аккуратно перемешивали пипеткой. Встряхивать микропробирку нельзя! После этого аликвоту смеси 0,1 см³ супернатанта + ДАР-4М помещали в лунку планшета для ПЦР, а оставшиеся ~ 0,1 см³ хранили в полной темноте при комнатной температуре как фоновый образец для сравнения. Каждый новый исследуемый образец должен иметь холостую

пробу. Планшет аккуратно помещали лицевой стороной вниз в трансиллюминатор на 5 мин. Жидкость не упадет, если тарелку не трясать или не ударить. После этого образцы из каждой лунки осторожно собирали и переносили в микропробирку на $1,5 \text{ см}^3$, добавляли $0,9 \text{ см}^3$ фосфатного буфера (рН 7,4, без ММТС) в каждую микропробирку. Кроме того, добавляли еще $0,9 \text{ см}^3$ фосфатного буфера к холостым образцам.

Все холостые пробы и исследуемые образцы анализировали в спектрофлуориметре с возбуждением 560 нм и длиной волны излучения 575 нм. В течение всего эксперимента исследуемые образцы хранили в темноте и поддерживались при температуре $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Это связано с высокой чувствительностью S-нитрозотиолов к свету.

Определение SNAP методом вольтамперометрии

В электрохимическую ячейку, состоящую из графитового электрода, модифицированного углеродными чернилами и двух ХСЭ, содержащую фосфатный буферный раствор (рН 7,4) и $0,1 \text{ ммоль/дм}^3$ ЭДТА, вносили различные аликвоты водного раствора SNAP (5 ммоль/дм^3). Все измерения SNAP проводились в кварцевых стаканчиках при закрытом ТА-2, чтобы избежать разложения исследуемого вещества под действием света. Исследуемый нитрозотиол в фосфатном буфере с рН 7,4, содержащем $0,1 \text{ моль/дм}^3$ ЭДТА, перемешивали, накапливали 30 с при потенциале $-0,6 \text{ В}$, а затем восстанавливали при помощи катодной вольтамперометрии в режиме первой производной при потенциале $-0,57 \text{ В}$. Перед всеми электрохимическими экспериментами раствор продували азотом, чтобы предотвратить окисление конечных продуктов растворенным или свободным кислородом.

2.9 Методика проведения микроскопических исследований поверхности электродов

Поверхность электродов с модификатором и без него исследовали с помощью сканирующего (растрового) электронного микроскопа JEOL JSM-7500FA с пространственным разрешением 1 нм и максимальным увеличением

1000000 крат. Как описано в пункте 2.4, углеродные чернила готовили из микрокристаллического графита и полистирола в среде 1,2-дихлорэтана. При этом был использован микрокристаллический графит двух производителей: ЗАО Вектон и Sigma-Aldrich.

2.10 Статистическая обработка данных

Завершающим этапом при разработке методик количественного определения проводили статистическую обработку полученных данных.

При использовании ряда нормативных документов [144–146] в работе рассчитаны среднеквадратичное отклонение (СКО), правильность, внутрилабораторная прецизионность, предел обнаружения, систематическая и случайная погрешности.

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ НИТРИТ-ИОНОВ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ ЭЛЕКТРОДЕ

На основании проведенного литературного обзора (ГЛАВА 1) было выявлено, что оксид азота проявляет высокую реакционную способность и окисляется, в основном, до нитритов. При этом существуют методики прямого и косвенного определения оксида азота. На данном этапе работы количественное определение оксида азота ориентировано на его косвенное определение через нитрит-ионы для оценки эффективности поляризации макрофагов. В качестве стандартного вещества использовали нитрит органического происхождения EtNO_2 .

3.1 Характеристика модифицированного электрода и исследование его поверхности методом сканирующей микроскопии

Для разработки методик определения нитритов как NO-метаболитов и нитрозотиолов как NO-субстратов на импрегнированном графитовом электроде, модифицированном углеродными чернилами, изучили морфологию поверхности электрода и оценили эффективность его модификации.

Для изучения морфологии поверхности электродов использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ). На рисунке 4 показана поверхность графитового электрода до и после модификации. Первый образец (А) представляет собой импрегнированный графитовый электрод, второй (Б) и третий (В) – поверхности после модификации углеродными чернилами. Для приготовления чернил использовали микрокристаллический графит разных производителей: ЗАО Вектон и Sigma-Aldrich.

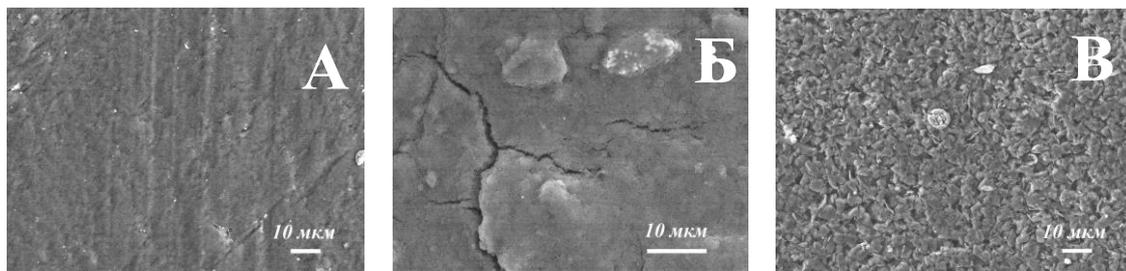


Рисунок 4 – снимки СЭМ: А – ГЭ без модификатора; Б – ГЭ после модификации чернилами (ЗАО Вектон); В – ГЭ после модификации чернилами (Sigma-Aldrich)

Как видно из рисунка 4, на поверхности образцов наблюдается выборочная микропористость. Размер пор не превышает 20 мкм.

Углеродная паста, полученная с помощью микрокристаллического графита производства Sigma-Aldrich, образует на электроде равномерную пленку, имеющую более разветвленную поверхность (В) по сравнению с модификатором, для получения которого использовали микрокристаллический графит ЗАО Вектон (Б). Поэтому, для дальнейших исследований и разработки методики определения NO-метаболитов и NO-доноров в биологических объектах использовали микрокристаллический графит Sigma-Aldrich.

Эффективность модификации оценивали с использованием стандартной окислительно-восстановительной пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (рисунок 5).

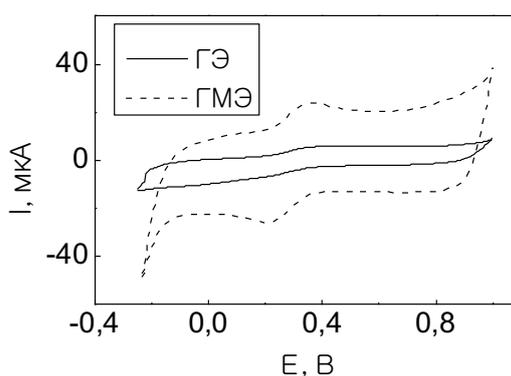


Рисунок 5 – ЦВА 500 мкмоль/дм³ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ в 0,1 моль/дм³ KCl на ГЭ и ГМЭ. $\nu = 60$ мВ/с

Как видно из рисунка 5, модификация графитового электрода углеродными чернилами (ГМЭ) приводит к возрастанию сигналов окисления/восстановления,

что свидетельствует об увеличении чувствительности электрода. Доказано, что после модификации поверхности электрода данным модификатором, его чувствительность повышается в четыре раза [147]. Таким образом, в качестве рабочего электрода применяли ГМЭ.

3.2 Влияние различных факторов на сигнал электроокисления нитрит-ионов

Из литературы известно, что нитрит ионы электрохимически окисляются на поверхности электрода. Поэтому, 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.

3.2.1 Влияние рН фонового электролита на сигнал электроокисления нитрит-ионов

На механизм процессов окисления/восстановления в вольтамперометрическом анализе существенное влияние оказывает рН фонового электролита. Для установления оптимального значения водородного показателя при окислении нитрит-ионов на ГМЭ использовали универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона со следующими значениями рН: 2,11; 3,19; 4,02; 4,93; 5,82; 6,86; 8,0; 9,18 (рисунок 6).

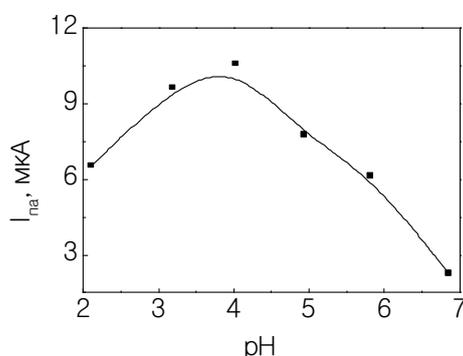


Рисунок 6 – Зависимость интенсивности тока электроокисления NO_2^- на ГМЭ от рН среды. $C(\text{NO}_2^-) = 0,3$ ммоль/дм³. $v = 80$ мВ/с

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 [148].

В сильнощелочной среде при рН $> 8,0$ сигнала окисления нитрит-ионов на электродах не наблюдалось. При этом зависимость потенциала пика от рН среды носила линейный характер в диапазоне рН от 2 до 7.

Так как максимальный ток электроокисления нитрит-ионов был получен в кислой среде, то в дальнейших исследованиях использовали фоновый электролит – универсальный буферный раствор БР с рН 4,02. Достаточно надежные результаты были получены и при рН $4,0 \pm 0,1$.

3.2.2 Влияние параметров электролиза (потенциала и времени накопления) на сигнал электроокисления нитрит-ионов

Основной задачей при разработке методики количественного определения является подбор оптимальных условий для процесса окисления и/или восстановления вещества. Правильно подобранные условия приводят к повышению чувствительности определения. В связи с этим было рассмотрено влияние параметров накопления на интенсивность сигнала электроокисления нитрит-ионов.

При подборе потенциала накопления исследовали область значений в диапазоне от -1 В до $+1$ В (рисунок 7). 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.

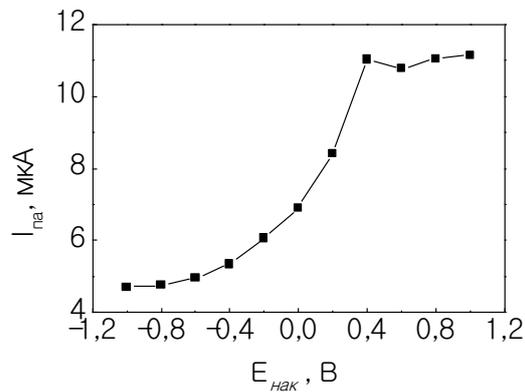


Рисунок 7 – Зависимость интенсивности тока электроокисления NO_2^- от потенциала накопления на ГМЭ ($C = 0,3$ ммоль/дм³, $\nu = 80$ мВ/с)

Для определения времени накопления исследовали область значений от 1 до 60 с (рисунок 8). Ток электроокисления нитрит-ионов увеличивается в течение первых 4 с.

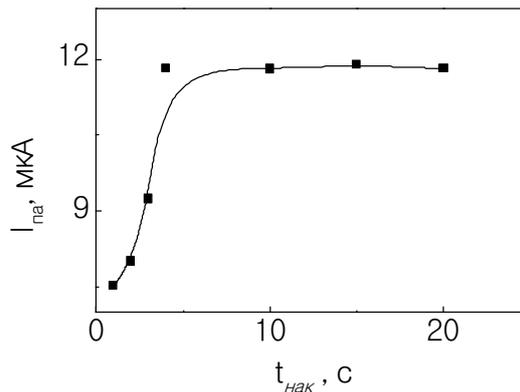


Рисунок 8 – Зависимость интенсивности тока электроокисления NO_2^- от времени накопления на ГМЭ ($C = 0,3$ ммоль/дм³, $\nu = 80$ мВ/с)

Поскольку величина тока электроокисления нитрит-ионов при увеличении времени накопления в диапазоне от 4 до 60 с практически не изменялась, выбор остановили на времени накопления 4 с.

3.3 Исследование механизма электроокисления нитрит-ионов на графитовом модифицированном электроде

Для установления механизма электроокисления NO_2^- на ГМЭ были построены зависимости тока (I) от $\nu^{1/2}$ и потенциала пика от $\ln(\nu^{1/2})$ в диапазоне

скоростей развертки от 10 до 200 мВ/с (рисунок 9). Линейная зависимость тока пика от $v^{1/2}$ характерна для обратимых и необратимых процессов (рисунок 9 а).

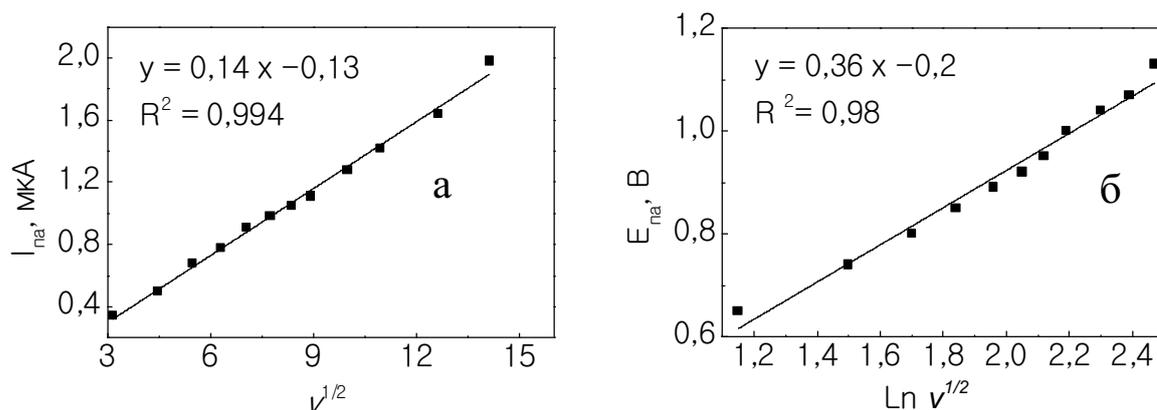


Рисунок 9 – Зависимости интенсивности тока электроокисления NO_2^- от скорости $v^{1/2}$ (а) и потенциала электроокисления от $\ln(v^{1/2})$ (б). $C = 5,0$ мкмоль/дм³

Линейная зависимость потенциала пика электроокисления нитрит-ионов от $\ln(v^{1/2})$ со смещением потенциала в положительную область указывает на необратимость процесса (рисунок 9 б).

Таким образом, смещение потенциала пика в положительную область при увеличении скорости развертки и линейность зависимости потенциала пика от натурального логарифма квадратного корня скорости развертки указывают на необратимый характер процесса.

Согласно вышеизложенным фактам, предполагаемый механизм окисления нитрит-ионов на поверхности ГМЭ в водных средах следующий:



Указанный механизм хорошо согласуется с литературными данными [131,149].

