

## КИСЛОТНЫЕ СВОЙСТВА И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С СУПЕРОКСИД АНИОН-РАДИКАЛОМ ЭХИНОХРОМА А И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

А.В. ЛЕБЕДЕВ, М.В. ИВАНОВА, Н.И. КРАСНОВИД, Е. А. КОЛЬЦОВА

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,  
Москва 121552, 3-я Черепковская ул., 15А  
Тихоокеанский институт биоорганической химии РАН, Владивосток,  
просп. 100 лет Владивостока 159

Кислотные свойства полигидрокси-1,4-нафтахинонов (ПГНХ), обладающих кардиопротективными свойствами, автоокисление ПГНХ и взаимодействие с супероксидом ( $O_2^{\cdot-}$ ) изучены методами полярографии, потенциометрического титрования, УФ- и видимой спектрофотометрии. Изучены свойства 6-этил-2,3,7-тригидроксиафтазарина (эхинохром А), 3-ацетил-2,6,7-тригидроксиафтазарина (спинохром С), 2,3,6-тригидроксиафтазарина (спинохром D), 2,3,6,7-тетрагидроксиафтазарина (спинохром E), 2,3-дигидрокси-6,7-диметилафтазарина (А618) и 6-этил-2,3,7-триметоксиафтазарина (триметоксиэхинохром А). Определены константы диссоциации ( $pK_i$ ) ПГНХ в 40% этаноле. Ферментативная генерация ( $O_2^{\cdot-}$ ) (ксантин-ксантинооксидаза, рН 8,5) приводила к изменению спектров эхинохрома А, спинохромов D и E, А618. Трансформацию спектров этих ПГНХ во время реакции с ( $O_2^{\cdot-}$ ) характеризовала выраженная изобестическая точка, что указывает на преимущественное образование одного продукта реакции. Предположено, что продуктом реакции является 1,2,3,4-тетракетон, который образуется из 2,3,5,8-тетрагидрокси-1,4-нафтахинонов (эхинохром А, спинохром D и E, А618) в результате окисления гидроксигрупп во 2-м и 3-м положениях. Методом конкурирующих реакций с нитросиним тетразолием (NBT) определены константы скорости реакции ПГНХ с ( $O_2^{\cdot-}$ ). Константы имеют порядок  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , уменьшаясь в ряду: эхинохром А > спинохром D > спинохром С > NBT > триметоксиэхинохром А. Сделан вывод, что роль эффективных перехватчиков супероксидного анион-радикала могут выполнять полигидрокси-1,4-нафтахиноны, которые содержат гидроксильные группы во 2-м и 3-м положениях.

**Ключевые слова:** полигидрокси-1,4-нафтахиноны, эхинохром А, спинохромы С, D и E, кислотно-основные свойства, константы диссоциации, супероксид, константы скорости реакции, автоокисление, кардиопротективный препарат

**ВВЕДЕНИЕ.** Избыточной генерации активных форм кислорода принадлежит важная роль в повреждении миокарда при ишемии и реперфузии и активации свободнорадикальных процессов [1-3]. В связи с этим исследуются возможности более широкого применения антиоксидантных препаратов в кардиологии.

Выраженные антиоксидантные свойства полигидрокси-1,4-нафтахинонов (ПГНХ) послужили основой для разработки нового лекарственного препарата «гистохром» (эхинохром А) [4]. В экспериментах на моделях ишемии-реперфузии миокарда [4-6] показано кардиопротекторное действие гистохрома и родственных полигидрокси-1,4-нафтахинонам, отсутствие токсических свойств, присущих другим 1,4-нафтахинонам [7, 8]. Проведены успешные клинические испытания гистохрома при остром инфаркте миокарда [9] и стенокардии [10]. Физиологическая активность

ПГНХ делает актуальной задачу проведения исследований их физико-химических свойств, механизмов биохимического и фармакологического действия.

