

Ингибирование автоокисления адреналина *in vitro* при участии тролокса, аскорбиновой и галловой кислот

Н.Ю. КОЛБАС^{1,2}

Для изучения кинетических параметров автоокисления адреналина *in vitro* использовали 200 мМ карбонатный буфер (рН = 10,55), длину волны детектирования – 347 нм, время экспозиции – 60 минут при температуре 21,0°C и 36,6°C. Установлено, что оптимальное время экспозиции для 5,0 мМ раствора адреналина составляет не менее 20 минут, для 1,0 мМ – 33 минуты. Наибольшую ингибирующую способность проявила галловая кислота, наименьшую – тролокс. Предложена схема ингибирования автоокисления адреналина галловой кислотой. Проксидантная активность тролокса была выше, чем у аскорбиновой кислоты, а у галловой кислоты не выявлена.

Ключевые слова: адреналин, адrenoхром, антиоксидантная активность, аскорбиновая кислота, галловая кислота, константа скорости реакции, прооксидантная активность, тролокс.

To determine the kinetic parameters of adrenaline autoxidation *in vitro* there was used 200 mM carbonate buffer (pH = 10,55), detection wavelength of 347 nm, exposure time of 60 minutes at 21,0°C and 36,6°C. The optimal exposure time for 5,0 mM adrenaline solution was at least 20 minutes, for 1,0 mM it was 33 minutes. Gallic acid showed the highest inhibitory ability, Trolox showed the least inhibitory ability. A scheme of the inhibition of adrenaline autoxidation by gallic acid was proposed. The prooxidant activity of Trolox was higher than that of ascorbic acid. Prooxidant activity of gallic acid was not revealed.

Keywords: adrenaline, adrenochrome, antioxidant activity, ascorbic acid, gallic acid, reaction rate constant, prooxidant activity, Trolox.

Введение. Адреналин (эпинефрин, 4-[1-гидрокси-2-(метиламино)этил]-бензен-1,2-диол) – природный катехоламин; гормон, вырабатываемый хромаффинной тканью мозгового слоя надпочечников для регуляции биохимических процессов, направленных на стабилизацию организма в постстрессовых психоэмоциональных ситуациях. В состоянии отдыха содержание адреналина в плазме крови достигает 10 нг/л, но может повышаться в 10 раз во время физических упражнений и в 50 раз или более при стрессе [1].

Адреналин, как и другие катехоламины, метаболизируется несколькими путями: *o*-метилированием с образованием метанефрина и окислительным дезаминированием с образованием винилминдальной кислоты. Кроме того, окисление адреналина может происходить по хиноидному пути до адrenoхрома [2]. В условиях *in vitro* без участия ферментов хиноидное автоокисление этого катехоламина происходит в щелочной среде. При низкой концентрации протонов внутримолекулярная перестройка адреналина до адrenoхрома сопровождается образованием супероксида ($O_2^{\bullet-}$) из растворенного в среде кислорода [2], [3]. Супероксид, в свою очередь, как окислитель и акцептор протонов участвует в дальнейшем окислении адреналина, запуская тем самым цепную реакцию.

Максимум поглощения для адреналина соответствует длине волны 279 нм, раствор адrenoхрома при рН 10,5–10,65, в свою очередь, имеет два пика – 295 и 347 нм, при этом рекомендуемая длина волны детектирования для него – 347 нм [2].

Реакцию автоокисления адреналина используют для оценки антиоксидантной активности (АОА) растительных экстрактов [4], [5]. Однако кинетические параметры этого процесса в условиях *in vitro* с учетом температуры и времени экспозиции реакционной смеси остаются неизученными.

Отметим, что в качестве стандартов АОА чаще применяют водорастворимый аналог токоферола – тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), реже аскорбиновую и галловую кислоты [6], [7]. Согласно «правилу пяти» Липинского (RO5) и правилу Вебера [8] указанные стандарты обладают пероральной активностью (таблица 1), распределяются больше в плазме, чем в тканях; не проникают через гематоэнцефалический барьер и ЦНС; не обладают мутагенной активностью и гепатотоксичностью [9].