3.4 Исследование влияния адсорбционной составляющей на процесс электроокисления нитрит-ионов на модифицированном электроде

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 (рисунок 10 а). Нелинейность данной зависимости указывает на то, что адсорбция не является лимитирующей стадией

электродного процесса. Логарифмическая зависимость интенсивности тока от скорости развертки потенциала (рисунок 10 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.

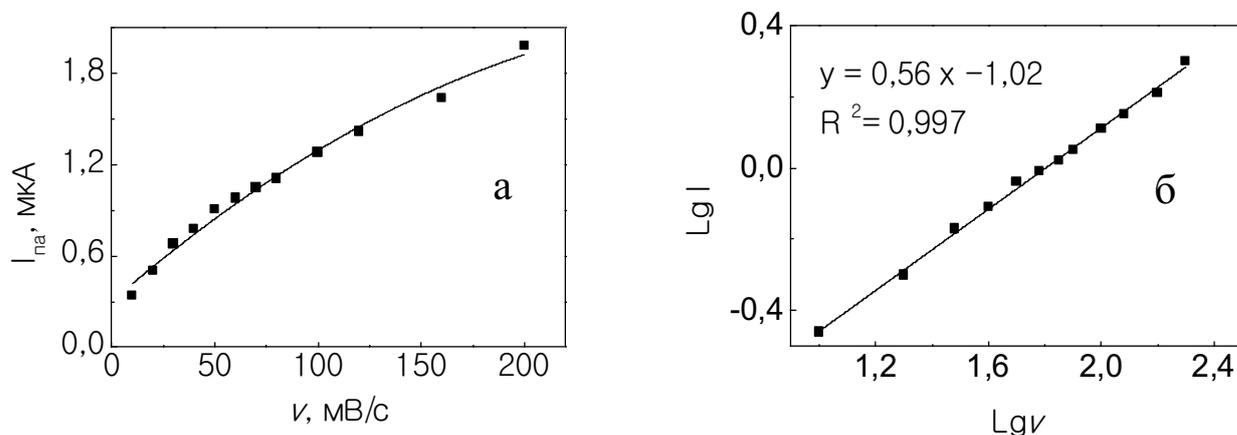


Рисунок 10 – Зависимость интенсивности тока окисления NO_2^- от скорости развертки потенциала в буферном растворе БР (рН 4,02) на ГМЭ при $E_{\text{нак}} = 0,4 \text{ В}$.

$$C(\text{NO}_2^-) = 5,0 \text{ мкмоль/дм}^3$$

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 $E_{\text{нак}} = 0,4 \text{ В}$, $t_{\text{нак}} = 4 \text{ с}$. Вольтамперограммы снимали в режиме первой производной постоянно-токовой анодной вольтамперометрии при скорости развертки потенциала 100 мВ/с. Данные были представлены и опубликованы в работе [150].

ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВОССТАНОВЛЕНИЯ SNAP

4.1 Оценка электрохимических свойств SNAP

В качестве стандартного вещества для исследований электрохимических свойств S-нитрозотиолов был взят SNAP. SNAP или S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин относится к классу S-нитрозотиолов и может выступать в качестве субстрата NO [151]. Структурная формула S-Нитрозо-N-ацетилпенициллина представлена на рисунке 3.

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

Как следует из полученных циклических вольтамперограмм (рисунок 11), SNAP может быть электрохимически восстановлен на поверхности модифицированного импрегнированного графитового электрода, давая необратимую катодную волну при потенциале $-0,58$ В (отн. Ag/AgCl). Анодного пика при этом не наблюдалось.

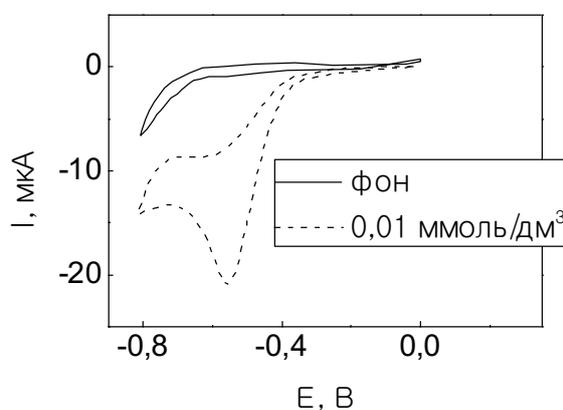


Рисунок 11 – ЦВА SNAP на ГМЭ в ФБ растворе с рН 7,4; $\nu = 80$ мВ/с

Полученный на графитовом модифицированном электроде пик обусловлен прямым электрохимическим восстановлением связи S–NO, что подтверждается литературными данными [140]. Для подбора условий определения SNAP на графитовом модифицированном электроде использовали катодную

вольтамперометрию в режиме инверсии, позволяющую фиксировать высоту катодного тока в области положительных значений.

4.2 Влияние pH фонового электролита на электровосстановление SNAP

На основании источников, описанных в литературном обзоре, можно сделать вывод, что предыдущие электрохимические исследования нитрозотиолов проводились в основном при pH 7,4. В данной работе было изучено электровосстановление SNAP также в кислой и щелочной средах.

В таблице 3 приведены значения потенциала пика электровосстановления SNAP на графитовом электроде, модифицированном углеродными чернилами 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 3 – 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 (рисунок 12). Из графика зависимости потенциала пика от кислотности среды (рисунок 12) по пересечению прямолинейного участка с осью x можно определить рКа SNAP, равную 7 [152].

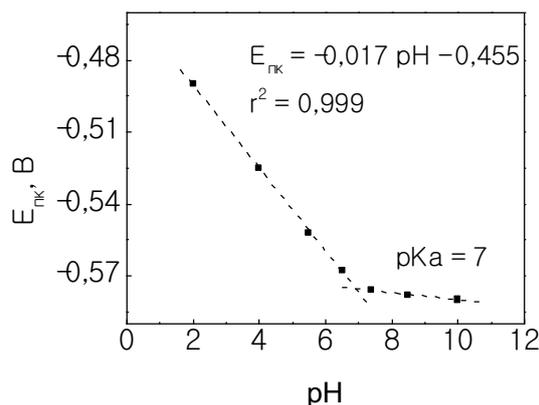
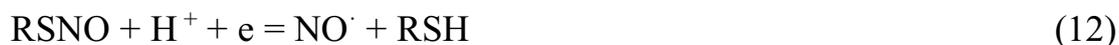


Рисунок 12 – Зависимость потенциала пика электровосстановления SNAP от pH среды фонового электролита. $C(\text{SNAP}) = 1$ ммоль/дм³

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 нитрозотиолов 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 (рисунок 13). Это связано с плохой стабильностью SNAP при высоком pH, поэтому в нейтральной среде наблюдается сигнал восстановления с максимальной интенсивностью.

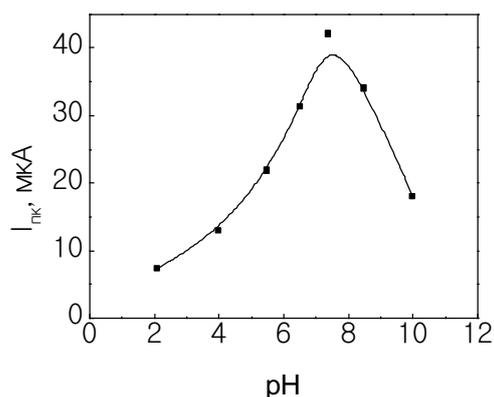


Рисунок 13 – Зависимость интенсивности тока электровосстановления SNAP от pH на ГМЭ. $C(SNAP) = 1$ ммоль/дм³; $\nu = 80$ мВ/с

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

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

Основной задачей при разработке методики количественного определения вещества является подбор оптимальных условий для процесса его окисления и/или восстановления. Для установления влияния потенциала накопления на сигнал восстановления SNAP исследовали область значений потенциала в диапазоне от 0 до $-0,8$ В (рисунок 14) в ФБ при pH 7,4 и времени накопления 30 с.

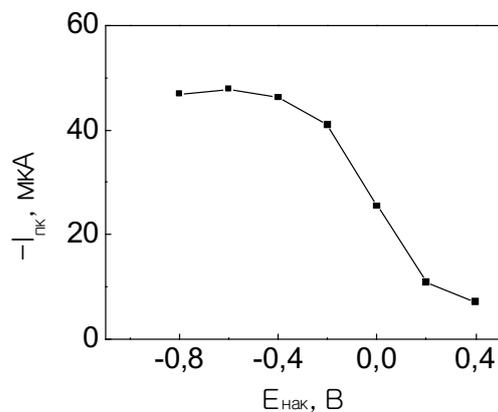


Рисунок 14 – Зависимость интенсивности тока электровосстановления SNAP от потенциала накопления на ГМЭ в ФБ растворе (pH 7,4).

$$C(SNAP) = 1 \text{ ммоль/дм}^3; \nu = 80 \text{ мВ/с}$$

Установлено, что значение тока достигает максимума при потенциале $-0,6$ В, а при более положительных потенциалах интенсивность сигнала значительно уменьшается.

Далее исследовали влияние времени накопления на сигнал электровосстановления при потенциале накопления $-0,6$ В. Как видно из рисунка 15, после накопления более 20 с интенсивность сигнала изменяется незначительно, однако после накопления более минуты происходит уменьшение интенсивности, что предположительно связано с низкой стабильностью нитрозотиола.

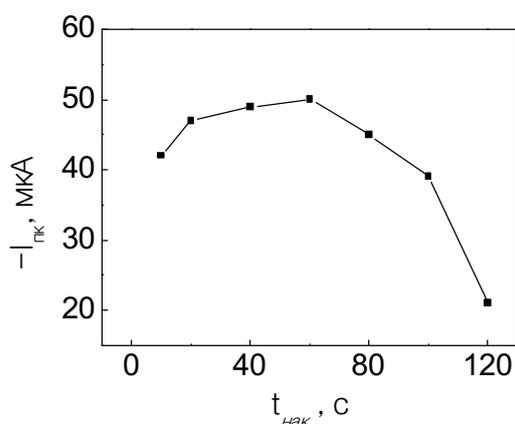


Рисунок 15 – Зависимость интенсивности тока электровосстановления SNAP от времени накопления на ГМЭ в ФБ растворе (pH 7,4).

$$C(\text{SNAP}) = 1 \text{ ммоль/дм}^3; \nu = 80 \text{ мВ/с}$$

Таким образом, установлены параметры накопления: время 30 с, потенциал $-0,6$ В.

4.4 Исследование механизма восстановления SNAP на модифицированном электроде

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

получены при $0,5 \text{ мкмоль/дм}^3$ SNAP, pH 7,4 потенциале накопления $-0,6 \text{ В}$ и времени накопления 30 с , но при разной скорости сканирования потенциала.

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 (рисунок 16).

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.

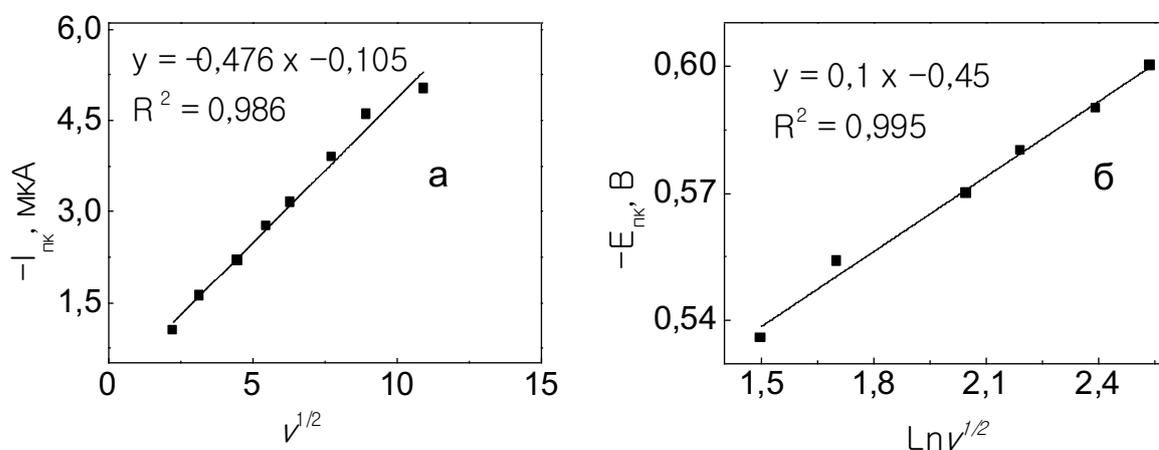


Рисунок 16 – Зависимости интенсивности тока электровосстановления SNAP от скорости $v^{1/2}$ (а) и потенциала электровосстановления от $\ln(v^{1/2})$ (б).

$$C(\text{SNAP}) = 0,5 \text{ мкмоль/дм}^3$$

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 $\ln|I_{red}|$ от потенциала пика) по формуле:

$$\text{Наклон} = \frac{\alpha F}{RT} \quad (13)$$

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:

$$|E_{\text{п}} - E_{\text{п}/2}| = \frac{47,7}{\alpha n}; [\text{мВ}] \quad (14)$$

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 рН 7,4 на графитовом модифицированном электроде на примере SNAP:



Полученные результаты согласуются с литературными данными [100,153,154]. Однако, полученная из литературы информация по механизму электровосстановления нитрозотиолов скудна и достаточно противоречива. Например, описаны одно-, двух- и трехэлектронные механизмы электровосстановления нитрозотиолов [100,153,154]. Это объясняется условиями проведения эксперимента, а также побочными реакциями, которые могут происходить в одно и то же время.

4.5 Влияние адсорбционной составляющей на электровосстановление SNAP

При разработке методики также была проведена оценка влияния адсорбционной составляющей на процесс восстановления SNAP на модифицированном графитовом электроде (рисунок 17).

Адсорбционная составляющая вносит значительный вклад при восстановлении/окислении веществ, если: зависимость интенсивности тока восстановления вещества от скорости сканирования потенциала линейна и

значение критерия Семерано (тангенс угла наклона зависимости $\lg I$ от $\lg v$) больше либо равен 0,5.