Антиоксидантные свойства полигидроксид-1,4-нафтохинонов (ПГНХ) изучены на моделях инициированного окисления алкилбензолов, термического автоокисления метилленолеата, окисления минеральных и растительных масел [11]. Антирадикальная активность эхинохрома, характеризуемая константой  $k_7$  (константа взаимодействия в перекисными радикалами), сравнима с  $k_7$  для ионола –  $3,5 \cdot 10^4$  и  $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , соответственно [11]. Наиболее ярко антиоксидантное действие ПГНХ проявляют при торможении железо-аскорбат индуцируемого окисления липосом из яичного фосфатидилхолина, где антиоксидантное действие ПГНХ намного превосходит действие фенольных антиоксидантов, таких как ионол и  $\alpha$ -токоферол [12]. В этой модели способность ПГНХ связывать мощные инициаторы перекисного окисления липидов, катионы железа  $\text{Fe}^{2+}$ , в неактивные комплексы играет решающую роль в ингибировании радикальных реакций. Антиоксидантную активность обеспечивают  $\beta$ -гидроксильные заместители - во 2, 3 и 7 положениях молекул ПГНХ. Замена этих гидроксильных групп в эхинохроме А на метокси-группы сводит антиоксидантную активность ПГНХ к нулю.

В данной работе изучены слабокислотные свойства эхинохрома А, триметоксиэхинохрома, спинохромов С, D и Е, их автоокисление и взаимодействие с супероксид анион-радикалом.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Реагенты.** В работе использовали Hepes, Tris, EDTA, нитросиний тетразолий (NBT), ксантин, ксантиноксидазу, супероксиддисмутазу (Sigma, США). Серия полигидроксид-1,4-нафтохинонов любезно предоставлена Е. А. Кольцовой, Н.К. Уткиной и В. Ф. Ануфриевым - Тихоокеанский институт биоорганической химии РАН (ТИБОХ, Владивосток). 6-этил-2,3,7-тригидроксинафтазарин (эхинохром А), 2,3,6,7-тетрагидроксинафтазарин (спинохром Е), 3-ацетил-2,6,7-тригидроксинафтазарин (спинохром С), 2,3,6-тригидроксинафтазарин (спинохром D) выделены из панцирей морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и *Strongylocentrotus nudus* в ТИБОХ [14]; 2,3-дигидроксид-6,7-диметилнафтазарин (А618) и 6-этил-2,3,7-триметоксинафтазарин (триметоксиэхинохром) синтезированы как описано ранее [5].

**Генерация супероксидного анион-радикала.** Для генерации  $\text{O}_2^{\cdot -}$  использовали ксантин-ксантиноксидазную систему [14]. Опыты проводили при комнатной температуре в буферном растворе, содержащем 50 мМ Hepes-Tris, 100 мкМ EDTA, 100 мкМ ксантин при pH 8,5. Реакцию запускали добавлением ксантиноксидазы – 5-40 мкг/мл.

**Спектрофотометрическая регистрация гидроксинафтазаринов.** Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-260 (Япония) в стандартных кварцевых кюветах толщиной 1 см. Спектр гидроксинафтазарина (25 мкМ) записывали в длинноволновой области поглощения - 300-600 нм. Реакцию образования  $\text{O}_2^{\cdot -}$  запускали добавлением ксантиноксидазы (40 мкг/мл), начиная отсчет времени с этого момента. Изменения спектра регистрировали через одинаковые промежутки времени - 4 мин.

**Расчет константы скорости.** Константы скорости реакций ПГНХ с  $\text{O}_2^{\cdot -}$  определены методом конкурирующих реакций с нитросиним тетразолием [15]. Концентрация NBT 75-90 мкМ и нафтазаринов 1-25 мкМ. Восстановление NBT регистрировали по поглощению  $\lambda = 560 \text{ нм}$ ,  $\epsilon_{\text{NBT}} = 2,78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16]. Скорость генерации  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , измеренную по восстановлению цитохрома С, подбирали так, чтобы  $[\text{O}_2^{\cdot -}]$  было много меньше  $[\text{NBT}]$  и концентрации нафтазаринов. В этих условиях спонтанной дисмутацией  $\text{O}_2^{\cdot -}$  можно пренебречь [17].