Таблица 1 – Пероральная активность, биодоступность и токсичность изученных соединений

Параметр	Химическое соединение					
	Адреналин	Адренохром	Аскорбиновая кислота	Галловая кислота	Тролокс	
Формула	C ₉ H ₁₃ O ₃ N	C ₉ H ₉ O ₃ N	C ₆ H ₈ O ₆	C ₇ H ₆ O ₅	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	
Молекулярная масса, Да	183,2	179,2	176,1	170,1	250,3	
ID PubChem*	5816	5898	54670067	370	40634	
Правило Липинского	lg P*	-1,4	-1,3	-1,76	0,7	2,8
	nHD	4	1	4	4	2
	nHA	4	4	6	5	4
	Количество совпадений	0	0	0	0	0
Правило Вебера	TPSA, Å*	72,72	57,6	107,22	98	66,8
	nRB	3	0	2	1	1
Растворимость (lg S, моль/л)**	-2,142	-0,973	-1,56	-1,91	-2,73	
Экскреция (общий клиренс, мл/(кг·сут))**	0,935	0,889	0,631	0,518	0,826	
Теоретический объем распределения (л/кг)**	8,433	0,692	0,698	0,014	0,326	
Проникновение через гематоэнцефалический барьер**	слабо	слабо	нет	нет	–	
Токсичность* (LD ₅₀ , г/кг)	2,07 (кролики; орально)	0,15 (крысы; интраперитонеально)	–	5,0 (кролики; орально)	4,3 (крысы; орально)	

Примечание: «–» – сведения отсутствуют; P – коэффициент распределения в системе октанол-вода; nHD – количество доноров водородных связей; nHA – количество акцепторов водородных связей; nRB – количество вращающихся связей; TPSA – от англ. *Topological polar surface area* – топологическая полярная площадь поверхности, * – согласно данным онлайн базы PubChem [9], ** – согласно данным онлайн базы ADMET [10].

Цель исследования – определить кинетические параметры автоокисления адреналина *in vitro* с учетом температуры и времени экспозиции, оценить ингибирующую способность тролокса, аскорбиновой и галловой кислот в реакциях автоокисления адреналина.

Методы исследований. *Определение кинетических параметров автоокисления адреналина in vitro в щелочной среде.* Для изучения кинетических параметров автоокисления адреналина использовали 0,5, 1,0, 5,0 и 10,0 мМ водные растворы адреналина и карбонатный буферный раствор (200 мМ Na₂CO₃/NaHCO₃, pH = 10,55). Реакционную смесь готовили путем добавления 20 мкл соответствующего раствора адреналина к 320 мкл карбонатного буфера. Изменение оптической абсорбции регистрировали в течении 60 минут, с шагом 5 минут, при длине волны 347 нм с использованием комбинированного спектрофлуориметра BMG FLUOstar Omega (Германия) с устройством для считывания микропланшеты и термостатированием. Температуры экспозиции: 21,0°C и 36,6°C. Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Автоокисление адреналина подчиняется кинетическому уравнению реакций первого порядка [2]. Константу скорости реакции рассчитывали в программе Microsoft Excel [11], учитывая экспоненциальную зависимость концентрации адреналина от времени реакции. Период полуреакции определяли по формуле: $\tau_{1/2} = \ln 2/k$, где k – константа скорости реакции (мин⁻¹). Время, за которое происходит окисление 90 % адреналина от первоначального, рассчитывали, как T = 1/k.