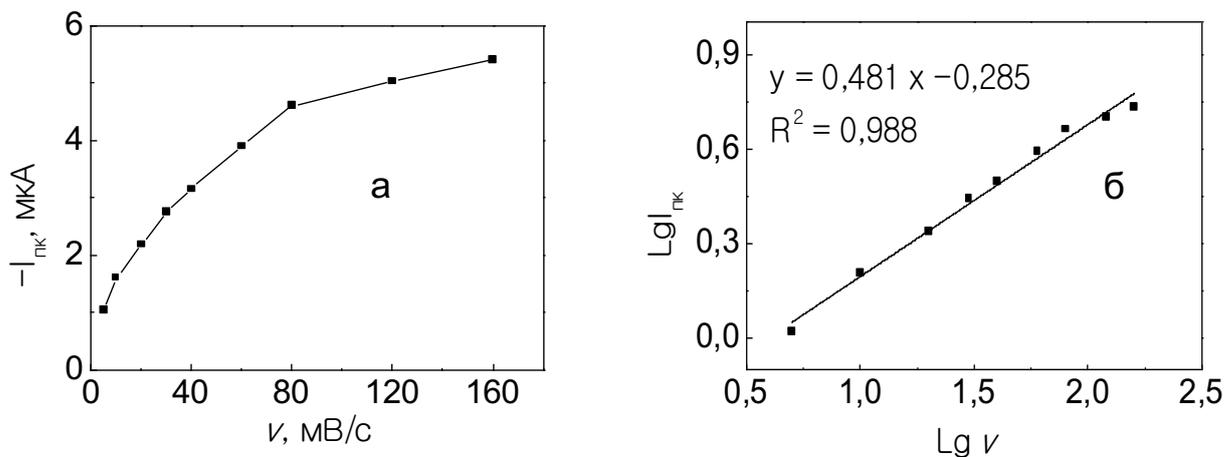


Рисунок 17 – Зависимость интенсивности тока электровосстановления SNAP от скорости развертки (а) и логарифмическая зависимость интенсивности тока от скорости развертки (б). $C(SNAP) = 0,5$ $\mu\text{моль/дм}^3$

Из полученной и представленной на рисунке 17 а нелинейной зависимости тока от скорости развертки и найденному критерию Семерано (рисунок 17 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 $-0,57$ В в среде с рН 7,4. Лимитирующей стадией процесса является электрохимическая реакция.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТ-ИОНОВ И НИТРОЗОТИОЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

5.1 Вольтамперометрическое определение нитрит-ионов на ГМЭ

Для достижения постоянного, воспроизводимого фона перед началом эксперимента ГМЭ подвергался электрохимической очистке путем сканирования восемь раз в диапазоне от 0,4 В до 1,2 В при использовании анодной линейной вольтамперометрии в режиме производной первого порядка.

В соответствии с подобранными ранее условиями, вольтамперограммы электроокисления нитрит-ионов снимали в растворе БР при рН 4,02 и скорости сканирования 100 мВ/с. Тем не менее, метод достаточно надежен, чтобы дать воспроизводимые результаты при рН $4,0 \pm 0,1$. Параметры накопления были следующими: $E_{\text{нак}} = 0,4$ В, $t_{\text{нак}} = 4$ с.

Калибровочные кривые NO_2^- были построены в диапазоне концентраций от 2 до 9 мкмоль/дм³ (рисунок 18) с соответствующим уравнением регрессии $y = 0,768x - 0,048$ $x - 0,048$. Рассчитанный предел обнаружения ($S/N = 3$) составил 0,38 мкмоль/дм³.

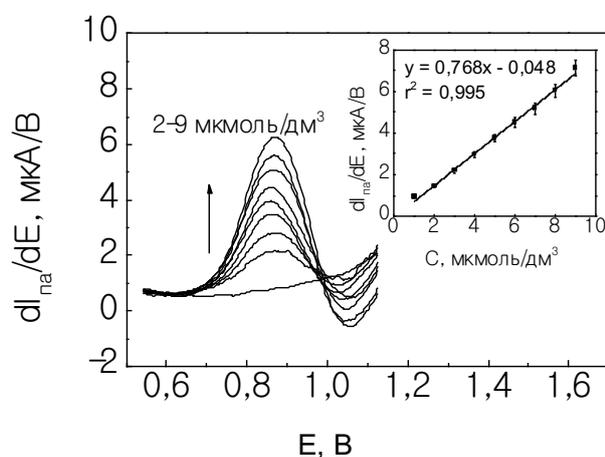


Рисунок 18 – Анодные вольтамперограммы NO_2^- в диапазоне концентраций
2–9 мкмоль/дм³ в буфере БР рН 4,02. $\nu = 100$ мВ/с

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 по сравнению с ранее опубликованными работами (таблица 2).

Несмотря на то, что было установлено участие адсорбции при электроокислении нитрит-ионов на ГМЭ, сделан вывод, что это не мешает проводить количественную оценку в указанном диапазоне концентраций, так как градуировочная зависимость носит линейный характер.

При анализе реальных объектов, перед каждым экспериментом поверхность электрода очищали и наносили модификатор по методике, представленной в пункте 2.4.

5.2 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-глутамин.

Аликвоту исследуемого компонента (50 мкл) добавляли в электрохимическую ячейку, содержащую 10 см^3 3 мкмоль/дм^3 раствора с нитрит-ионами в буферном растворе БР с pH 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 4.

Таблица 4 – 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.

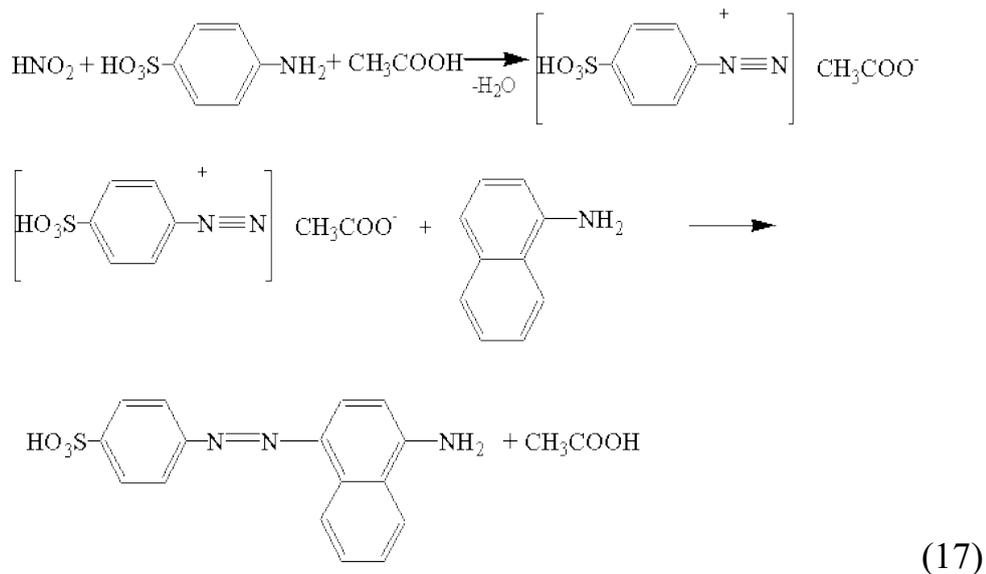
На основании проведенных исследований для вольтамперометрического определения нитрит-ионов в биологических жидкостях пробоподготовку анализируемых образцов проводили по следующей методике: к 1 см³ слегка окрашенной исследуемой надклеточной жидкости макрофагов добавляли 1 см³ 20 % трихлоруксусной кислоты 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.

5.3 Определение нитрит-ионов методом спектрофотометрии

При разработке новых методик определения веществ необходимым условием является проведение сравнительных испытаний с уже существующими методиками. В данном случае наиболее распространенным методом определения

нитрит-ионов, несмотря на его невысокую чувствительность (2 мкмоль/дм³), является спектрофотометрический метод [155].

Метод заключается в проведении химической реакции нитрита в кислой среде с ароматическими аминами в две стадии, в результате чего образуется фиолетовый азокраситель (реакция Грисса) (реакция 17), спектр которого затем фиксируется.



Пробоподготовка образцов для спектрофотометрического определения проводилась аналогично пробоподготовке для вольтамперометрического определения нитрит-ионов. Спектр анализируемого вещества снимали в диапазоне длин волн 450-700 нм и регистрировали максимум поглощения при 520 нм (рисунок 19).

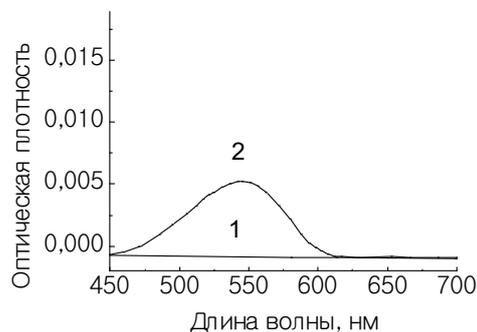


Рисунок 19 - Спектр поглощения нитрит-ионов: 1 – растворитель (H₂O), 2 –раствор нитрит-ионов C = 5 мкмоль/дм³. Длина оптического – пути 1 см

Для построения градуировочной зависимости готовили стандартные растворы нитрит-ионов объемом 50 см^3 в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкмоль/дм³. Полученная зависимость сохраняла свою линейность в диапазоне концентраций от 5 до 15 мкмоль/дм³ и описывалась уравнением $A=0,039 C + 0,082$ ($R^2 = 0,995$). Предел обнаружения 2 мкмоль/дм³. Далее в каждую колбу со стандартным раствором добавляли 2 см³ реактива Грисса и перемешивали. Через 30-40 минут измеряли оптическую плотность растворов относительно холостой пробы на спектрофотометре Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis при времени интеграции 1 с, спектральной пропускной способности канала 2 нм, шаге сканирования 0,1 с.

Концентрацию нитрит-ионов в растворе определяли по градуировочному графику. Подход использовали в качестве метода сравнения для определения нитрит-ионов в надклеточной жидкости макрофагов, выделенных из моноцитов периферической крови человека.

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

Общая схема оценки функционального статуса макрофагов представлена на рисунке 20 и описана в работе [156].

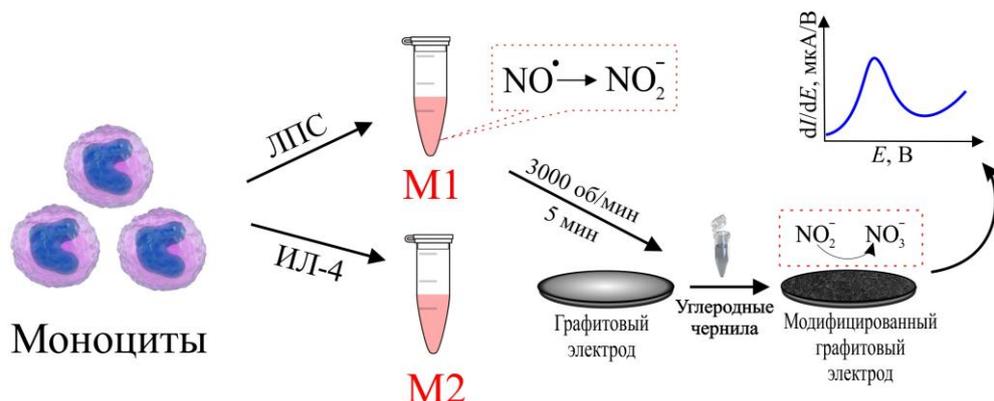


Рисунок 20 – Общая схема оценки функционального статуса макрофагов через определение концентрации нитрит-ионов в супернатантах клеточных культур

Количественное определение нитрит-ионов проводилось методом стандартной добавки (рисунок 21). Время анализа одного образца составляло менее 20 минут, включая подготовку образца. Пик окисления NO_2^- был зарегистрирован при потенциале +0,89 В.

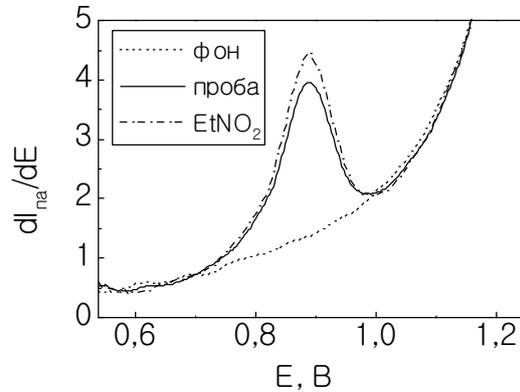


Рисунок 21 – Анодные вольтамперограммы исследуемого образца супернатанта клеточных культур, соответствующие окислению NO_2^- на ГМЭ в БР с рН 4,02, до и после добавки $0,05 \text{ мкмоль/дм}^3 \text{ NO}_2^-$; $\nu = 100 \text{ мВ/с}$

Данные по оценке количественного содержания нитрит-ионов в супернатантах клеточных культур вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами представлены в таблице 5.

Таблица 5 – 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

Продолжение таблицы 5

5	фон	98,4 ± 5,9	94,7 ± 7,6	2,04
	M1	124,9 ± 7,4	128,9 ± 6,5	2,30
	M2	97,3 ± 2,1	96,8 ± 2,9	1,99
6	фон	65,5 ± 5,1	61,1 ± 4,8	1,05
	M1	119 ± 16	105 ± 12	2,13
	M2	37,3 ± 5,3	31,4 ± 4,6	1,41
7	фон	81,4 ± 6,7	76,2 ± 6,5	1,65
	M1	177,6 ± 8,9	182 ± 11	1,23
	M2	71,0 ± 7,8	65,0 ± 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 M1 макрофагов. Данный подход может быть использован для дифференциации не стимулированных M1-поляризованных макрофагов от макрофагов, поляризованных по M2-типу.

5.5 Вольтамперометрическое определение нитрозотиолов на ГМЭ

Как уже было сказано, S-нитрозотиолы являются донорами NO и могут обеспечивать дополнительное образование NO в физиологических системах через различные пути разложения (термический, фотолиз, каталитическое восстановление ионов металлов и т.д.). Понимание того, как регулируется сигнал S-нитрозилирования, и разработка новых терапевтических средств, основанных на S-нитрозилировании, приводит к новым возможностям для модулирования эффектов NO при различных заболеваниях. Поэтому определение нитрозотиолов как субстратов образования NO в организме, имеет большое значение.

Подбор рабочих условий определения нитрозотиолов описан в главе 4. Съемку вольтамперограмм проводили на ТА-2 при использовании катодной вольтамперометрии в режиме производной первой порядка в ФБ растворе с pH 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.

Первым этапом получали воспроизводимую фоновую кривую в диапазоне потенциалов от 0 В до –1 В.

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.

Калибровочная зависимость была построена в диапазоне концентраций от 0,2 до 2,5 мкмоль/дм³ (рисунок 22) 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.

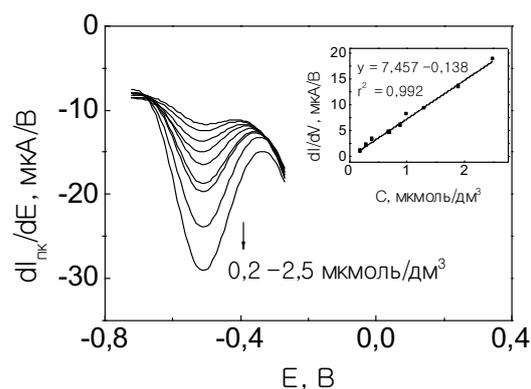


Рисунок 22 – Катодные вольтамперограммы и градуировочная зависимость SNAP в диапазоне концентраций 0,2–2,5 мкмоль/дм³ в ФБ с pH 7,4 и 0,1 моль/дм³ ЭДТА

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.