Соотношение скоростей восстановления NBT в отсутствие ( $V_{\text{NBT}}$ ) и в присутствии ( $V_{\text{NBT}}^*$ ) нафтазаринов равно:



$$\frac{V_{NBT}}{V^*_{NBT}} = 1 + \frac{k_1[NqH_2]}{k_{NBT}[NBT]}$$

где  $k_{NBT} = 5,94 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [16]. Константу  $k_1$  определяли, построив зависимость  $V_{NBT}/V^*_{NBT}$  от  $[NqH_2]/[NBT]$ .

Метод конкурентного ингибирования восстановления NBT не может быть использован для определения константы скорости реакции спинохрома E с  $O_2^{\cdot-}$ , поскольку в процессе автоокисления спинохрома E происходило быстрое уменьшение концентрации спинохрома и образование дополнительного  $O_2^{\cdot-}$ , приводившее к восстановлению NBT.

**Измерение поглощения кислорода.** Поглощение кислорода измеряли полярографическим методом, используя кларковский электрод и оксиметр YSI Model 53 Oxygen monitor 53 Yellow Spring instrument Co., Inc. (США).

**Потенциометрическое титрование ПГНХ.** Области буферной емкости, характеризующие рК ПГНХ, определяли кислотно-щелочным титрованием 0,2 - 0,5 мМ растворов ПГНХ в 40% этаноле в диапазоне рН от 4 до 10. Автоокисление эхинохрома А, спинохромов Е и D при рН > 9,5 ограничивало область титрования этих ПГНХ. Использовали стеклянный электрод и каломельный электрод сравнения, рН-метр Radelkis (Венгрия).

Расчет рК проводили, аппроксимируя экспериментальную зависимость буферной емкости ( $\beta = d[NaOH]/d(pH)$ ) от рН теоретической кривой

$$\beta = 2,302 C_{ПГНХ} \sum \frac{k_i[H^+]}{(k_i + [H^+])^2} \quad [18], \text{ где } k_i - \text{константы ионизации ПГНХ, } C_{ПГНХ} -$$

концентрация ПГНХ.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Кислотные свойства полигидроксильрованных производных нафтазарина. В табл. 1 представлены результаты кислотно-щелочного титрования ПГНХ в водно-спиртовых растворах. Наибольшие значения рК характеризуют гидроксилы в 5-м и 8-м положениях нафтольного кольца триметоксиэхинохрома. Следует учесть, что значения рК, полученные в 40% водно-спиртовых растворах, примерно на 0,5 ед. рН выше значений рК в водных растворах. Следовательно, в водных растворах диссоциация ОН-групп во 2 и 3 положениях эхинохрома А, спинохромов D и E происходит при рН от 5 до 7,5.

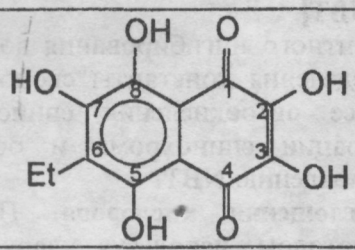
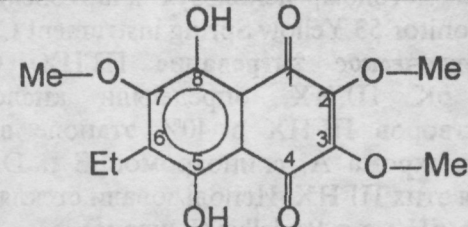
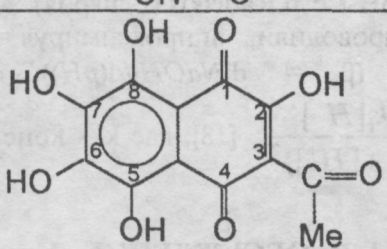
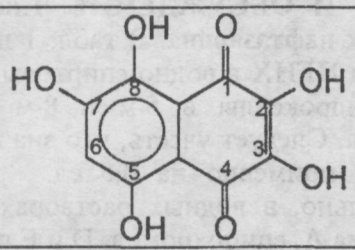
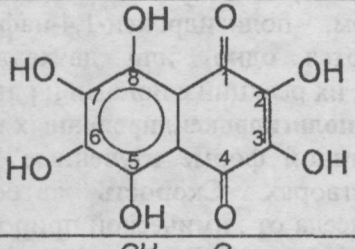
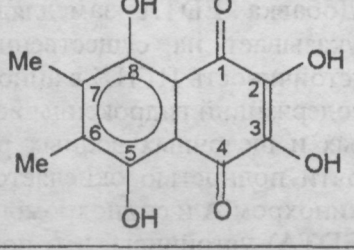
Таким образом, полигидроксиды-1,4-нафтахиноны при физиологических значениях рН являются одно- или двухвалентными анионами, что может существенно влиять на их реакции с ионами и радикалами.