Определение ингибирующей способности тролокса, аскорбиновой и галловой кислот. Исходные растворы тролокса (99,9 %, Aldrich, CAS 53188-07-1), аскорбиновой (ACS / ≥ 99 %, Aldrich, CAS 50-81-7) и галловой (ASC / >98 %, Sigma-Aldrich, CAS 149-91-7) кислот были приготовлены в 70 %-ном этаноле. Используемые концентрации тролокса – от 0,5 до 20,0 мМ, аскорбиновой кислоты – от 0,5 до 10,0 мМ, галловой кислоты – от 0,005 до 10,0 мМ. Для моделирования реакции использовали реакционную смесь, содержащую 20 мкл раствора исследуемого вещества, 20 мкл раствора адреналина (5,0 мМ в в 70 %-ном этаноле) и 300 мкл карбо-

натного буфера (200 мМ, рН = 10,55) [2]. Изменение оптической абсорбции реакционной смеси (A_{PC}) регистрировали в течение 20 минут с шагом 5 минут, при длине волны 347 нм и температуре экспозиции 36,6°C. Кроме того, регистрировали изменение абсорбции 5,0 мМ раствора адреналина в карбонатном буфере (А) и образца в карбонатном буфере (контроль, A_K) при вышеописанных условиях. Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Ингибирование автоокисления адреналина (в %) рассчитывали по формуле: $[(A - A_E)/A] \times 100$, где А – оптическая абсорбция адреналина в карбонатном буфере, A_E – разница между A_{PC} и абсорбцией контроля (A_K). В случае, если ингибирование было в пределах от -10 % до +10 % судили об отсутствии как ингибирующего, так и активирующего эффекта по отношению к автоокислению адреналина, если $A < A_E$ было более чем на 10 %, то действие анализируемого вещества считали прооксидантным.

Результаты. *Кинетические параметры автоокисления адреналина in vitro.* Изменение абсорбции реакционной смеси при температурах 21,0°C и 36,6°C представлено на рисунке 1. Кривые имеют вид гиперболы, которая наиболее ярко выражена при температуре экспозиции 36,6°C для исходных концентраций адреналина 1,0 и 0,5 мМ. Для 10,0 мМ растворов адреналина не удалось провести реакцию 60 минут, так как образовавшийся адренохром имеет интенсивное розовое окрашивание и его абсорбция лежит за пределами чувствительности прибора.

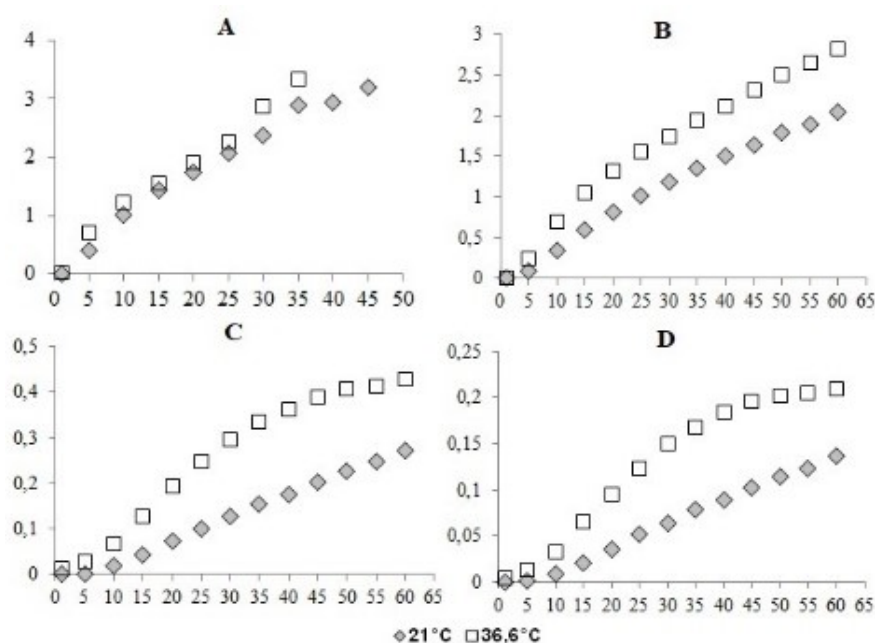


Рисунок 1 – Изменение абсорбции растворов адреналина в карбонатном буфере (рН = 10,55) при длине волны 347 нм и разных температурах экспозиции

Примечание: по оси абсцисс – время, минуты; по оси ординат – абсорбция, опт.ед; исходные концентрации адреналина (ммоль/л): А – 10,0, В – 5,0, С – 1,0, D – 0,5.