5.6 Определение S-нитрозотиолов методом флуориметрии

В качестве метода сравнения при определении нитрозотиолов в биологических жидкостях использовали флуориметрию [157]. Метод позволяет количественно определять S-NO, через NO, полученный при разложении связи S–NO под воздействием УФ-излучения. Образованный NO детектируется спектрофлуориметрически с использованием NO-детектирующего флуоресцентного красителя диаминородамина-4М (ДАР-4М).

Пробоподготовку биологической жидкости проводили в соответствии с процедурой, описанной в пункте 2.8. Затем подготовленные образцы биологической жидкости и их холостые пробы анализировали в спектрофлуориметре с возбуждением 560 нм и длиной волны излучения 575 нм. По разнице между сигналом флуоресценции образца и его соответствующей холостой пробы находили количество RSNO из градуировочной зависимости стандартного SNAP. Для построения градуировочной зависимости готовили стандартные растворы SNAP в диапазоне концентраций 1 – 50 мкмоль/дм³.

5.7 Определение нитрозотиолов в биологических жидкостях

Для того чтобы продемонстрировать практическое применение разработанного вольтамперометрического метода обнаружения нитрозотиолов на ГМЭ, проводили измерение их уровней в разбавленных образцах свежей крови, которую отбирали и пробоподготавливали по методике, описанной в пункте 2.7. 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. Подобные вольтамперометрические отклики наблюдались во многих экспериментах со свежей кровью. Результаты, полученные при анализе объектов представлены в таблице 6.

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

Номер пробы	Концентрация нитрозотиолов, мкмоль/дм ³		$t_{\text{экс}}$
	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 [158]. Как уже было продемонстрировано выше, данный метод можно применить для оценки относительных уровней RSNO в физиологических 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.

5.8 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики определения нитрит-ионов на ГМЭ

Благодаря ряду преимуществ, такие как высокая чувствительность, простота исполнения, экспрессность и возможность минитюаризации, электрохимические методы анализа имеют широкое применение среди других аналитических подходов.

Полученный пик электроокисления нитрит-ионов в модельных растворах на ГМЭ может применяться в качестве аналитического сигнала для разработки методики количественного определения нитрит-ионов в надклеточных жидкостях макрофагов методом вольтамперометрии.

Для разработки указанной методики в качестве аналитического сигнала был использован сигнал электроокисления нитрит-ионов при $E = +0,89$ В.

Зависимость интенсивности тока от концентрации сохраняла линейность в диапазоне от 1 до 9 мкмоль/дм³ с соответствующим уравнением регрессии $y = 0,768x - 0,048$ ($R^2 = 0,995$).

Указанный интервал соответствует концентрациям определения нитрит-ионов в образцах надклеточных жидкостей макрофагов после пробоподготовки. Предел обнаружения ($S/N = 3$) составляет 0,38 мкмоль/дм³.

Для оценки адекватности описания процесса уравнением регрессии необходимо построить таблицу зависимостей тока окисления нитрита от его концентрации (таблица 7):

Таблица 7 – Зависимость высоты тока электроокисления нитритов от его концентрации в растворе

№	C, мкмоль/дм ³	I _{1i} , мкА	I _{2i} , мкА	I _{3i} , мкА	I _{сп} , мкА	$\Sigma(I_i - I_{сп})^2$
1	1	0,64	0,99	1,17	0,93	0,15
2	2	0,93	1,35	2,03	1,45	0,62
3	3	1,74	2,40	2,47	2,20	0,32
4	4	2,80	3,12	2,99	2,97	0,05
5	5	3,68	3,41	4,14	3,74	0,27
6	6	3,86	4,47	5,16	4,50	0,85
7	7	4,37	5,81	5,35	5,18	1,08
8	8	5,60	6,10	6,46	6,07	0,37
9	9	6,28	7,05	8,14	7,13	1,75
						5,46

Расчитываем дисперсию воспроизводимости по формуле:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\sum(I_i - I_{\text{ср}})^2}{N(n-1)} = \frac{5,46}{9(3-1)} = 0,30 \quad (18)$$

Где N – число экспериментальных точек

n – число параллельных определений

Далее оцениваем адекватность модели (таблица 8), основываясь на данных, представленных в таблице 7, где I^* – значения токов, вычисленные по уравнению регрессии $y = 0,768c - 0,048$.

Таблица 8 – Зависимость высоты тока электроокисления нитритов от его концентрации в растворе по уравнению регрессии

№	C , мкмоль/дм ³	$I_{\text{ср}}$, мкА	I^* , мкА	$(I^* - I_{\text{ср}})$, мкА	$(I^* - I_{\text{ср}})^2$, мкА
1	1	0,93	0,72	-0,21	0,044
2	2	1,45	1,49	0,038	0,001
3	3	2,20	2,26	0,056	0,003
4	4	2,97	3,02	0,054	0,003
5	5	3,74	3,79	0,052	0,003
6	6	4,50	4,56	0,060	0,004
7	7	5,18	5,33	0,150	0,022
8	8	6,07	6,10	0,026	0,0007
9	9	7,13	6,86	-0,27	0,071
					0,151

После этого проводится оценка дисперсии адекватности по формуле:

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{n \cdot \sum(I^* - I_{\text{ср}})^2}{N - k} = \frac{3 \cdot 0,151}{9 - 1} = 0,057 \quad (19)$$

Где n – число параллельных опытов

N – число экспериментальных точек

k – число независимых переменных

Далее находим экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_{\text{ад}}^2}{S_{\text{вос}}^2} = \frac{0,057}{0,30} = 0,19 \quad (20)$$

Находим табличное значение критерия Фишера для числа степеней свободы $(1-P) = (1 - 0,95) = 0,05$ и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 9 - 1 = 8 \quad (21)$$

$$f_2 = n(N-1) = 9(3-1) = 18 \quad (22)$$

$$F_{0,05,f_1,f_2} = 2,51 \quad (23)$$

Таким образом, поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше табличного:

$$0,19 < 2,51 \quad (24)$$

полученная модель описывает процесс адекватно.

Правильность предложенной методики количественного определения нитритов в модельных растворах проверялась с использованием метода «введено-найдено» (таблица 9).

Следовательно, оптимальные условия эксперимента, позволяют применять аналитический сигнал электроокисления нитритов в модельных растворах для разработки методики количественного определения нитритов в биологических объектах.

Таблица 9 – Результаты количественного определения нитрит-ионов в модельных средах ($P = 0,95$, $n = 3$)

Введено, С, мкмоль/дм ³	Найдено, С, мкмоль/дм ³	ϵ , %
1	1,18	18,0
2	1,74	13,0
3	3,33	11,0
4	3,78	5,5
5	4,76	4,8
6	6,38	6,3
7	7,89	12,7
8	8,66	8,3
9	9,87	9,7

Согласно представленным в таблице 9 данным, можно сделать вывод об удовлетворительности получаемых результатов по предлагаемой методике.

Кроме того, также была проведена оценка метрологических показателей методики, которая развернуто представлена в приложении А. В таблице 10 отражены основные характеристики, из которых следует, что при определении нитрит-ионов показатель точности в диапазоне концентраций 1 – 9 мкмоль/дм³ не

превышает 40 %, показатель повторяемости 15 %, промежуточной прецизионности 16 %.

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики определения нитрит ионов ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

Концентрация, мкмоль/дм ³	Показатель повторяемости, σ_r^* , %	Показатель промежуточной прецизионности, σ_{RL}^* , %	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

5.9 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики определения SNAP

Для разработки методики определения SNAP на ГМЭ в качестве аналитического сигнала был выбран пик восстановления с максимумом при $E = -0,57$ В полученный методом катодной вольтамперометрии в режиме первой производной в ФБ растворе с рН 7,4 и 0,1 моль/дм³ ЭДТА, при потенциале накопления $-0,6$ В, времени накопления 30 с.

Линейная зависимость тока от потенциала была получена в диапазоне от 0,2 до 2,5 мкмоль/дм³ 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. Первым этапом при оценки метрологических характеристик разработанной методики была проведена оценка адекватности полученной модели (таблица 11):

Таблица 11 – Зависимость высоты тока восстановления SNAP от его концентрации в растворе

№	C, мкмоль/дм ³	I _{1i} , мкА	I _{2i} , мкА	I _{3i} , мкА	I _{сп} , мкА	Σ(I _i – I _{сп}) ²
1	0,2	0,84	1,35	1,18	1,12	0,13
2	0,3	1,99	2,33	2,26	2,19	0,06
3	0,4	3,11	3,44	3,51	3,35	0,09
4	0,7	4,55	4,25	5,37	4,72	0,67
5	0,9	6,13	7,11	5,01	6,08	2,21
6	1,0	8,26	8,40	7,79	8,15	0,20
7	1,3	9,70	10,28	5,22	9,35	18,04
8	1,9	12,89	14,68	13,09	13,55	1,92
9	2,5	17,59	18,55	20,4	18,85	4,08
						27,42

Дисперсию воспроизводимости рассчитали по формуле 25.

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\Sigma(I_i - I_{\text{сп}})^2}{N(n-1)} = \frac{27,42}{9(3-1)} = 1,52 \quad (25)$$

где, N – число экспериментальных точек; n – число параллельных определений.

После этого оценили адекватность модели (таблица 12), основываясь на данные, представленные в таблице 11, где I* – значения токов, вычисленные по уравнению регрессии $y = 7,457c - 0,138$

Таблица 12 – Зависимость высоты тока пика SNAP от его концентрации в растворе

№	C, мкмоль/дм ³	I _{сп} , мкА	I*, мкА	(I* – I _{сп}), мкА	(I* – I _{сп}) ² , мкА
1	0,2	1,12	1,35	0,23	0,05
2	0,3	2,19	2,10	-0,09	0,01
3	0,4	3,35	2,84	-0,51	0,26
4	0,7	4,72	5,08	0,36	0,13
5	0,9	6,08	6,57	0,49	0,24
6	1,0	8,15	7,32	-0,83	0,69
7	1,3	9,35	9,56	0,21	0,04
8	1,9	13,55	14,03	0,48	0,23
9	2,5	18,85	18,50	-0,35	0,12
					1,78

После этого проводится оценка дисперсии адекватности по формуле:

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{n \cdot \Sigma(I^* - I_{\text{сп}})^2}{N - k} = \frac{3 \cdot 1,78}{9 - 1} = 0,67 \quad (26)$$

где, n – число параллельных опытов; N – число экспериментальных точек; k – число независимых переменных.

Далее находим экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{вос}^2} = \frac{0,67}{1,52} = 0,19 \quad (27)$$

Находим табличное значение критерия Фишера для числа степеней свободы $(1-P) = (1 - 0,95) = 0,05$ и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 9 - 1 = 8 \quad (28)$$

$$f_2 = n(N-1) = 9(3-1) = 18 \quad (29)$$

$$F_{0,05,f_1,f_2} = 2,51 \quad (30)$$

Таким образом, поскольку расчетное значение критерия Фишера меньше табличного:

$$0,44 < 2,51 \quad (31)$$

полученная модель описывает процесс адекватно.

Правильность предложенной методики количественного определения SNAP в модельных растворах проверялась с использованием метода «введено-найдено» (таблица 13).

Следовательно, оптимальные условия эксперимента, позволяют применять аналитический сигнал восстановления SNAP в модельных растворах для разработки методики количественного определения в биологических объектах.

Таблица 13 – Результаты количественного определения SNAP в модельных средах ($P = 0,95$, $n = 3$)

Введено, С, мкмоль/дм ³	Найдено, С, мкмоль/дм ³	ε, %
0,2	0,14	30,0
0,3	0,35	16,7
0,4	0,46	15,0
0,7	0,59	15,7
0,9	1,02	13,3
1,0	1,17	17,0
1,3	1,42	9,2
1,9	1,76	7,4
2,5	2,33	6,8

Согласно представленным в таблице 13 данным, можно сделать вывод об удовлетворительности получаемых результатов по предлагаемой методике.

Метрологические показатели методики вольтамперометрического определения нитрозотиолов на примере SNAP рассчитаны по алгоритму, представленному в приложении А. Обобщенные результаты метрологических характеристик для диапазона концентраций представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Метрологические характеристики методики определения нитрозотиолов ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

Концентрация, мкмоль/дм ³	Показатель повторяемости, σ_T^* , %	Показатель промежуточной прецизионности, $\sigma_{R,l}^*$, %	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

По полученным данным показатель точности диапазоне концентраций от 0,2 до 2,5 мкмоль/дм³ не превышает 38 %, показатель повторяемости 15 %, промежуточной прецизионности 16 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 $E_{\text{нак}} = 0,4 \text{ В}$, $t_{\text{нак}} = 4 \text{ с}$, $\nu = 100 \text{ мВ/с}$.

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 М1 и М2 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 (М1 или М2) 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 $E_{\text{нак}} = -0,6 \text{ В}$, $t_{\text{нак}} = 30 \text{ с}$, $\nu = 80 \text{ мВ/с}$. 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

NO – оксид азота

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

ЦНС – центральная нервная система

АТФ – аденозинтрифосфат

УНТ – углеродные нанотрубки

КТ – квантовые точки

ЭПР-спектроскопия – спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

ДИВ – дифференциально-импульсная вольтамперометрия

ХК – хронокулонометрия

ХСЭ – хлоридсеребряный электрод

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

ВОГ – восстановленный оксид графена

НЧ – наночастицы

ЦВА – циклическая вольтамперограмма

КВВ – квадратноволновая вольтамперометрия

RSNO – нитрозотиолы

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

МС – масс-спектрометрия

ЖХ – жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

SNAP – S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин

М-КСФ – Макрофагальный колониестимулирующий фактор

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ММТС – S-метилметантиосульфонат

ДАР-4М – диаминородамин-4М

ГМЭ – графитовый модифицированный электрод

ФБ – фосфатный буферный раствор

МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки

EtNO₂ – этилнитрит

ЛПС – липополисахарид

ИЛ-4 – интерлейкин

СКО – среднеквадратичное отклонение

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ГЭ – графитовый электрод

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ziegler-Heitbrock, L. Blood monocytes and their subsets in health and disease. Macrophages: biology and role in the pathology of diseases / L. Ziegler-Heitbrock. – New York: Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2014. – 603 p.
2. Galdiero, M. R. Polarized activation of macrophages. Macrophages: biology and role in the pathology of diseases / M. R. Galdiero, S. K. Biswas, A. Mantovani – New York: Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2014. – 603 p.
3. Galván-Peña, S. Metabolic reprogramming in macrophage polarization / S. Galván-Peña, L. A. J. O'Neill // Front. Immunol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–7.
4. Mills, C. D. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm / C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, A. M. Hill // J.Immunology. – 2000. – Vol. 164. P. 6166 – 6173.
5. Lee, M. Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase. Macrophages / M. Lee, K. Rey, K. Besler, C. Wang, J. Choy. Cham: Springer, 2017. – 376 p.
6. Palmer, L. A. S-Nitrosothiols signal hypoxia-mimetic vascular pathology / L. A. Palmer, A. Doctor, P. Chhabra, M. L. Sheram, V. E. Laubach, M. Z. Karlinsey, M. S. Forbes, T. Macdonald, B. Gaston // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117. – № 9. – P. 2592–2601.
7. Gow, A. S-Nitrosothiol measurements in biological systems / A. Gow, A. Doctor, J. Mannick, B. Gaston // J. Chromatogr. B. – 2007. – Vol. 851. – № 1–2. – P. 140–151.
8. Patel R. P. S-Nitrosothiols and Nitric Oxide Biology / R. P. Patel, S. Yuan, C. G. Kevil // Nitric Oxide: biology and pathobiology: third edition. Elsevier Inc., – 2017. – P. 45–56.
9. Arnold, W.P. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations / W. P. Arnold, C. K. Mittal // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74. – № 8. – P. 3203–3207.