**Автоокисление полигидроксильрованных производных нафтазарина.**

В протонированной форме изученные ПГНХ устойчивы в спиртовых и кислых водных растворах. Скорость автоокисления ПГНХ возрастала с увеличением рН и зависела от химической природы 2,3,6,7-заместителей ПГНХ и от чистоты растворов. Добавка EDTA замедляла или полностью останавливала автоокисление. Это указывает на существенное влияние примесных катионов тяжелых металлов на устойчивость ПГНХ в анионной форме.

Спинохром Е, содержащий гидроксилы во 2, 3, 6 и 7-м положениях, наименее устойчив в нейтральных и щелочных водных растворах. 25 мкМ спинохром Е в HEPES-Tris буфере почти полностью окисляется в течение 20 мин при рН 8,5 в присутствии EDTA. Эхинохром А и спинохромы D и С в сходных условиях (HEPES-Tris буфер, 100 мкМ EDTA) устойчивы, что позволило использовать их в опытах при исследовании взаимодействия ПГНХ с супероксидным радикалом при рН 8,5. В щелочных средах при рН > 9,5 эхинохром А, спинохромы D и С неустойчивы. При автоокислении наблюдали поглощение кислорода, изменение спектров, образование  $O_2^{\cdot-}$ , регистрируемое по СОД-ингибируемому восстановлению NBT (не показано). Супероксиддисмутаза замедляла автоокисление ПГНХ.

Таблица 1. Кислотные свойства полигидрокси-1,4-нафтохинонов (ПГНХ)

ПГНХ	Структурная формула	pK
		40% этанол
Эхинохром А		5,30 ± 0,03 7,64 ± 0,02
Триметоксиэхинохром А		8,17 ± 0,04 8,85 ± 0,15
Спинохром С		6,52 ± 0,04 7,57 ± 0,02
Спинохром D		6,07 ± 0,03 8,25 ± 0,02
Спинохром Е		5,84 ± 0,02 7,30 ± 0,10 8,23 ± 0,20
А618		5,35 ± 0,05 6,40 ± 0,02

По-видимому автоокисление изученных гидроксинафтазаринов аналогично автоокислению 1,4-нафтогидрохинонов и сопровождается образованием семихинонов и супероксидного анион-радикала [7, 8].



### Взаимодействие полигидроксированных производных нафтазарина с $O_2^{\cdot-}$

В концентрациях до 40 мкМ испытанные вещества не меняли скорость поглощения кислорода в ксантин-ксантиноксидазной реакции, и следовательно, не влияли на активность фермента.

На рис. 1 приведены изменения спектров эхинохрома А и спинохрома D в супероксид-генерирующей системе. В дополнительных опытах показано, что перекись водорода не влияла на изменение спектров исследуемых веществ. Следовательно, наблюдаемое изменение спектров на рис. 1 не связано с образованием  $H_2O_2$  в ксантин-ксантиноксидазной реакции. Спектры спинохрома С после добавления ксантиноксидазы меняются слабо (не показано). В те же условиях спектры триметоксиэхинохрома не изменяются (не показано).