Кинетические параметры реакции автоокисления адреналина представлены в таблице 2. Проведенный статистический анализ выявил высокую корреляционную связь между временем экспозиции и абсорбцией. Коэффициенты корреляции (*r-Pearson*) варьировали от 0,911 до 0,995 при уровне значимости (*p*) менее 0,05. При 36,6°C для 5,0 мМ раствора 50 % от первоначального содержания адреналина подвергается автоокислению через 20 минут, при 21,0°C – через 33 минуты. Отметим, что именно 5,0 мМ раствор адреналина применяют в оценке АОА биологически активных веществ и экстрактов [4], [5] и данная концентрация наиболее соответствует концентрации фармакопейного препарата (5,46 мМ). В своей работе Л.М. Федосеева с соавт. [4] использовали время экспозиции 3, 5 и 10 минут при температуре 20–22°C, что, согласно полученным нами результатам, является малоинформативным. 50 %-ное автоокисление исходного 1,0 мМ раствора адреналина при обеих температурах происхо-

дит практически в одном временном промежутке (при 21,0°C – за 21 минуту, при 36,6 °C – за 20,4 минуты). Для 0,5 мМ раствора 50 %-ное автоокисление осуществляется за 19 минут при 21,0°C и за 11 минут при 36,6°C.

Таблица 2 – Кинетические параметры автоокисления адреналина при разной температуре экспозиции

Начальная концентрация адреналина, (ммоль/л)	Кинетическое уравнение	R ²	k (мин ⁻¹)	τ _{1/2} , мин	T, мин
температура 21,0°C					
10	$y = 9,9627 \exp(-0,019x)$	0,993	0,019	36,48	52,63
5	$y = 5,2654 \exp(-0,021x)$	0,995	0,021	33,00	47,62
1	$y = 0,9139 \exp(-0,033x)$	0,952	0,033	21,00	30,30
0,5	$y = 0,4171 \exp(-0,037x)$	0,972	0,037	18,74	27,03
температура 36,6°C					
10	$y = 10,088 \exp(-0,024x)$	0,981	0,024	28,88	41,67
5	$y = 5,6809 \exp(-0,035x)$	0,979	0,035	19,80	28,57
1	$y = 0,9976 \exp(-0,034x)$	0,977	0,034	20,39	29,41
0,5	$y = 0,5787 \exp(-0,062x)$	0,911	0,062	11,18	16,13

Примечание: y – концентрация адреналина, мМ; x – время экспозиции, минуты; k – константа скорости реакции; τ_{1/2} – период полуреакции; T – время, за которое происходит окисление 90 % адреналина от первоначального.

Ингибирующая способность тролокса, аскорбиновой и галловой кислот по отношению к автоокислению адреналина. После 20 минут реакции ингибирование автоокисления адреналина аскорбиновой кислотой варьировало от 13,9 до 60,9 % в зависимости от концентрации. По мере экспозиции значение параметра снижалось для всех концентраций аскорбиновой кислоты кроме 0,5 мМ (рисунок 2-А).

Для галловой кислоты процент ингибирования был от 17,3 (0,005 мМ, молярное соотношение адреналин:вещество – 1:0,001) до 97,1 (10,0 мМ, молярное соотношение 1:2). Отметим, что галловая кислота во всех изученных концентрациях проявляла только АОА (рисунок 2-В).