10. Gruetter, C. A. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine / C. A. Gruetter, B. K. Barry, D. B. McNamara, D. Y. Gruetter, P. J. Kadowitz, L. Ignarro // *J. Cyclic Nucleotide Res.* – 1979. – Vol. 5. – № 3. – P. 211–224.
11. Gow, A.J. Immunohistochemical detection of S-nitrosylated proteins / A. J. Gow, C. W. Davis, D. Munson, H. Ischiropoulos // *Methods Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 279. – P. 167–172.
12. Furchgott, R. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of atrial smooth muscle / R. Furchgott, J. V. Zawadzki // *Nature.* – 1980. – Vol. 288. – P. 373–376.
13. Yetik-Anacak, G. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease / G. Yetik-Anacak, J. D. Catravas // *Vascul. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 45. – P. 268–276.
14. Palmer, R. M. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor / R. M. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada // *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – № 11. – P. 524–526.
15. Ignarro, L. J. Artery and vein is nitric oxide / L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R.E. Byrns, G. Chaudhuri // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – № Des. – P. 9265–9269.
16. Koshland, D. E. The molecule of the year / D. E. Koshland // *Science.* – 1992. – Vol. 258. – № 5090. – P. 1861–1861.
17. Calabrese, V. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity / V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, A. M. G. Stella // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – Vol. 8. – № 10. – P. 766–775.
18. Loscalzo, J. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system / J. Loscalzo, G. Welch // *Prog. Cardiovasc. Dis.* – 1995. – Vol. 38. – № 2. – P. 87–104.
19. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response / C. Bogdan // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – № 10. – P. 907–916.
20. Mount, P. F. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis

/ P. F. Mount, D. A. Power // *Acta Physiol.* – 2006. – Vol. 187. – № 4. – P. 433–446.

21. Yamamoto, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw / T. Yamamoto, N. Shimoyama, T. Mizuguchi // *Anesth. Analg.* – 1993. – Vol. 77. – P. 886–890.

22. Morley J. E. Nitric oxide is a central component in neuropeptide regulation of appetite / J. E. Morley, S. A. Farr, R. L. Sell, S. M. Hileman, W. A. Banks // *Peptides.* – 2011. – Vol. 32. – № 4. – P. 776–780.

23. Monti, J. M. Effects of L-arginine and SIN-1 on sleep and waking in the rat during both phases of the light-dark cycle / J. M. Monti, H. Jantos // *Life Sci.* – 2004. – Vol. 75. – № 17. – P. 2027–2034.

24. Lacerda, A. C. R. Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise / A. C. R. Lacerda, U. Marubayashi, C. C. Coimbra // *Brain Res. Bull.* – 2005. – Vol. 67. – № 1–2. – P. 110–116.

25. Dinerman, J. L. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity / J. L. Dinerman, T. M. Dawson, M. J. Schell, A. Snowman, S. H. Snyder // *Proc. Natl.* – 1994. – Vol. 91. – № 10. – P. 4214–4218.

26. Bon, C. L. M. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation / C. L. M. Bon, J. Garthwaite // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23. – № 5. – P. 1941–1948.

27. Stern, J. E. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration? / J. E. Stern // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 84. – № 2–3. – P. 197–215.

28. Contestabile, A. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation / A. Contestabile, E. Ciani // *Neurochem. Int.* – 2004. – Vol. 45. – № 6. – P. 903–914.

29. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – № 1. – P. 315–424.

30. Riccio, A. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons / A. Riccio, R. S. Alvania, B. E. Lonze, N. Ramanan, T. Kim, Y.

Huang, T. M. Dawson, S. H. Snyder, D. D. Ginty // *Mol. Cell.* – 2006. – Vol. 21. – № 2. – P. 283–294.

31. Wang, G. R. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase / G.-R. Wang, Y. Zhu, P. V. Halushka, T. M. Lincoln, M. E. Mendelsohn // *Proc. Natl.* – 1998. – Vol. 95. – № 9. – P. 4888–4893.

32. Garg, U. C. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells / U. C. Garg, A. Hassid // *J. Clin. Invest.* – 1989. – Vol. 83. – № 5. – P. 1774–1777.

33. Chen, L. Y. Oxidized LDL decreases L-Arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets / L. Y. Chen, P. Mehta, J. L. Mehta // *Circulation.* – 1996. – Vol. 93. – № 9. – P. 1740–1746.

34. Ignarro, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview / L. J. Ignarro // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 53. – № 4. – P. 503–514.

35. Lugnier, C. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel / C. Lugnier, T. Keravis, A. Eckly-Michel // *J. Physiol. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 50. – № 4. – P. 639–652.

36. Jones, M. L. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices / M. L. Jones, J. G. Ganopolsky, A. Labbé, C. Wahl, S. Prakash // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – № 2. – P. 401–407.

37. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells / C. Nathan // *FASEB J.* – 1992. – Vol. 6. № 2.

38. Kwak, J. Y. Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells / J. Y. Kwak, M. K. Han, K. S. Choi, I. H. Park, S. Y. Park, M. H. Sohn, U. H. Kim, J. R. McGregor, W. E. Samlowski, C. Y. Yim // *Cell. Immunol.* – 2000. – Vol. 203. – № 2. – P. 84–94.

39. Bogdan, C. The function of nitric oxide in the immune system. Handbook of experimental pharmacology / C. Bogdan. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000. P. 521.
40. Xu, W. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents / W. Xu, L. Liu, G. C. M. Smith, I. G. Charles // Nat. Cell Biol. – 2000. – Vol. 2. – № 6. – P. 339–345.
41. Majid, D. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function / D. Majid, L. G. Navar // Am. J. Hypertens. – 2001. – Vol. 14. – № 11. – P. S74–S82.
42. Lanas, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract / A. Lanas // Arthritis Res. Ther. – 2008. – Vol. 10. – № Suppl. 2. – P. 2–7.
43. Brown J. F. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells / J. F. Brown, A. C. Keates, P. J. Hanson, B. J. R. Whittle // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver physiol. – 1993. – Vol. 265. – № 3 – P. G418–422.
44. Wallace, J. L. New insights into prostaglandins and mucosal defence / J. L. Wallace, A. W. Tingley // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1995. – Vol. 9. – № 3. – P. 227–235.
45. Kubes, P. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion / P. Kubes, M. Suzuki, D. N. Granger // Proc. Natl. – 1991. – Vol. 88. – № 11. – P. 4651–4655.
46. Berg, A. Nitric oxide inhibits gastric acid secretion by increasing intraparietal cell levels of cGMP in isolated human gastric glands / A. Berg, S. Redeen, M. Grenegard, A. C. Ericson, S. E. Sjostrand // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2005. – Vol. 289. – № 6. – P. 1061–1067.
47. Lancaster, J. S. Nitric oxide-principles and actions / J. S. Lancaster. – California: Academic press inc, 1996. – 355 p.
48. Butler, A. R. The physiological role of nitric oxide / A. R. Butler, D. L. H. Williams // Chem. Society Rev. – 1993. – Vol. 22. № 4. – P. 233 – 241.
49. Граник, В. Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В. Г. Граник. М: Вузовская книга, 2015. – 360 с.

50. Butler, A. R. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective / A. R. Butler, F. W. Flitney, D. L. H. Williams // *Trends pharmacol. Sci.* – 1995. – Vol. 16. – № 1. – P. 18–22.
51. Gaston, B. Nitric oxide and thiol groups / B. Gaston // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1411. – № 2–3. – P. 323–333.
52. Thomas, D. D. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling / D. D. Thomas, L. A. Ridnour, J. S. Isenberg, W. Flores-Santana, D. A. Wink // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 45. – № 1. – P. 18–31.
53. Liu, X. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes / X. Liu, M. J. S. Miller, M. S. Joshi, D. D. Thomas, J. R. Lancaster // *Proc. Natl.* – 1998. – Vol. 95. – № 5. – P. 2175–2179.
54. Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application / H. Sies // *Am. J. Med.* – 1991. – Vol. 91. – № 3 C. – P. S31–S38.
55. Iverson, N. M. Nitric oxide sensors for biological applications / N. M. Iverson, E. M. Hofferber, J. A. Stapleton // *Chemosensors.* – 2018. – Vol. 6. – № 1.
56. Wardman, P. The importance of radiation chemistry to radiation and free radical biology (the 2008 silvanus thompson memorial lecture) / P. Wardman // *Br. J. Radiol.* – 2009. – Vol. 82. – № 974. – P. 89–104.
57. 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.
58. Forstermann, U. Nitric oxide synthase isozymes / U. Forstermann, E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, H. Kleinert // *Hypertension.* – 1994. – Vol. 23. – № 6. – P. 1121–1131.
59. Forstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Forstermann, W. C. Sessa // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33. – № 7. – P. 1–13.
60. Sun, J. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay / J. Sun, X. Zhang, M. Broderick, H. Fein // *Sensors.* – 2003. – Vol. 3. – № 8. – P. 276–284.
61. Hetrick, E. M. Analytical chemistry of nitric oxide / E. M. Hetrick, M. H.

Schoenfisch // *Annu. Rev. Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 2. – № 1. – P. 409–433.

62. Privett, B. J. Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements / B. J. Privett, J. H. Shin, M. H. Schoenfisch // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39. – № 6. – P. 1925–1935.

63. Haussmann, N. J. Nitric oxide and nitrite formation during degradation of N-nitrosoamines / N. J. Haussmann, J. Werringloer // *N-S. Arch. Pharmacol.* – 1985.

64. Zhang, Y. Nitric oxide detection with intracerebral microdialysis: Important considerations in the application of the hemoglobin-trapping technique / Y. Zhang, F. E. Samson, S. R. Nelson, T. L. Pazdernik // *J. Neurosci. Methods.* – 1996.

65. Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research / D. Tsikas // *J. Chromatography B.* – 2007. – Vol. 851. – № 1–2. – P. 51–70.

66. Bratton, C. Sulfanilamide determination / C. Bratton, E. K. Marshall // *J. Biol. Chem.* – 1939. – Vol. 128. – № 5. – P. 537–550.

67. Barkley, R. M. Aqueous nitrite ion determination by selective reduction and gas phase nitric oxide chemiluminescence / R. M. Barkley, R. E. Sievers, A. J. Dunham // *Anal. Chem.* – 1995. – Vol. 67. – № 1. – P. 220–224.

68. Michelakis, E. D. The measurement of NO in biological systems using chemiluminescence / E. D. Michelakis, S. L. Archer // *Methods Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 100. – P. 111–127.

69. Woldman, Y. Y. Detection of nitric oxide production in cell cultures by luciferin-luciferase chemiluminescence / Y. Y. Woldman, T. D. Eubank, A. J. Mock, N. C. Stevens, S. Varadharaj, J. Turco, M. A. Gavrilin, B. R. Branchini, V. V. Khramtsov // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 465. – № 2. – P. 232–238.

70. Woldman, Y. Y. Direct chemiluminescence detection of nitric oxide in aqueous solutions using the natural nitric oxide target soluble guanylyl cyclase / Y. Y. Woldman, J. Sun, J. L. Zweier, V. V. Khramtsov // *Free Rad. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47. – № 10. – P. 1339–1345.

71. Terai, T. A practical strategy to create near-infrared luminescent probes: conversion from fluorescein-based sensors / T. Terai, Y. Urano, S. Izumi, H. Kojima, T.

Nagano // *Chem. Commun.* – 2012. – Vol. 48. – № 23. – P. 2840–2842.

72. Hall, C. N. What is the real physiological NO concentration in vivo? / C. N. Hall, J. Garthwaite // *Nitric Oxide - Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 21. – № 2. – P. 92–103.

73. Li, H. Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells / H. Li, A. Wan // *Analyst.* – 2015. – Vol. 140. – № 21. – P. 7129–7141.

74. Pluth, M. D. Biochemistry of Mobile Zinc and Nitric Oxide Revealed by Fluorescent Sensors / M. D. Pluth, E. Tomat, S. J. Lippard // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – Vol. 80. – № 1. – P. 333–355.

75. Kasim, N. Neuronal nitric oxide synthase immunohistochemistry and 4,5-diaminofluorescein diacetate: Tools for nitric oxide research / N. Kasim, R. L. Branton, D. J. Clarke // *J. Neurosci. Methods.* – 2001. – Vol. 112. – № 1. – P. 1–8.

76. Räthel, T. R. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro / T. R. Räthel, J. F. Leikert, A. M. Vollmar, V. M. Dirsch // *Biol. Proced. Online.* – 2003. – Vol. 5. – № 1. – P. 136–142.

77. Leikert, J. F. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein / J. F. Leikert, T. R. Rathel, C. Muller, A M. Vollmar, V. M. Dirsch // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 506. – № 2. – P. 131–134.

78. Strijdom, H. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein / H. Strijdom, C. Muller, A. Lochner // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2004. – Vol. 37. – № 4. – P. 897–902.

79. Nagano, T. Bioimaging of nitric oxide / T. Nagano, T. Yoshimura // *Chem. Rev.* – 2002. – Vol. 102. – № 4. – P. 1235–1269.

80. Jourdeuil D. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide / D. Jourdeuil // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33. – № 5. – P. 676–684.

