

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ NO-АКЦЕПТОРНОЙ АКТИВНОСТИ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Е. В. Терешко

Белорусский государственный университет, Минск;

lena_ter01@mail.ru;

науч. рук. – И. Л. Юркова, д-р хим. наук, проф.

Оценена NO-акцепторная активность аскорбиновой кислоты *in vitro* методом конкурентных реакций. Методика основана на определении устойчивого метаболита NO[•] - нитрит-аниона. Разработаны оптимальные условия для спектрофотометрического определения низких концентраций нитрит-ионов в тест-системах с помощью модифицированного реактива Грисса.

Ключевые слова: оксид азота (II), модифицированный реактив Грисса, NO-активность, аскорбиновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (II) (нитрозил-радикал NO[•]) в организме ферментативно образуется из L-аргинина и оказывает ряд физиологических эффектов, включая контроль артериального давления, антимикробную и противоопухолевую активность. Однако при инфекциях и воспалениях образование NO в организме повышается, что может вызывать развитие патологических процессов (почечная дисфункция, рост опухоли и др.) [1]. Поэтому важно исследовать способность различных веществ взаимодействовать с NO и, тем самым, регулировать его уровень. Для изучения NO-активности соединений *in vitro* разрабатывают тест-системы, в которых искусственно генерируется NO, а затем детектируются устойчивые продукты его превращения в присутствии или отсутствии тестируемых соединений. Основным путем метаболизма NO является окисление до нитритов, что можно описать следующими уравнениями:



Лимитирующей стадией образования нитрит-иона является реакция $\text{NO}^\bullet$ с O_2 (уравнение 1). Константа скорости данной реакции имеет третий порядок и равна $2 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}$ [2].

Целью работы было подобрать оптимальные условия для спектрофотометрического определения низких количеств нитрит-иона в тест-системе и определить NO-активность аскорбиновой кислоты методом конкурентных реакций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе в качестве источника оксида азота (II) выбран нитропруссид натрия (SNP), который в водном растворе при физиологическом значении pH (7,4) спонтанно разлагается в соответствии с реакцией:



$\text{NO}^\bullet$, в свою очередь, вступает в реакцию с молекулярным O_2 воздуха с образованием нитрит-ионов (реакции 1-3). Соединение (S), NO-активность которого измеряют в ходе эксперимента, конкурирует с кислородом за NO:



В результате данной реакции количество NO в пробе снижается, соответственно будет снижаться уровень нитрит-анионов, что детектируем спектрофотометрически с помощью реактива Грисса.

В данной работе использовали модифицированный реактив Грисса, который состоит из двух реагентов: сульфаниламида (SA) и N-нафтилэтилендиамина (NED) [3-4]. В результате последовательного взаимодействия реактива с нитрит-ионом образуется стабильный розово-красный азо-краситель, количество которого определяем спектрофотометрически.

Для оптимального определения NO_2^- в тест-системе подбирали объем и порядок добавления реагентов, время инкубирования тест-системы, температурные условия, используя калибровочные растворы (рассчитанное количество NaNO_2 растворяли в деионизированной H_2O). В результате был сделан вывод, что SA и NED лучше добавлять по отдельности, а не в смеси, как это делают в большинстве случаев, при этом перед добавлением второго реагента выдерживали паузу в течение 5 мин. При выборе оптимального времени инкубирования систему оставляли при комнатной температуре на 10, 20 или 30 мин, а затем спектрофотометрировали. Полученные результаты различались

незначительно, поэтому для выдержки проб выбрано время – 10 мин. В условиях нашего эксперимента максимум поглощения полученных окрашенных растворов наблюдали при 540 нм. В результате с учетом подобранных условий строили калибровочную кривую в диапазоне концентраций NO_2^- от 1 мкМ до 100 мкМ. Разработанная методика позволяет определять низкий уровень нитрит-анионов в условиях наших тест-систем. В работе [3] также показано, что предел обнаружения NO_2^- с использованием модифицированного реактива Грисса составляет ~0,02 мкМ, в то время, как чувствительность классического реактива – 1-5 мкМ.