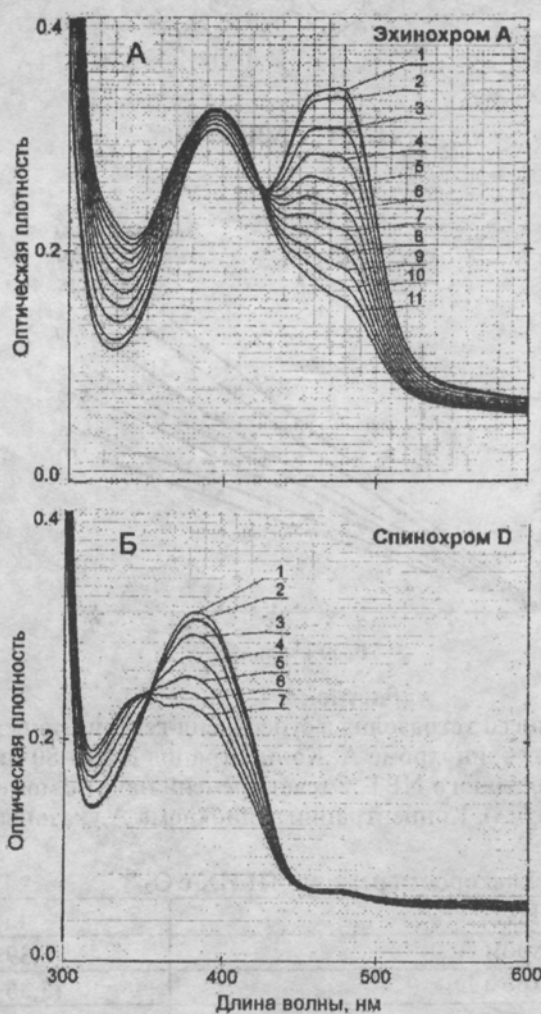


Рисунок 1.

Изменение спектров эхинохрома А и спинохрома D в супероксид-генерирующей системе. 1 -исходные спектры эхинохрома А и спинохрома D. 2, 3 и т.д. получены после добавления ксантиноксидазы (40 мкг/мл) через равные промежутки времени (4 мин).

В каждой серии спектров А и Б рис. 1 видна изобестическая точка – 427 и 350 нм соответственно. Подобные изменения спектров наблюдались и при взаимодействии спинохрома Е и синтетического полигидрокси-1,4-нафтахинона А618 с  $O_2^{\cdot-}$  (изобестическая точка 435 и 417 нм соответственно). Наличие изобестической точки при трансформации спектров во время реакции указывает на образование единственного продукта реакции.

Изобестическую точку в спектрах спинохрома С не удалось зарегистрировать в области длин волн выше 300 нм, которая доступна для измерения в присутствии ксантина.

Ниже приведена предполагаемая двустадийная схема реакций супероксида с эхинохромом, промежуточным продуктом которой является семихинон эхинохрома, а стабильным конечным продуктом – тетракетон:

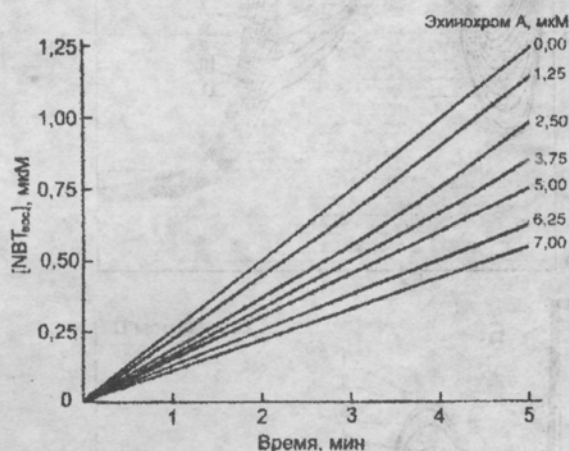


Рисунок 2.

Восстановление нитросинего тетразолия в супероксид-генерирующей системе при различных концентрациях эхинохрома А. Концентрация NBT - 80 мкМ.  $[NBT_{вос}]$  – концентрация восстановленного NBT. Отсчет времени начат с момента добавки ксантиноксидазы (5 мкг/мл). Концентрации эхинохрома А указаны на рисунке.

Таблица 2. Константы  $k_1$  скорости реакции ПГНХ с  $O_2^{\bullet-}$

ПГНХ	$k_1, M^{-1}s^{-1}$
Эхинохром А	$(6,39 \pm 0,37) \cdot 10^5$
Спинохром D	$(3,36 \pm 0,52) \cdot 10^5$
Спинохром С	$(1,72 \pm 0,16) \cdot 10^5$
Триметоксиэхинохром А	$(2,61 \pm 0,63) \cdot 10^4$

Среднее значение вычислено по результатам 3-4 измерений.