81. Uhlenhuth, K. Pitfalls and limitations in using 4,5-diaminofluorescein for evaluating the influence of polyphenols on nitric oxide release from endothelial cells / K. Uhlenhuth, P. Högger // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 52. – № 11–12. – P. 2266–

2275.

82. Zhang, X. Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-Diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid / X. Zhang, W.-S. Kim, N. Hatcher, K. Potgieter, L. L. Moroz, R. Gillette, J. V. Sweedler // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – № 50. – P. 48472–48478.

83. Gan, N. Spontaneous increases in the fluorescence of 4,5-diaminofluorescein and its analogs: their impact on the fluorometry of nitric oxide production in endothelial cells / N. Gan, T. Hondou, H. Miyata // *Biol. Pharm. Bull.* – 2012. – Vol. 35. – № 9. – P. 1454–1459.

84. Kim, J. H. Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release / J. H. Kim, L. Johannes, B. Goud, C. Antony, C. A. Lingwood, R. Daneman, S. Grinstein // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 95. – № 6. – P. 2997–3002.

85. Llopis, J. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins / J. Llopis, J. M. Mccaffery, A. Miyawaki, M. G. Farquhar, R. Y. Tsien // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – Vol. 95. – № 12. – P. 6803–6808.

86. Yang, Y. A highly selective low-background fluorescent imaging agent for nitric oxide / Y. Yang, S. K. Seidlits, M. M. Adams, V. M. Lynch, C. E. Schmidt, E. V. Anslyn, J. B. Shea // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – № 38. – P. 13114–13116.

87. Hilderbrand, S. A. Dirhodium tetracarboxylate scaffolds as reversible fluorescence-based nitric oxide sensors / S. A. Hilderbrand, M. H. Lim, S. J. Lippard // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126. – № 15. – P. 4972–4978.

88. Smith, R. C. Conjugated polymer-based fluorescence turn-on sensor for nitric oxide / R. C. Smith, A. G. Tennyson, M. H. Lim, S. J. Lippard // *Org. Lett.* – 2005. – Vol. 7. – № 16. – P. 3573–3575.

89. Chen, X. Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species / X. Chen, X. Tian, I. Shin, J. Yoon // *Chemical Society Reviews.* – 2011. – Vol. 40. – № 9. – P. 4783–4804.

90. Cunha, C. R. A. Biomedical applications of glyconanoparticles based on

quantum dots / C. R. A. Cunha, A. D. P. R. Oliveira, T. V. C. Firmino, D. P. L. A. Tenório, G. Pereira, L. B. Carvalho Jr., B. S. Santos, M. T. S. Correia, A. Fontes // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. – 2018. – Vol. 1862. – № 3. – P. 427–439.

91. Wang, S. Nitric oxide switches on the photoluminescence of molecularly engineered quantum dots / S. Wang, M.Y. Han, D. Huang // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131. – № 33. – P. 11692–11694.

92. Kim, J. H. The rational design of nitric oxide selectivity in single-walled carbon nanotube near-infrared fluorescence sensors for biological detection / J. H. Kim, D. A. Heller, H. Jin, P. W. Barone, C. Song, J. Zhang, L. J. Trudel, G. N. Wogan, S. R. Tannenbaum, M. S. Strano // *Nat. Chem.* – 2009. – Vol. 1. – № 6. – P. 473–481.

93. Dikalov, S. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues / S. Dikalov, B. Fink // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 396. – № 1998. – P. 597–610.

94. Бургова, Е. Н. Особенности продукции оксида азота при беременности и экспериментальной острой почечной недостаточности / Е. Н. Бургова, А. В. Мурашко, Л. Е. Мурашко, В. А. Сереженков, А. Ф. Ванин. *Биомедицинская химия*. – 2003. – В. 1. – С. 12–18.

95. Гайнутдинов, Х. Л. Исследование методом ЭПР-спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в организме крыс при гипокинезии / Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, В. С. Июдин, С. В. Юртаева, Г. Г. Яфарова, Р. И. Файзуллина, Ф. Г. Ситдинов // *Биофизика*. – 2013. – В. 2. – С. 276–280.

98. Hall, D. M. In vivo detection of nitric oxide and NO_x species using ex vivo electron paramagnetic resonance spectroscopy / D. M. Hall, C. R. Buettner, C. V. Gisolfi // *Microchem. J.* – 1997. – Vol. 56. – № 2. – P. 165–170.

99. Ding, L. Trends in cell-based electrochemical biosensors / L. Ding, D. Du, X. Zhang, H. Ju // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15. – № 30. – P. 3160–3170.

100. Li, C. M. Implantable electrochemical sensors for biomedical and clinical applications: progress, problems, and future possibilities / C. M. Li, H. Dong, X. Cao, J. H. T. Luong, X. Zhang // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14. – № 8. – P. 937–951.

101. Xu, Y. A reagentless nitric oxide biosensor based on the direct

electrochemistry of hemoglobin adsorbed on the gold colloids modified carbon paste electrode / Y. Xu, C. Hu, S. Hu // *Sensors Actuators, B.* – 2010. – Vol. 148. – № 1. – P. 253–258.

102. Peng, B. Reexamination of the direct electrochemical reduction of S-nitrosothiols / B. Peng, M. E. Meyerhoff // *Electroanalysis.* – 2013. – Vol. 25. – № 4. – P. 914–921.

103. Xu, T. Electrochemical sensors for nitric oxide detection in biological applications / T. Xu, N. Scafa, L. P. Xu, L. Su, C. Li, S. Zhou, Y. Liu, X. Zhang // *Electroanalysis.* – 2014. – Vol. 26. – № 3. – P. 449–468.

104. Munshi, A. S. Use of 3D printing and modular microfluidics to integrate cell culture, injections and electrochemical analysis / A. S. Munshi, C. Chen, R. S. Martin, A. D. Townsend // *Anal. Methods.* – 2018. – Vol. 10. – № 27. – P. 3364–3374.

105. Bai, G. R. Sonochemical and sustainable synthesis of graphene-gold (G-Au) nanocomposites for enzymeless and selective electrochemical detection of nitric oxide / R. G. Bai, K. Muthoosamy, M. Zhou, M. Ashokkumar, N. M. Huang, S. Manickam // *Biosens. Bioelectron.* – 2017. – Vol. 87. – P. 622–629.

106. Liu, Z. Sensitive electrochemical detection of nitric oxide based on AuPt and reduced graphene oxide nanocomposites / Z. Liu, H. Forsyth, N. Khaper, A. Chen, // *Analyst.* – 2016. – Vol. 141. – № 13. – P. 4074–4083.

107. Zhang, Q. In vivo reversal of doxorubicin resistance by (-)-epigallocatechin gallate in a solid human carcinoma xenograft / Q. Zhang, D. Wei, J. Liu // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 208. – № 2. – P. 179–186.

108. Pashai, E. An electrochemical nitric oxide biosensor based on immobilized cytochrome C on a chitosan-gold nanocomposite modified gold electrode / E. Pashai, G. N. Darzi, M. Jahanshahi, F. Yazdian, M. Rahimneja // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 108. – P. 250–258.

109. Huang, C. Flow injection measurements of S-nitrosothiols species in biological samples using amperometric nitric oxide sensor and soluble organoselenium catalyst reagent / C. Huang, E. Brisbois, M. E. Meyerhoff // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400. – № 4. – P. 1125–1135.

110. Tu, W. Noncovalent nanoassembly of porphyrin on single-walled carbon nanotubes for electrocatalytic reduction of nitric oxide and oxygen / W. Tu, J. Lei, H. Ju // *Electrochem. commun.* – 2008. – Vol. 10. – № 5. – P. 766–769.

111. Ha, Y. Measurements of location-dependent nitric oxide levels on skin surface in relation to acupuncture point / Y. Ha, M. Kim, J. Nah, M. Suh, Y. Lee // *Evidence-based complement. Altern. Med.* – 2012. – Vol. 2012.

112. Lee, Y. Simultaneous electrochemical detection of nitric oxide and carbon monoxide generated from mouse kidney organ tissues / Y. Lee, J. Kim // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79. – № 20. – P. 7669–7675.

113. Koh, W. C. A. A cytochrome C modified-conducting polymer microelectrode for monitoring in vivo changes in nitric oxide / W. C. A. Koh, Md. A. Rahmana, E. Sang Choeb, D. K. Leeb, Y-B. Shim // *Biosens. Bioelectron.* 2008. – Vol. 23. – № 9. – P. 1374–1381.

114. Chen, X. X. A novel amperometric sensor for the determination of nitric oxide, and its application in rat liver cells / X. X. Chen, Y. Wang, S. S. Hu // *Microchim. Acta.* – 2008. Vol. 161. – № 1–2. – P. 255–263.

115. Wang, Y. Nitric oxide sensor based on poly (p-phenylenevinylene) derivative modified electrode and its application in rat heart / Y. Wang, S. Hu // *Bioelectrochemistry.* – 2009. – Vol. 74. – № 2. – P. 301–305.

116. Peng, Y. In situ monitoring of nitric oxide release from rat kidney at poly(eosin b)-ionic liquid composite-based electrochemical sensors / Y. Peng, Y. Ji, D. Zheng, S. Hu // *Sensors Actuators, B.* – 2009. – Vol. 137. – № 2. – P. 656–661.

117. Kim, M. Y. Detection of nitric oxide from living cells using polymeric zinc organic framework-derived zinc oxide composite with conducting polymer / M. Y. Kim, M. H. Naveen, N. G. Gurudatt, Y. B. Shim // *Small.* – 2017. – Vol. 13. – № 26. – P. 1700502.

118. Zhao, L. A novel amperometric nitric oxide sensor based on imprinted microenvironments for controlling metal coordination / L. Zhao, S. Zhu, J. Zhou // *Sensors Actuators, B Chem.* – 2012. – Vol. 171–172. – P. 563–571.

119. Fei, J. Amperometric determination of nitric oxide at a carbon nanotube

modified electrode with redox polymer coating / J. Fei, S. Hu, K. K. Shiu // *J. Solid State Electrochem.* – 2011. – Vol. 15. – № 3. – P. 519–523.

120. Wang, F. Nitric oxide measurement in biological and pharmaceutical samples by an electrochemical sensor / F. Wang, X. Deng, W. Wang, Z. Chen // *J. Solid State Electrochem.* – 2011. – Vol. 15. – № 4. – P. 829–836.

121. Sivanesan, A. Highly sensitive electrochemical sensor for nitric oxide using the self-assembled monolayer of 1,8,15,22-tetraaminophthalocyanatocobalt(II) on glassy carbon electrode / A. Sivanesan, S. A. John // *Electroanalysis.* – 2010. – Vol. 22. – № 6. – P. 639–644.

122. Deng, X. A novel electrochemical sensor based on nano-structured film electrode for monitoring nitric oxide in living tissues / X. Deng, F. Wang, Z. Chen // *Talanta.* – 2010. Vol. 82. – № 4. – P. 1218–1224.

123. Musameh, M. M. Silk provides a new avenue for third generation biosensors: sensitive, selective and stable electrochemical detection of nitric oxide / M. M. Musameh, C. J. Dunn, M. H. Uddin, T. D. Sutherland, T. D. Rapson // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – Vol. 103. – P. 26–31.

124. Brown, M. D. Catalytic selectivity of metallophthalocyanines for electrochemical nitric oxide sensing / M. D. Brown, M.H. Schoenfish // *Electrochim. Acta.* – 2018. – Vol. 273. – P. 98–104.

125. Yoon, J. Electrochemical nitric oxide biosensor based on amine-modified MoS₂/graphene oxide/myoglobin hybrid / J. Yoon, J. W. Shin, J. Lim, M. Mohammadniaei, G. B. Bapurao, T. Lee, J. W. Choi // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2017. – Vol. 159. – P. 729–736.

126. Liu, Z. Sensitive electrochemical detection of nitric oxide release from cardiac and cancer cells via a hierarchical nanoporous gold microelectrode / Z. Liu, A. Nemeč-Bakk, N. Khaper, A. Chen // *Anal. Chem.* – 2017. – Vol. 89. – № 15. – P. 8036–8043.

127. Zhao, X. Fabrication of a flexible and stretchable nanostructured gold electrode using a facile ultraviolet-irradiation approach for the detection of nitric oxide released from cells / X. Zhao, K. Wang, B. Li, C. Wang, Y. Ding, C. Li, L. Mao, Y. Lin

// Anal. Chem. – 2018. – Vol. 90. – № 12. – P. 7158–7163.

128. Wang, Y. W. Stretchable and photocatalytically renewable electrochemical sensor based on sandwich nanonetworks for real-time monitoring of cells / Y. W. Wang, Y. L. Liu, J. Q. Xu, Y. Qin, W. H. Huang // Anal. Chem. – 2018. – Vol. 90. – № 10. – P. 5977–5981.

129. Manikandan, V. S. Simultaneous detection of hydrazine, sulfite, and nitrite based on a nanoporous gold microelectrode / V. S. Manikandan, Z. Liu, A. Chen // J. Electroanal. Chem. – 2018. – Vol. 819. – № July. – 2017. – P. 524–532.

130. Ghanei-Motlagh, M. A novel electrochemical sensor based on silver/halloysite nanotube/molybdenum disulfide nanocomposite for efficient nitrite sensing / M. Ghanei-Motlagh, M. A. Taher // Biosens. Bioelectron. – 2018. – Vol. 109. – P. 279–285.

131. Huang, S. S. Electrochemical sensor for nitrite using a glassy carbon electrode modified with gold-copper nanochain networks / S. S. Huang, L. Liu, L. P. Mei, J. Y. Zhou, F. Y. Guo, A. J. Wang, J. J. Feng // Microchim. Acta. – 2016. – Vol. 183. – P. 791–797.

132. Bagheri, H. Composite of Cu metal nanoparticles-multiwall carbon nanotubes-reduced graphene oxide as a novel and high performance platform of the electrochemical sensor for simultaneous determination of nitrite and nitrate / H. Bagheria, A. Hajianb, M. Rezaeic, A. Shirzadmehrc // J. Hazard. Mater. – 2017. – Vol. 324. – P. 762–772.

133. Liu, L. Enhanced His@AuNCs oxidase-like activity by reduced graphene oxide and its application for colorimetric and electrochemical detection of nitrite / L. Liu, J. Du, W. Liu, Y. Guo, G. Wu, W. Qi, X. Lu // Anal. Bioanal. Chem. – 2019. – Vol. 411. – P. 2189–2200.

134. Radhakrishnan, S. A highly sensitive electrochemical sensor for nitrite detection based on Fe₂O₃ nanoparticles decorated reduced graphene oxide nanosheets / S. Radhakrishnan, K. Krishnamoorthy, C. Sekar, J. Wilson, S. J. Kim // Appl. Catal. B Environ. – 2014. – Vol. – 148–149. – P. 22–28.