Для определения NO-акцепторной активности аскорбиновой кислоты были подготовлены следующие системы, включающие рассчитанные аликвоты исходных растворов реагентов с учетом общего объема системы 1000 мкл:

1. 100 мкл 1×10^{-1} М раствора SNP + 900 мкл деионизированной воды (контрольная тест-система);
2. 100 мкл 1×10^{-1} М SNP + 900 мкл 5×10^{-4} М раствора аскорбата (рабочая тест-система);
3. 100 мкл раствора деионизированной воды + 900 мкл 5×10^{-4} М аскорбата (контроль NO_2^- в реагентах);
4. 100 мкл $2,5 \times 10^{-5}$ М раствора NaNO_2 + 900 мкл деионизированной воды (контроль соответствия теста с калибровкой).

В нашей работе время инкубации нитропруссид натрия с пробой составляло 150 мин. При увеличении времени инкубации концентрация образующегося оксида азота в пробе существенно не изменялась. При этом инкубировали при комнатной температуре, ее увеличение до 37 °С не приводило к улучшению результатов. После инкубации к каждой пробе добавляли 0,5 мл раствора SA (1% раствор в 5 % ортофосфорной кислоте), а затем через 5 мин 0,5 мл раствора NED (0,1% раствор в деионизированной воде), смеси тщательно перемешивали и выдерживали 10 мин в темноте. Далее определяли оптическую плотность полученных окрашенных растворов при длине волны 540 нм. Оптические плотности тест-систем отображены в таблице:

Результаты измерения оптических плотностей тест-систем при 540 нм

№	Система	D
1	нитропруссид натрия в деионизированной воде	0,6984
2	нитропруссид натрия + аскорбиновая кислота	0,5350
3	аскорбиновая кислота в деионизированной воде	0,0136
4	нитрит-ион в деионизированной воде	0,0675

В исследуемом тесте некоторая часть образующегося из SNP оксида азота (II) вступала в реакцию с аскорбиновой кислотой. Остальная же

часть, как и в контрольной пробе, превращалась в нитрит-ион и взаимодействовала с реактивом Грисса. Взаимодействие аскорбата с радикалами NO приводит к снижению оптической плотности исследуемой тест-системы в сравнении с контрольной. NO-акцепторную активность аскорбиновой кислоты оценивали по следующей формуле:

$$\%I = [(D_{\text{контр. тест}} - D_{\text{исслед. тест}}) / (D_{\text{контр. тест}})] \times 100, \quad (6)$$

где %I – NO-акцепторная активность соединения, %;

$D_{\text{контр. тест}}$ – оптическая плотность контрольного теста;

$D_{\text{исслед. тест}}$ – оптическая плотность исследуемого теста.

Так, аскорбиновая кислота проявляет способность акцептировать радикалы NO, величина ее NO-активности при концентрации, равной 0,5 мМ, составляет 25,34%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбраны оптимальные условия оценки NO-активности соединений с помощью спектрофотометрического метода. В основе методики лежит реакция окисления NO до нитрит-аниона, который определяли с помощью модифицированного реактива Грисса. Разработанная методика является высоко чувствительной и позволяет детектировать низкие количества нитрит-иона, при этом использован простой и доступный метод. NO-акцепторная активность аскорбиновой кислоты составила 25,34%.

Библиографический список

1. Kumaran, A. Nitric oxide radical scavenging active components from *phyllanthus emblica* L. / A. Kumaran, R. J. Karunakaran // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2006. – Vol. 61, № 1. – P. 1–5.
2. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems / Matías N. Möller [et. al.] // *J Biol Chem*. – 2019. – № 40. – P. 14776-14802.
3. Jie Sun. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay / Jie Sun, Xueji Zhang, Mark Broderick, Harry Fein // *Sensors*. – 2003. – № 3. – P. 276-284.
4. Evaluation of the Nitric Oxide Radical Scavenging Activity of Manganese Complexes of Curcumin and Its Derivative / Y. Sumanont [et. al.] // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. – 2004. – Vol. 27, № 2. – P. 170–173.