Аналогичные реакции с супероксидным анион-радикалом можно предположить и для спинохромов D и E, которые также содержат гидроксилы во 2-м и 3-м положениях. Для спинохрома С и триметоксиэхинохрома в реакции с  $O_2^{\bullet-}$  можно предположить участие ОН-групп бензольного кольца.

Константы  $k_1$  скорости реакции взаимодействия ПГНХ с  $O_2^{\bullet-}$ , определенные методом конкурентного ингибирования восстановления NBT (рис. 2), имеют порядок  $10^4$ - $10^5$  (таблица 2). Среди испытанных веществ наибольшие значения  $k_1$



имеет эхинохром и спинохром D. Константа  $k_1$  для 2,3,7-триметоксиэхинохрома на порядок ниже,  $k_1$  для спинохрома C имеет промежуточное значение.

Можно сделать вывод, что при взаимодействии с  $O_2^{\cdot -}$  гидроксильные группы во 2-м и 3-м положениях хинонового кольца (эхинохром A и спинохром D) более реакционноспособны. Полигидрокси-1,4-нафтохиноны, содержащие гидроксилы лишь в ароматическом кольце, взаимодействуют с  $O_2^{\cdot -}$  заметно медленней (спинохром C и триметоксиэхинохром A).

Таким образом, полученные результаты показывают, что изученные природные полигидрокси-1,4-нафтохиноны взаимодействуют с супероксидным анион-радикалом. Среди них наиболее эффективен эхинохром A.

Физиологическая эффективность эхинохрома A [4-6, 9, 10] может быть связана с его антиоксидантными свойствами. При этом обрыв радикальных реакций природными ПГНХ определяется, как показано ранее, хелатированием катионов железа, перехватом радикалов фосфолипидных молекул [12] и, как показано в этой работе, перехватом супероксидного анион-радикала.

Мы благодарны О. Б. Максиму и его коллегам в ТИБОХ (Владивосток) за предоставленные вещества и плодотворные обсуждения.

Работа поддержана грантом РФФИ 98-04-48661.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков А.П., Голиков П.П., Давыдов Б.В., Полумисков В.Ю., Марченко В.В. (1997) Физиол. человека, 23(6), 49-57.
2. Liu P., Hock C.E., Nagele R., Wong P.Y. (1997) Am. J. Physiol., 272(5), H2327-H2336.
3. Лебедев А.В., Афанасьев С.А., Алексеева Е.Д., Макарова М.Н., Ахмедов Ш.Д., Пекарская М.В., Карнов Р.С. (1995) Бюл. эксп. биол. мед., 118(6), 684-586.
4. Левицкий Д.О., Лебедев А.В., Садретдинов С.М., Швилкин А.В., Афонская Н.И., Руда М.Я., Розеништраух Л.В., Флейдервиш И.Я., Максимов О.Б., Мищенко Н.П., Кольцова Е.А., Артюков А.А., Глебо Л.И., Новиков В.Л., Ануфриев В.Ф., Еляков Г.В., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Черпаченко Н.М. (1991) Заявка на изобретение № 4764885/14. Решение ВНИИГПЭ о выдаче патента от 6 дек. 1991 г. Межд. пат. WO 91/07958 № 1833544., М, ВНИИГПЭ.
5. Швилкин А.В., Афонская Н.И., Черпаченко Н.М., Садретдинов С.М., Новиков В.Л., Ануфриев В.Ф., Кольцова Е.А., Максимов О.Б., Левицкий Д.О., Руда М.Я. (1991) Кардиология, 31 (11), 79-82.
6. Anufriev V.P., Novikov V.L., Maximov O.B., Elyakov G.B., Levitsky D.O., Lebedev A.V., Sadretdinov S.M., Shvilkin A.V., Afonskaya N.I., Ruda M.Y., Cherpachenko N.M. (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett., 8 (6), 587-592.
7. Ollinger K., Brunmark A. (1991) J. Biol. Chem., 266 (32), 21496-21503.
8. Ollinger K., Buffinton G.D., Ernster L., Cadenas E. (1990) Chem Biol Interact, 73(1), 53-76.
9. Закирова А.Н., Иванова М.В., Голубятников В.Б., Мищенко Н.П., Кольцова Е.А., Федорев С.А., Красновид Н.И., Лебедев А.В. (1997) Эксп. клин. фармакол., 60(6), 21-24.
10. Закирова А.Н., Лебедев А.В., Кухарчук В.В., Мищенко Н.П., Федорев С.А. (1996) Тер. Арх., 68(8), 12-14.
11. Богуславская Л.В., Храпова Н.Г., Максимов О.Б. (1985) Изв. АН СССР Сер. хим., № 7, 1471-1476.