135. Kaminskaya, O. V. Simultaneous voltammetric determination of nitrites and

nitrites in waters / O. V. Kaminskaya, E.A. Zakharova, G.B. Slepchenko // *J. Anal. Chem.* – 2004. – Vol. 59. – № 11. – P. 1091–1096.

136. Foster, M. W. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective / M. W. Foster, D. T. Hess, J. S. Stamler // *Trends in Molecular Medicine.* – 2009. – Vol. 15. – № 9. – P. 391–404.

137. Bramanti, E. The determination of S-nitrosothiols in biological samples – Procedures, problems and precautions / E. Bramanti, V. Angeli, A. Paolicchi, A. Pompella // *Life Sciences.* – 2011. – Vol. 88. – № 3–4. – P. 126–129.

138. Rogers, S. C. Detection of human red blood cell-bound nitric oxide / S. C. Rogers, A. Khalatbari, P. W. Gapper, M. P. Frenneaux, P. E. James // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – № 29. – P. 26720–26728.

139. Stamler, J. S. Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives / J. S. Stamler, J. Loscalzo // *Anal. Chem.* – 1992. – Vol. 64. – № 7. – P. 779–785.

140. Mathews, W. R. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide / W. R. Mathews, S. W. Kerr // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1993. – Vol. 267. – № 3.

141. Tsikas, D. Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry III. Quantitative determination in human plasma after specific conversion of the S-nitroso group to nitrite by cysteine and Cu^{2+} via intermediate formation of S-nitrosocysteine and nitric oxide / D. Tsikas, J. Sandmann, J. C. Frölich // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – Vol. 772. – № 2. – P. 335–346.

142. Cha, W. Direct detection of S-nitrosothiols using planar amperometric nitric oxide sensor modified with polymeric films containing catalytic copper species / W. Cha, Y. Lee, B. K. Oh, M. E. Meyerhoff // *Anal. Chem.* – 2005. – Vol. 77. – № 11. – P. 3516–3524.

143. Giustarini, D. Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies/ D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne, R. Rossi // *Journal of Chromatography B.* – 2007. – Vol. 851. – № 1–2. – P. 124–139.

144. Tsikas, D. Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma

by high-performance liquid-chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde / D. Tsikas, J. Sandmann, D. Holzberg, P. Pantazis, M. Raida, J. C. Frolich // *Anal. Biochem.* – 1999. – Vol. 273. – № 1. – P. 32–40.

143. Showing compound ethyl nitrite [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://foodb.ca/compounds/FDB003266>.

144. РМГ 61-2010 Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки – М. : Стандартинформ, 2013. – 62 с.

145. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – М. : Стандартинформ, 2009. – 33 с.

146. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. – М. : Стандартинформ, 2009. – 50 с.

147. Липских, О. И. Вольтамперометрическое определение синтетических красителей в пищевых продуктах на углеродсодержащем модифицированном электроде: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Липских Ольга Ивановна. – Томск, 2017. – 137 с.

148. Koyun, O. Voltammetric determination of nitrite with gold nanoparticles/poly(methylene blue)-modified pencil graphite electrode: application in food and water samples / O. Koyun, Y. Sahin // *Ionics.* – 2018. – Vol. 24. – № 10. – P. 3187–3197.

149. Broder, T. L. Electrochemical oxidation of nitrite and the oxidation and reduction of NO₂ in the room temperature ionic liquid [C₂mim][NTf₂] / T. L. Broder, D. S. Silvester, L. Aldous, Ch. Hardacre, R. G. Compton // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111. – № 27. – P. 7778–7785.

150. Popova, V. A. Voltammetric determination of ethyl nitrite / V. A. Popova, A. A. Krivosheina, E. I. Korotkova // *Izv. Vyss. Uchebnykh Zaved. Seriya Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya.* – 2019. – Vol. 62. – № 12. – P. 9–12.

151. Zhang, Y. S-Nitrosothiols: Cellular formation and transport / Y. Zhang, N. Hogg // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2005. – Vol. 38. – № 7. – P. 831–838.
152. Lipskikh, O. I. Simultaneous voltammetric determination of Brilliant Blue FCF and Tartrazine for food quality control / O. I. Lipskikh, E. I. Korotkova, J. Barek, V. Vyskocil, M. Saqib, E. P. Khristunova // *Talanta*. – 2020. – Vol. – 218. P. 121136.
153. Hou, Y. Electrochemical studies of S-nitrosothiols / Y. Hou, J. Wang, F. Arias, L. Echegoyen, P. G. Wang // *Bioorganic Med. Chem.* – 1998. – Vol. 8. – № 21. – P. 3065–3070.
154. Soulère, L. Synthesis, electrochemical, and spectroscopic studies of novel S-nitrosothiols / L. Soulere, J. C. Sturm, L. J. Nunez-Vergara, P. Hoffmann, J. Periea // *Tetrahedron*. – 2001. – Vol. 57. – № 33. – P. 7173–7180.
155. Giustarini, D. Adaptation of the griess reaction for detection of nitrite in human plasma / D. Giustarini, I. Dalle-Donne, R. Colombo, A. Milzani, R. Rossi // *Free Radic. Res.* – 2004. – Vol. 38. – № 11. – P. 1235–1240.
156. 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.
157. Mito, P.T. Fluorimetric-based method to detect and quantify total S-Nitrosothiols (SNOs) in plant samples / P. T. Mito, A. Matiz, L. Freschi, F. J. Corpas // *Methods in molecular biology*. – 2020. – Vol. 2057. – P. 37–43.
158. Stamler, J. S. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin / J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singeli, C. R. Valerit, J. Loscalzo // *Proc. Natl.* – 1992. – Vol. 89, – № 16. – P. 7674–7677.

Приложение А

Оценка повторяемости и воспроизводимости методики анализа

Оценка показателя повторяемости методики анализа

Проводят следующие расчеты для определения показателя повторяемости. Для каждой серии рассчитывается среднее арифметическое результатов единичного анализа:

$$X_i = \frac{\sum X_{i,N}}{N}, \quad (32)$$

где N – число параллельных определений.

Затем рассчитывается выборочная дисперсия для каждой строки (серии):

$$S_i^2 = \frac{\sum (X_{i,n} - X_i)^2}{N-1} \quad (33)$$

По критерию Кохрена проверяют, можно ли пренебречь разбросом между сериями. Для всех дисперсий выбирается наибольшее значение S_{max}^2 , находят сумму всех дисперсий $\sum S_i^2$.

Находят расчетные значения критерия Кохрена:

$$G_{расч} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_i^2} \quad (34)$$

Сравнивают расчетное значение с табличным значением критерия Кохрена для числа степеней свободы $v=N-1$ и $f=1$ (1 - количество дисперсий, участвующих в расчетах) для $P=0,95$. Если $G_{расч} > G_{табл}$, то соответствующее значение S_{max}^2 исключают из дальнейших расчетов и процедуру повторяют до следующего по значению S_{max}^2 и т.д. до тех пор, пока $G_{расч}$ не станет меньше или равно $G_{табл}$. Неисключенные из расчетов S_i^2 считают однородными и по ним оценивают СКО, по которым можно установить одно значение показателя повторяемости для результатов, полученных по методике в конкретной лаборатории:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{L'}}, \quad (35)$$

где L' - количество серий, которое осталось после проверки серий на однородность. Это значение СКО повторяемости $\sigma^*_r = S_r$ есть первая, полученная в лаборатории характеристика.

Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности

Проводят расчет для оценивания второй характеристики, то есть для показателя внутрилабораторной прецизионности. Для этого рассчитывают общее среднее арифметическое значение по сериям:

$$X = \frac{\sum X_i}{L'} \quad (36)$$

Рассчитывают СКО в условиях промежуточной прецизионности:

$$S_{Rл} = \sqrt{\frac{\sum (X_{i,n} - X_i)^2}{L'-1}} \quad (37)$$

$\sigma^*_{R} = S_{R_L}$ есть значение показателя промежуточной прецизионности результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности.

Оценка систематической погрешности

Проводят оценивание систематической погрешности лаборатории при реализации методики. Для этого рассчитывают Θ – разность общего среднего значения в лаборатории и аттестованного значения образца (аттестованный раствор).

$$\Theta = X - C \quad (38)$$

Далее проверяют его значимость по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают $t_{\text{расч}}$ и сравнивают t табл.

$$t_{\text{расч}} = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_{R_L}^2}{L'} + \frac{\Lambda_0^2}{3}}} \quad (39)$$

$\frac{S_{R_L}^2}{L'}$ – дисперсия общего среднего результата

Λ_0 – погрешность аттестованного значения раствора

Полученное значение $t_{\text{расч}}$ сравнивают с $t_{\text{табл}}$ при числе степеней свободы $f = L' - 1$ для доверительной вероятности $P = 0,95$.

Если $t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$, значит систематическая погрешность Θ не значима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю и оценку систематической погрешности проводят по формуле:

$$\Delta_{в,с}^* = \Delta_{н,с}^* = |\Delta_c^*| = 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{R_L}^2}{L'} + \frac{\Lambda_0^2}{3}} = 1,96 \cdot \sigma_c^* \quad (40)$$

Где σ_c^* – среднеквадратичное отклонение не исключенной систематической погрешности лаборатории.

Если $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$, то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и ее надо учитывать при дальнейших расчетах:

$$\Delta_{с(в,н)}^* = \Theta \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{R_L}^2}{L'} + \frac{\Lambda_0^2}{3}} = \Theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^* \quad (41)$$

Рассчитав верхнюю и нижнюю границы систематической погрешности, выбирают максимальное по модулю значение $|\Delta_{\text{max}}^*| = |\Delta_{с,н}^*|, |\Delta_{с,в}^*| = \Delta_c^*$ и тогда можно записать:

$$\pm \Delta_c^* = \Theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^* \quad (42)$$

Оценка характеристики погрешности

Вычисляют последнюю величину, которая характеризует погрешность. Рассчитывают границы, в которых погрешность любого из совокупности результатов измерений, полученных при реализации методики, находится с принятой $P = 0,95$. Дисперсия погрешности формируется за счет дисперсий случайной и систематической погрешности.

Характеристику погрешности рассчитывают по формуле

$$\Delta_B^* = \Delta_H^* = |\Delta^*| = \Theta + 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma_{RЛ}^*)^2 + (\sigma_c^*)^2} \quad (43)$$

Оценка метрологических показателей вольтамперометрической методики развернуто показана на примере определения нитрит-ионов. Для расчета была выбрана прямолинейная область градуировочного графика (рисунок 23).

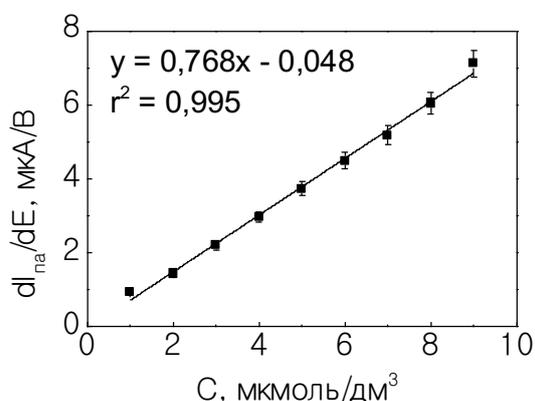


Рисунок 23 – Градуировочный график зависимости высоты аналитического сигнала нитрит-ионов от его концентрации в буферном растворе БР (рН 4,02) на ГМЭ

Расчет метрологических показателей для концентрации нитрит-ионов в электрохимической ячейке в диапазоне от 1,00 до 9,00 мкмоль/дм³.

А.1 Концентрация нитрит-ионов 1,00·мкмоль/дм³

Таблица 15 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 1,00·мкмоль/дм³

С _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm, мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		С _{ср}	С _{ср}
			С ₁	С ₂		
1,00	0,048	1	1,11	1,17	1,14	1,06
		2	1,16	0,920	1,04	
		3	1,07	0,950	1,01	
		4	1,23	0,910	1,07	
		5	1,29	1,28	1,29	
		6	1,07	0,960	1,02	
		7	1,31	0,905	1,11	
		8	1,23	0,982	1,11	
		9	1,34	0,960	1,15	
		10	1,02	0,940	0,980	
		11	1,12	0,910	1,02	
		12	0,930	1,12	1,03	
		13	1,17	0,930	1,05	

		14	0,980	0,860	0,920	
		15	1,02	1,07	1,05	

Таблица 16 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,002	0,082	0,227	0,471	0,155
0,029				
0,007				
0,051				
0,00005				
0,006				
0,082				
0,031				
0,072				
0,003				
0,022				
0,018				
0,029				
0,007				
0,001				

Таблица 17 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{\text{ср}}$	1,06
СКО воспроизводимости, $\sigma_{Rл}^* = S_{Rл}$	0,161

Таблица 18 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,064	1,29	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,097$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,393$$

Таблица 19 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,155	14,6	0,161	15,1	0,098	9,75	0,393	39,3

А.2 Концентрация нитрит-ионов 2,00·мкмоль/дм³

Таблица 20 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 2,00·мкмоль/дм³

C _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm, мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		C _{ср}	C̄ _{ср}
			C ₁	C ₂		
2,00	0,054	1	1,99	2,33	2,16	2,00
		2	1,87	2,12	2,00	
		3	1,79	1,89	1,84	
		4	2,06	1,91	1,99	
		5	1,96	1,94	1,95	
		6	2,01	2,07	2,04	
		7	2,03	1,93	1,98	
		8	2,15	1,89	2,02	
		9	2,21	1,98	2,10	
		10	1,83	2,09	1,96	
		11	1,91	2,01	1,96	
		12	1,92	1,99	1,96	
		13	2,01	1,87	1,94	
		14	1,89	1,93	1,91	
		15	2,22	2,12	2,17	

Таблица 21 – Расчет показателя повторяемости

ΣS ²	S ² _{max}	G _{расч}	G _{табл}	СКО повторяемости σ _r *=S _r
0,059	0,058	0,252	0,471	0,124
0,031				
0,005				
0,011				
0,0002				
0,002				
0,005				
0,034				
0,027				
0,034				
0,005				
0,003				
0,010				
0,001				
0,005				

Таблица 22 – Расчет показателя воспроизводимости методики

C̄ _{ср}	2,00
СКО воспроизводимости, σ _{RЛ} *=S _{RЛ}	0,128

Таблица 23 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,003	0,059	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,089$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,263$$

Таблица 25 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, мкмоль /дм ³	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль /дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль /дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,124	6,19	0,128	6,41	0,089	4,44	0,264	13,2