Антиоксидантное действие галловой кислоты основано на ее восстановлении до феноксил радикала (галлатсемихинона) с одновременным депротонированием [12]. Предполагаемая схема антиоксидантного действия галловой кислоты представлена на рисунке 3 и включает перехват радикалов адреналинсемихинона (точка 1), арденохромсемихинона (точка 2) и супероксида (точки 3). Реакции протекают по согласованному двойному механизму переноса атома водорода (*HAT* механизм – от англ. *Hydrogen Atom Transfer*) и электрона (*SET* механизм – от англ. *Single Electron Transfer*). Образующийся при этом галлатсемихинон стабилен. Его стабилизация поддерживается за счет двух внутримолекулярных водородных связей при участии ОН-групп в орто-положении [13]. Известно, что феноксил-радикалы могут восстанавливаться при взаимодействии с другими антиоксидантами, имеющими более низкие редокспотенциалы [14]. В рассматриваемом нами процессе донорами протонов могут выступать адреналин и лейкоадренохром. Вторым продуктом реакции галловой кислоты с супероксидом является пероксид водорода, который в свою очередь способен окислять следующую молекулу адреналина и запускать новый цикл реакций [15]. Галловая кислота, как и другие антиоксиданты (в том числе тролокс), может восстанавливать пероксид водорода и превращаться в галлат-*o*-хинон [13] (рисунок 3, точки 5). В данном случае галловая кислота выступает в роли пероксидазного миметика.

Для тролокса после 20 минут экспозиции ингибирование автоокисления адреналина варьировало от 2,3 % до 20,0 %. Для большинства концентраций тролокса отмечен пик ингибирования на 5 минуте экспозиции (рисунок 2-С). АОА выявлена для 20,0 мМ раствора тролокса (молярное соотношение адреналин:вещество – 1:4, ингибирование 20 %), а также для 5,0 мМ (соотношение 1:1, ингибирование 13,9 %), 7,5 мМ (соотношение 1:1,5, ингибирование 50,4 %) и 10,0 мМ (соотношение 1:2; ингибирование 60,9 %) растворов аскорбиновой кислоты.

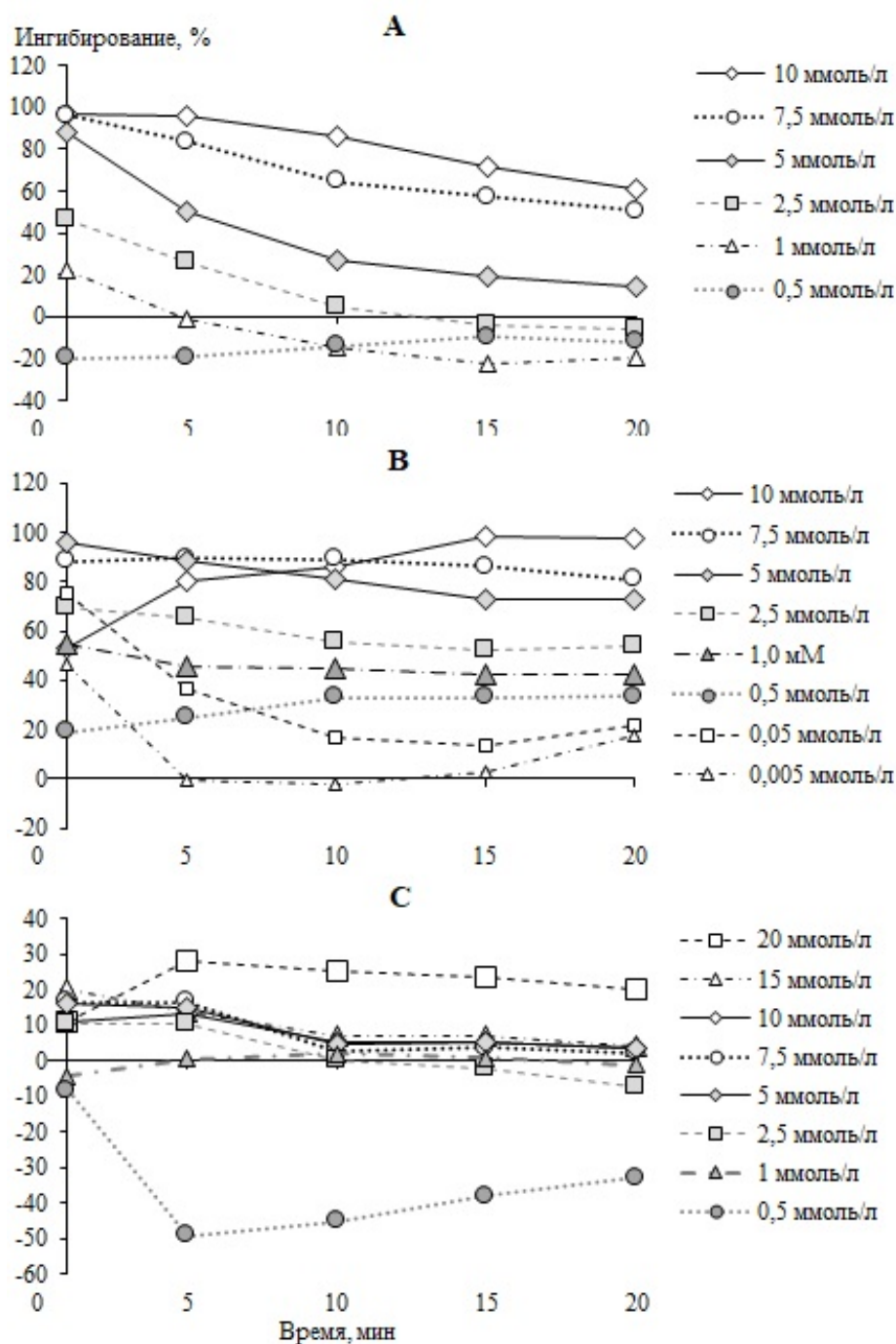


Рисунок 2 – Ингибирование *in vitro* реакции автоокисления адреналина при участии аскорбиновой кислоты (А), галловой кислоты (В) и тролокса (С)

Прооксидантная активность характерна для 0,5 мМ растворов тролокса и аскорбиновой кислоты, а также для 1,0 мМ раствора аскорбиновой кислоты после 10 минут экспозиции.

Прооксидантная активность галловой кислоты в смоделированных нами условиях не установлена. Отсутствие как антиоксидантного, так и прооксидантного эффектов характерно для 1,0 мМ раствора тролокса, а после 5 минут экспозиции – для 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 мМ растворов этого вещества и для 2,5 мМ раствора аскорбиновой кислоты (рисунок 2-А и 2-С). После 10 минут реакции анти- и прооксидантное действие отсутствует и у 0,5 мМ раствора аскорбиновой кислоты (рисунок 2-А). О.С. Бровко с соавт. [16] отмечают, что аскорбиновая кислота в концентрации менее 0,14 ммоль/л не способна эффективно ингибировать процесс автоокисления адреналина при pH = 2,0 и времени экспозиции 3, 5, 7 и 10 минут.

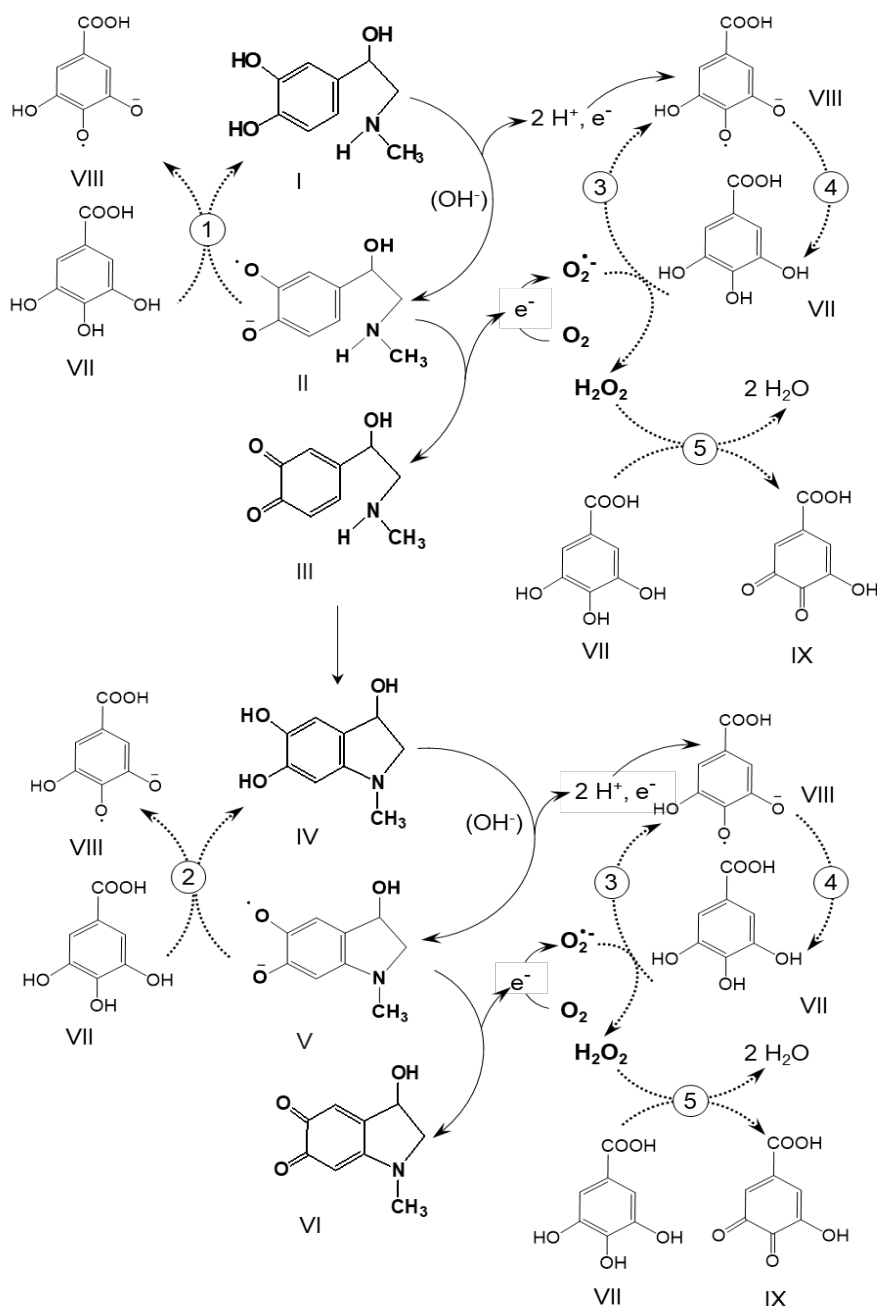


Рисунок 3 – Предполагаемая схема ингибирования автоокисления адреналина галловой кислотой

Примечание: I – адреналин, II – адреналинсемихинон, III – адреналинхинон, IV – лейкоадренохром, V – адренохромсемихинон, VI – адренохром, VII – галловая кислота, VIII – галлатсемихинон, IX – галлат-*o*-хинон; 1–5 – точки сопряжения автоокисления адреналина и антиоксидантного действия галловой кислоты (пояснения в тексте статьи)

Заключение. Для оценки *in vitro* анти-/прооксидантной способности биологически активных веществ могут быть использованы 5,0 Мм (фармакопейный препарат 5,46 мМ) и 1,0 мМ растворы адреналина. С учетом кинетических параметров наиболее оптимальной продолжительностью экспозиции реакционной смеси при температуре 36,6°C является 20 минут, при 21,0°C – 21 минута для 5,0 мМ и 33 минуты для 1,0 мМ растворов адреналина.

Установлено, что ингибирование реакции автоокисления адреналина находится в прямой зависимости от концентраций тролокса, аскорбиновой и галловой кислот. Антиоксидантный эффект снижается в ряду: галловая кислота > аскорбиновая кислота > тролокс. Галловая кислота проявляет АОА в широком диапазоне концентраций (от 0,005 мМ до 10,0 мМ) за счет блокировки образующихся свободнорадикальных частиц семихинонов адреналина и адрено-

хрома, супероксидов (по водород-донорному и электрон-донорному механизмам), а также путем восстановления пероксида водорода (по типу пероксидазного миметика). По отношению к автоокислению адреналина прооксидантная активность для галловой кислоты не выявлена. Выявленный прооксидантный эффект тролокса был выше, чем у аскорбиновой кислоты.

Литература

1. Systemic catecholaminergic deficiency in depressed patients with and without coronary artery disease / U. Hoppmann [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2022. – Vol. 10, is. 5. – P. 986–999.
2. Sirota, T. V. A Novel approach to study the reaction of adrenaline autooxidation : a possibility for polarographic determination of superoxide dismutase activity and antioxidant properties of various preparations / T. V. Sirota // *Biochemistry (Moscow)*. – 2011. – Vol. 5, № 3. – P. 253–259.
3. Kinetics of the autoxidation of adrenaline and [copper(II)(adrenaline)]²⁺ in alkaline aqueous and micellar media / A. S. Al-Ayed [et al.] // *Transition Metal Chem.* – 2013. – Vol. 38. – P. 173–181.
4. Федосеева, Л. М. Определение антиоксидантной активности настоя травы шавеля кислого методом *in vitro* / Л. М. Федосеева, Г. Р. Кутателадзе // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2019. – Т. 5, № 3. – С. 64–70.
5. Антиоксидантная активность плодов таксонов сем. *Ericaceae* при выращивании на торфяных выработках в южной части Припятского Полесья / Ж. А. Рупасова [и др.] // *Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта*. – 2013. – № 5 (77). – С. 50–57.
6. Amorati, R. Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts / R. Amorati, L. Valgimigli // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – Vol. 66, № 13. – P. 3324–3329.
7. Munteanu, I. G. Analytical methods used in determining antioxidant activity : a review / I. G. Munteanu, C. Apetrei // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021 – Vol. 22, № 7. – P. 3380–3410.
8. Molecular Docking Study on Several Benzoic Acid Derivatives against SARS-CoV-2 / A. Stefaniu [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 5828–5840.
9. Pharmacokinetic properties ADMET [Electronic resource]. – Mode of access : <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsmprediction>. – Date of access : 19.06.2023.
10. PubChem. Open chemistry database at the National Institutes of Health [Electronic resource]. – Mode of access : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. – Date of access : 19.06.2023.
11. Microsoft Office [Electronic resource]. – Mode of access : <https://www.microsoft.com/ru-ru/microsoft-365/free-office-online-for-the-web>. – Date of access : 21.01.2021.
12. Utrera, M. Impact of trolox, quercetin, genistein and gallic acid on the oxidative damage to myofibrillar proteins : the carbonylation pathway / M. Utrera, M. Estévez // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 141, № 4. – P. 4000–4009.
13. Badhani, B. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications / B. Badhani, N. Sharma, R. Kakkar // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5, № 35. – P. 27540–27557.
14. Костюк, В. А. Роль эндогенных и экзогенных антиоксидантов в защите кожи от негативного воздействия экспозомы / В. А. Костюк // *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта*. – 2021. – № 2. – С. 3–12.
15. Concerted double proton-transfer electron-transfer between catechol and superoxide radical anion / J. Quintero-Saumeth [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 19, № 38. – P. 26179–26190.
16. Бровко, О. С. Количественное определение антиоксидантной активности по ингибированию автоокисления адреналина / О. С. Бровко, А. Д. Ивахнов, Т. А. Бойцова // *Вестник ВГУ. Сер. : Химия. Биология. Фармация*. – 2022. – № 3. – С. 5–12.

¹Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Поступила в редакцию 20.07.2023