12. Лебедев А.В., Богуславская Л.В., Левицкий Д.О., Максимов О.Б. (1988) Биохимия, **53**(4), 598-603.
13. Кольцова Е.А., Денисенко В.А., Максимов О.Б. (1978) Химия природ. соед., № 4, 438-441.
14. Beauchamp, C. Fridovich, I. (1971) Anal Biochem, **44**(1), 276-287.
15. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. (1974) Курс химической кинетики, «Высшая школа», М., С. 218-235.
16. Bielski B.H., Shiu G.G., and Bajuk S. (1980) J. Phys. Chem. **364**, 233-235.
17. Bielski, B.H., Gabelli, D.E. (1991) Int. J. Radiat. Res. **59**(2), 291-319.
18. Маршелл Э. (1981) Биофизическая химия. Принципы, техника и приложения, Т. 1, «Мир», М., с. 87-91

Поступила 16.10. 98г.

# **WEAK ACID PROPERTIES OF HYDROXYLATED NAPHTHAZARINS AND THEIR REACTION WITH SUPEROXIDE ANION-RADICAL**

A.V. LEBEDEV, M.V. IVANOVA, N.I. KRASNOVID, E. A. KOLTZOVA.

Cardiology Research Centre.

Moscow, 121552, 3'd Cherepkovskaya Pacific Institute Bioorganic Chemistry. Vladivostok

Weak acid properties, autoxidation and interaction of natural polyhydroxyl,4-naphthoquinones (PHNQ) with superoxide anion-radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) were studied by methods of potentiometric titration, polarography, and UV- and visible spectrophotometry. Sea urchin pigments 3-acetyl-2,6,7-trihydroxynaphthazarin (spinochrome C), 2,3,6,7-trihydroxynaphthazarin (spinochrome D), 2,3,6,7-trihydroxynaphthazarin (spinochrome E), 6-ethyl-2,3,7-trihydroxynaphthazarin (echinochrome A), synthetic 2,3-dihydroxy-6,7-dimethylnaphthazarin and 6-ethyl-2,3,7-trimethoxynaphthazarin (trimethoxyechinochrome A) were tested. Determined dissociation constants ( $pK_i$ ) were in the range of pH 5,3 - 8,5 (40% ethanol solvent). PHNQ autoxidation observed in basic pH were inhibited by superoxide dismutase. Xanthine and xanthine oxidase was applied for  $O_2^{\bullet-}$  generation. Interaction with  $O_2^{\bullet-}$  led to sufficient time-dependent changing in spectra of echinochrome A, spinochromes D and E. There was weak  $O_2^{\bullet-}$  influence on spinochrome C spectrum and no changing in trimethoxyechinochrome A spectrum. The spectra, that were transforming during time of reaction, contained pronounced isobestic point. It means formation the single reaction product. We proposed formation of 1,2,3,4-tetraketones from 2,3,5,8-tetrahydroxy-1,4-naphthoquinones (echinochrome A, spinochromes D and E) due to  $O_2^{\bullet-}$ -induced oxidation of their OH-groups in 2 and 3 positions. Reaction constants were determined by competition method using nitro blue tetrazolium (NBT). The reaction constants were about  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . They were decreased in the order: echinochrome A > spinochrome D > spinochrome C > NBT > trimethoxyechinochrome A. Thus, we concluded that some of the natural PGNQ, containing hydroxyl groups in 2nd and 3rd positions, could operate as powerful superoxide anion-radical scavengers.

**Key words:** polyhydroxyl,4-naphthoquinones, superoxide anion-radical, reaction constants, (spinochrome C), (spinochrome D), (spinochrome E), (echinochrome A), dissociation constants.