А.3 Концентрация нитрит-ионов 3,00·мкмоль/дм³

Таблица 26 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 3,00·мкмоль/дм³

С _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm , мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		С _{ср}	$\bar{C}_{\text{ср}}$
			C ₁	C ₂		
3,00	0,063	1	3,09	2,94	3,02	3,04
		2	3,03	2,96	3,00	
		3	2,91	2,86	2,89	
		4	2,87	2,99	2,93	
		5	3,06	3,13	3,10	
		6	3,13	3,08	3,11	
		7	3,08	2,95	3,02	
		8	3,11	3,06	3,09	
		9	2,95	3,04	3,00	
		10	2,92	3,17	3,05	
		11	2,89	3,2	3,05	
		12	3,01	3,07	3,04	
		13	3,16	3,14	3,15	
		14	3,11	3,01	3,06	
		15	3,22	2,99	3,11	

Таблица 27 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,011	0,048	0,315	0,471	0,101
0,003				
0,001				
0,007				
0,003				
0,001				
0,009				
0,001				
0,004				
0,031				
0,048				
0,002				
0,0002				
0,005				
0,027				

Таблица 28 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{\text{ср}}$	3,04
СКО воспроизводимости, $\sigma_{RЛ}^* = S_{RЛ}$	0,104

Таблица 29 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,038	0,837	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,088$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,260$$

Таблица 30 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,101	3,32	0,104	3,43	0,089	2,94	0,260	8,68

А.4 Концентрация нитрит-ионов $4,00 \cdot \text{мкмоль/дм}^3$

Таблица 31 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке $4,00 \cdot \text{мкмоль/дм}^3$

С _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm, мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		С _{ср}	$\bar{C}_{ср}$
			C ₁	C ₂		
4,00	0,073	1	3,94	4,02	3,98	4,05
		2	3,91	4,06	3,99	
		3	4,06	3,98	4,02	
		4	4,08	3,95	4,02	
		5	4,10	4,27	4,19	
		6	4,01	4,16	4,09	
		7	3,90	4,19	4,05	
		8	3,91	4,08	4,00	
		9	4,2	4,16	4,18	
		10	4,16	4,01	4,09	
		11	4,13	4,08	4,11	
		12	4,08	3,91	4,00	
		13	3,96	3,97	3,97	
		14	3,99	4,05	4,02	
		15	4,01	4,02	4,02	

Таблица 32 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	G _{расч}	G _{табл}	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,003	0,042	0,305	0,471	0,096
0,011				
0,003				
0,009				
0,015				
0,011				
0,042				
0,015				
0,0008				
0,011				
0,001				
0,015				
0,00005				
0,009				
0,00005				

Таблица 33 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{ср}$	4,05
СКО воспроизводимости, $\sigma_{RЛ}^* = S_{RЛ}$	0,099

Таблица 34 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,045	0,912	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,097$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,262$$

Таблица 35 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, мкмоль /дм ³	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль /дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль /дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,096	2,37	0,099	2,45	0,097	2,42	0,262	6,56

А.5 Концентрация нитрит-ионов 5,00·мкмоль/дм³

Таблица 36 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 5,00·мкмоль/дм³

С _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm , мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		С _{ср}	$\bar{C}_{\text{ср}}$
			C ₁	C ₂		
5,00	0,085	1	4,91	5,23	5,07	5,03
		2	4,89	5,18	5,04	
		3	4,92	5,00	4,96	
		4	4,87	5,21	5,04	
		5	4,92	5,04	4,98	
		6	4,99	4,93	4,96	
		7	4,79	5,31	5,05	
		8	5,02	5,28	5,15	
		9	4,90	5,26	5,08	
		10	4,81	5,13	4,97	
		11	4,83	5,14	4,99	
		12	4,95	5,30	5,13	
		13	4,85	5,18	5,02	
		14	4,92	5,01	4,97	
		15	5,08	5,16	5,12	

Таблица 37 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,051	0,065	0,105	0,471	0,203
0,042				
0,003				
0,058				
0,007				
0,002				
0,135				
0,034				
0,065				
0,051				
0,048				
0,061				
0,055				
0,004				
0,003				

Таблица 38 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{\text{ср}}$	5,03
СКО воспроизводимости, $\sigma_{Rл}^* = S_{Rл}$	0,210

Таблица 39 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,034	0,461	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,143$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,470$$

Таблица 40 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , МКМОЛЬ/ДМ ³	σ_r^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, МКМОЛЬ/ДМ ³	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, МКМОЛЬ/ДМ ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, МКМОЛЬ/ДМ ³	$\pm \Delta^*$, %
0,203	4,04	0,210	4,12	0,143	2,87	0,470	9,40

А.6 Концентрация нитрит-ионов 6,00·мкмоль/дм³

Таблица 41 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 6,00·мкмоль/дм³

C _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm, мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		C _{ср}	$\bar{C}_{ср}$
			C ₁	C ₂		
6,00	0,097	1	5,89	5,71	5,80	5,88
		2	6,00	5,94	5,97	
		3	5,84	5,93	5,89	
		4	5,92	5,79	5,86	
		5	5,96	5,81	5,89	
		6	5,81	5,86	5,84	
		7	5,76	5,91	5,84	
		8	5,92	5,97	5,95	
		9	5,93	5,69	5,81	
		10	5,99	5,92	5,96	
		11	5,84	5,96	5,90	
		12	5,97	5,88	5,93	
		13	5,86	5,79	5,83	
		14	5,83	5,99	5,91	
		15	5,91	5,81	5,86	

Таблица 42 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	G _{расч}	G _{табл}	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,016	0,016	0,137	0,471	0,089
0,002				
0,004				
0,009				
0,011				
0,001				
0,011				
0,001				
0,029				
0,005				
0,007				
0,004				
0,003				
0,013				
0,005				

Таблица 43 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{ср}$	5,88
СКО воспроизводимости, $\sigma_{RЛ}^* = S_{RЛ}$	0,092

Таблица 44 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,120	1,98	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,119$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,096$$

Таблица 45 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,089	1,51	0,092	1,56	0,119	1,99	0,096	1,60

A.7 Концентрация нитрит-ионов 7,00·мкмоль/дм³

Таблица 46 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 7,00·мкмоль/дм³

C _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm , мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		C _{ср}	$\bar{C}_{\text{ср}}$
			C ₁	C ₂		
7,00	0,110	1	6,91	6,97	6,94	6,94
		2	6,86	7,06	6,96	
		3	6,94	6,95	6,95	
		4	6,99	6,91	6,95	
		5	6,89	7,07	6,98	
		6	6,85	7,01	6,93	
		7	6,95	7,06	7,01	
		8	6,87	6,92	6,90	
		9	6,81	6,90	6,86	
		10	6,89	6,97	6,93	
		11	6,98	6,83	6,91	
		12	6,93	6,87	6,90	
		13	6,94	6,96	6,95	
		14	6,97	6,88	6,93	
		15	7,02	6,89	6,96	

Таблица 47 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,002	0,02	0,212	0,471	0,079
0,020				
0,00005				
0,003				
0,016				
0,013				
0,006				
0,001				
0,004				
0,003				
0,011				
0,002				
0,0002				
0,004				
0,009				

Таблица 48 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{\text{ср}}$	6,94
СКО воспроизводимости, $\sigma_{RЛ}^* = S_{RЛ}$	0,082

Таблица 49 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,065	0,972	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,131$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,143$$

Таблица 50 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,079	1,14	0,08	1,18	0,131	1,87	0,143	2,04

А.8 Концентрация нитрит-ионов 8,00·мкмоль/дм³

Таблица 51 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 8,00·мкмоль/дм³

С _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора Δm, мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		С _{ср}	C̄ _{ср}
			C ₁	C ₂		
8,00	0,123	1	7,81	7,78	7,80	7,91
		2	7,99	7,76	7,88	
		3	8,06	7,84	7,95	
		4	8,06	7,69	7,88	
		5	8,12	7,91	8,02	
		6	8,09	7,75	7,92	
		7	8,16	7,77	7,96	
		8	7,96	7,71	7,84	
		9	7,90	7,69	7,80	
		10	8,04	7,74	7,89	
		11	8,11	7,91	8,01	
		12	8,13	7,63	7,88	
		13	8,01	7,82	7,92	
		14	8,18	7,64	7,91	
		15	7,95	7,99	7,97	

Таблица 52 – Расчет показателя повторяемости

ΣS ²	S ² _{max}	G _{расч}	G _{табл}	СКО повторяемости σ _r *=S _r
0,0005	0,146	0,213	0,471	0,213
0,027				
0,024				
0,069				
0,022				
0,058				
0,076				
0,031				
0,022				
0,045				
0,020				
0,125				
0,018				
0,146				
0,0008				

Таблица 53 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{\text{ср}}$	7,91
СКО воспроизводимости, $\sigma_{\text{RЛ}}^* = S_{\text{RЛ}}$	0,221

Таблица 54 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,093	1,02	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta\text{с}^*| = 1,96 \cdot \sigma\text{с}^*$.

$$\pm\Delta^*\text{с} = 0,179$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta\text{в}^* = \Delta\text{н}^* = \Delta^* = 0,375$$

Таблица 55 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

$\sigma_{\text{Г}}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{\text{Г}}^*$, %	$\sigma_{\text{RЛ}}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{\text{RЛ}}^*$, %	$\pm\Delta^*\text{с}$, мкмоль/дм ³	$\pm\Delta^*\text{с}$, %	$\pm\Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm\Delta^*$, %
0,214	2,70	0,221	2,79	0,179	2,23	0,375	4,69

А.9 Концентрация нитрит-ионов 9,00·мкмоль/дм³

Таблица 56 – Анализ стандартного раствора с содержанием нитрит-ионов в электрохимической ячейке 9,00·мкмоль/дм³

С _{станд} раствора NO ₂ ⁻ , мкмоль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta\text{т}$, мкмоль/дм ³	Номер серии, L=15	Результаты параллельного определения		С _{ср}	$\bar{C}_{\text{ср}}$
			С ₁	С ₂		
9,00	0,136	1	9,16	9,24	9,2	9,14
		2	9,20	9,12	9,16	
		3	9,16	9,31	9,24	
		4	9,28	9,18	9,23	
		5	9,31	9,02	9,17	
		6	9,07	9,07	9,07	
		7	9,15	9,10	9,13	
		8	9,14	9,22	9,18	
		9	9,05	9,16	9,11	
		10	9,19	9,04	9,12	
		11	9,18	9,09	9,14	
		12	8,95	9,17	9,06	
		13	9,26	8,91	9,09	
		14	9,15	9,07	9,11	
		15	9,18	9,16	9,17	

Таблица 57 – Расчет показателя повторяемости

$\sum S^2$	S^2_{\max}	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$
0,003	0,061	0,342	0,471	0,109
0,003				
0,011				
0,005				
0,04				
0				
0,001				
0,003				
0,006				
0,011				
0,004				
0,024				
0,061				
0,003				
0,0002				

Таблица 58 – Расчет показателя воспроизводимости методики

$\bar{C}_{\text{ср}}$	9,14
СКО воспроизводимости, $\sigma_{Rл}^* = S_{Rл}$	0,113

Таблица 59 – Оценка систематической погрешности по критерию Стьюдента

Θ^*	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл.}}$
0,143	1,70	2,09

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma c^*$.

$$\pm \Delta^* c = 0,165$$

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 0,419$$

Таблица 60 – Обобщенные результаты, полученные в лаборатории по 30 результатам анализа:

σ_r^* , мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{Rл}^*$, мкмоль/дм ³	$\sigma_{Rл}^*$, %	$\pm \Delta^* c$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^* c$, %	$\pm \Delta^*$, мкмоль/дм ³	$\pm \Delta^*$, %
0,109	1,20	0,113	1,24	0,165	1,83	0,419	4,66

А.10 Метрологические характеристики методики определения нитрит-ионов, полученные в лаборатории

Обобщенные результаты для всего диапазона концентраций, представлены в таблице 61.

Таблица 61 – Метрологические характеристики для концентраций нитрит-ионов от 1 до 9 мкмоль/дм³ в %

С, мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm\Delta^*c$, %	$\pm\Delta^*$, %
1,00	14,6	15,1	9,75	39,3
2,00	6,19	6,41	4,44	13,2
3,00	3,32	3,43	2,94	8,68
4,00	2,37	2,45	2,41	6,56
5,00	4,04	4,12	2,87	9,40
6,00	1,51	1,56	1,99	1,60
7,00	1,14	1,18	1,87	2,04
8,00	2,70	2,79	2,23	4,69
9,00	1,20	1,24	1,83	4,66

Из обобщенных данных, представленных в таблице 62, можно сделать вывод, что при определении нитрит-ионов в надклеточной жидкости макрофагов показатель точности не превышает 40 %, показатель повторяемости 14,6 %, воспроизводимости 15,1 %.

Таблица 62 – Метрологические характеристики для концентраций нитрит-ионов от 1 до 9 мкмоль/дм³ (численные значения).

С, мкмоль/дм ³	σ_r^* , мкмоль/дм ³	$\sigma_{RЛ}^*$, мкмоль/дм ³	$\pm\Delta^*c$, мкмоль/дм ³	$\pm\Delta^*$, мкмоль/дм ³
1,00	0,155	0,161	0,098	0,393
2,00	0,124	0,128	0,089	0,264
3,00	0,101	0,104	0,089	0,260
4,00	0,096	0,099	0,097	0,262
5,00	0,203	0,210	0,143	0,470
6,00	0,089	0,092	0,113	0,096
7,00	0,079	0,08	0,131	0,143
8,00	0,214	0,221	0,179	0,375
9,00	0,109	0,113	0,165	0,419

А.11 Метрологические характеристики методики определения SNAP

По приведенному алгоритму оценены метрологические показатели методики определения нитрозотиолов на примере SNAP. Обобщенные данные представлены в таблице 63.

Таблица 63 – Метрологические характеристики для нитрозотиолов в диапазоне концентраций от 0,2 до 2,5 мкмоль/дм³ ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

C, мкмоль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm\Delta^*c$, %	$\pm\Delta^*$, %
0,2	10,9	11,3	15,7	31,4
0,4	15,1	15,6	16,5	37,4
0,7	10,6	11	16,7	29,5
0,9	7,44	7,7	15,7	24,3
1,9	5,79	5,99	14,8	18,4
2,5	5,95	6,16	14,8	20,1

Расчитанные и представленные выше показатели методики определения нитритов и нитрозотиолов в биологических объектах являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, которые были получены по разработанной методике в отдельной лаборатории.

После того как были установлены рабочие условия и найдены линейные диапазоны зависимостей интенсивности аналитического сигнала от концентрации в данной работе:

1. Проверена гипотеза линейности градуировочной зависимости.
2. Адекватность модели по критерию Фишера.
3. Оценена правильность методик по «введено-найдену».
4. Установлены показатели точности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности.