

УДК 577.3:577.3'1:577.32:615.07

©Сирота

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ СКОРОСТИ СУПЕРОКСИДГЕНЕРИРУЮЩЕЙ РЕАКЦИИ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА, ИСПОЛЪЗУЕМОЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРО/АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ

*Т.В. Сирота*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
142290, Пушкино, Московская область, ул. Институтская, 3; эл. почта: sirotatv@rambler.ru

Супероксидгенирующая реакция автоокисления адреналина используется для определения активности супероксиддисмутазы и выявления про/антиоксидантных свойств различных материалов. Существуют два варианта спектрофотометрической регистрации образования продуктов этой реакции. Первый заключается в регистрации образования адrenoхрома – продукта окисления адреналина при длине волны 347 нм. Второй предусматривает добавление в реакционную смесь нитросинего тетразолия (НСТ) и регистрацию накопления диформаза (продукта восстановления НСТ) при 560 нм. В настоящей работе предлагаются рекомендации для стандартизации скорости реакции в каждом из этих вариантов. Основной подход в решении этой задачи – применение фармацевтической формы 0,1% раствора адреналина гидрохлорида. Кинетики окисления имеющихся в аптечной сети двух форм препарата имеют свои особенности, но, согласно проведенным исследованиям, оба препарата можно использовать в работе. Проводя измерения при длине волны 560 нм, можно регулировать скорость реакции снижением концентрации добавляемого адреналина, в то время как на длине волны 347 нм это делать нельзя. Представленные характеристики реакции автоокисления адреналина отражают как многостадийный химический процесс превращения адреналина в адrenoхром, так и сопряженный с ним переход электронов от адреналина и промежуточных продуктов его окисления на растворенные в среде кислород, диоксид углерода и карбонат-бикарбонатные ионы. Это приводит к образованию соответствующих радикалов, выявляемых при добавлении НСТ.

**Ключевые слова:** адреналин, адrenoхром, супероксид, нитросиний тетразолий, супероксиддисмутаза

**DOI** 10.18097/PBMC20166206650

### ВВЕДЕНИЕ

Неферментативное окисление адреналина по так называемому хиноидному пути *in vitro* происходит в щелочной среде с образованием адrenoхрома, супероксидных радикалов ( $O_2^{\cdot-}$ ) [1-5], а также радикальных соединений карбонат-бикарбонатных анионов и диоксида углерода [6, 7].

Впервые реакцию автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) использовали Fridovich и соавтр. [8]. СОД, перехватывая  $O_2^{\cdot-}$ , тормозит накопление адrenoхрома, спектрофотометрическая регистрация которого проводилась при длине волны 480 нм. По степени ингибирования скорости образования адrenoхрома, определяли активность фермента [8].

Нами были выявлены новые свойства этой реакции и разработаны новые подходы, позволяющие оценивать активность СОД, выявлять про/антиоксидантные свойства различных биологических материалов и химических веществ. Для спектрофотометрической регистрации образования адrenoхрома предложена иная длина волны (347 нм) [7, 9, 10]. При использовании в реакционной смеси нитросинего тетразолия (НСТ) можно непосредственно регистрировать образование  $O_2^{\cdot-}$  по накоплению диформаза, продукта восстановления НСТ [7, 11]. Кроме того активность СОД в системе автоокисления адреналина можно определять

полярографически [7, 12]. В любом варианте используемого метода активация скорости реакции в присутствии исследуемого материала оценивается как прооксидантный эффект, ингибирование её – как антиоксидантный. Более информативным и перспективным, по нашему мнению, является применение в данной реакции НСТ [11]. Этот новаторский подход пока недостаточно оценен, и многие авторы цитируют нашу раннюю работу [9], где для спектрофотометрического определения активности СОД используется длина волны 347 нм (по данным РИНЦ, она процитирована более 160 раз).

Поскольку применение реакции автоокисления адреналина в нашей разработке получило широкое распространение, и у нас накопился достаточный экспериментальный материал, представляется необходимым дать практические рекомендации по её корректному и максимально информативному использованию.

Как известно, процесс автоокисления адреналина является цепной реакцией и подчиняется соответствующим характерным закономерностям, описанным для цепных реакций [13, 14]. Ингибиторный анализ занимает важное место в исследовании таких явлений. СОД и препараты с антиоксидантными свойствами являются ингибиторами супероксидгенирующей реакции автоокисления адреналина. Для корректного определения изучаемых показателей и использования

минимальных количеств исследуемых веществ – потенциальных ингибиторов, необходимо работать с определённой заданной скоростью реакции в контрольной пробе (в отсутствии исследуемых веществ). Ингибирующее действие исследуемых материалов при этом не должно быть более 50%, что достигается внесением различных количеств исследуемого материала, но не его разведением. Это важно при работе с биологическими жидкостями и фармацевтическими препаратами (настойки, экстракты и т.д.).

Ранее мы также отмечали, что при высоких скоростях развивающегося цепного процесса достичь ингибирования реакции бывает сложно [11]. Так, при работе с НСТ для снижения скорости реакции были изменены условия её проведения: pH буфера был снижен с 10,55 до 9,7 и в 4 раза уменьшена концентрация адреналина – и только тогда было достигнуто ингибирование реакции коммерческим препаратом СОД [11].

Основная цель настоящей работы – стандартизация скорости реакции автоокисления адреналина в так называемой “контрольной пробе”. Количественная оценка эффекта действия исследуемых материалов рассчитывается от величины заданной скорости в этой пробе. Рекомендации по ограничению скорости супероксидгенирующей реакции оговариваются не только в нашей работе для реакции автоокисления адреналина [11], но и при использовании супероксидгенирующей системы ксантин-ксантиоксидаза [15], ФМС/NADH [16].

В процессе решения поставленной задачи выявился ещё один важный аспект. В нашей методике используется фармацевтическая форма 0,1% раствора адреналина гидрохлорида Московского эндокринного завода (Адр-МЭЗ). Применение готового фармацевтического препарата имеет существенные преимущества в сравнении с коммерческим “Sigma”: исключается процедура приготовления раствора и капризное доведение pH до величины 2,5-4,0 и не выше. В настоящее время в аптечной сети появился и иной препарат – 0,1% раствор адреналина гидрохлорид-Виал (Адр-Виал), производитель Китай, имеющий, как оказалось, некоторые особенности. Рекомендации по применению препарата Адр-Виал в нашей методике представлены в данном исследовании.

## МЕТОДИКА

Спектральные исследования автоокисления адреналина проводили в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,5-10,65, на спектрофотометре Unikon 923 (Италия) в режиме “time Driver” при комнатной температуре по протоколу, описанному ранее [9, 10, 11, 17]. Образование аденохрома регистрировали при 347 нм [7, 9, 10, 17] и при 560 нм – образование диформаза (продукта восстановления НСТ) [7, 11]. Реакцию начинали внесением адреналина гидрохлорида в буфер при постоянном его перемешивании. При регистрации образования аденохрома добавляли следующие концентрации адреналина: 28,8 мкМ, 57,5 мкМ, 0,115 мМ и 0,23 мМ.

При регистрации образования диформаза адреналин добавляли в концентрациях 28,8 мкМ и 57,5 мкМ. НСТ (25 мкМ) вносили в кювету с карбонатным буфером до адреналина. Время регистрации 3 мин, 10 мин и 20 мин.

Скорость реакции образования аденохрома или диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени и рассчитывали по формуле:  $\Delta E/\Delta t = (E_t - E_1)/\Delta t$ , где  $E_1$  – регистрируемая оптическая плотность при длине волны 347 или 560 нм сразу же после внесения адреналина,  $E_t$  – оптическая плотность через время  $\Delta t$ , в течение которого регистрируется автоокисление адреналина (обычно в продолжение 3 или 4 мин).

В работе использовались реактивы:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , адреналин (эпинефрин) и нитросиний тетразолий “Sigma” (США),  $\text{NaHCO}_3$  “J. T. Baker” (Голландия), две фармакопейные формы 0,1% раствора адреналина гидрохлорида выпускаемого Московским эндокринным заводом (Федеральное государственное унитарное предприятие “Московский эндокринный завод”) и адреналина гидрохлорид-Виал (производитель Шаньдун Шэнлу Фармасьюттикал Ко., Лтд. Китай).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (программы Microsoft Excel): определяли среднее значение (M), стандартное отклонение (SD). Представленные данные являются средними значениями, полученными в независимых экспериментах при 3-6 параллельных измерениях в каждом опыте.

0,2 М карбонатный буфер готовили из  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH до необходимой величины устанавливали добавлением к раствору сухого  $\text{NaHCO}_3$ . Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование фармацевтического препарата адреналина – важная наша экспериментальная находка, способствующая стандартизации параметров реакции автоокисления адреналина, поскольку в работе используется уже готовый раствор с заданной концентрацией, хранящийся в запаянной ампуле из тёмного стекла в небольшом объёме (1 мл). Применение аптечной формы 0,1% адреналина со всеми присутствующими в нём компонентами, называемыми “вспомогательные вещества” (см. таблицу), позволяет, таким образом, иметь стабильный раствор. Именно с таким реактивом и “работает” наша методика. В таблице также представлен перерасчёт этих соединений в молярной концентрации. Обращает на себя внимание высокое содержание глицерина – 650 мМ. Аптечная форма раствора адреналина – сложный многокомпонентный препарат с чётко стандартизированной концентрацией адреналина, удобный для работы и с надёжным способом его сохранения. Всё это позволяет иметь стабильные параметры скорости и лаг-периода в кинетике автоокисления адреналина. Препарат Московского эндокринного завода (Адр-МЭЗ) постоянно нами используется с начала работы [9, 10].

Таблица. Вспомогательные вещества в фармацевтических препаратах “Адреналин” Московского эндокринного завода (Адр-МЭЗ) и “Адреналин гидрохлорид-Виал”, Китай (Адр-Виал)

Состав:	Адр-МЭЗ, мг/мл	Адр-МЭЗ, мМ	Адр-Виал, мг/мл
Эпинефрин (адреналин)	1	5,5	1
Натрия хлорид	8	136,8	Концентрация не указана
Натрия дисульфит (натрия метабисульфит)	1	5,3	Концентрация не указана
Хлоробутанол гемигидрат (Хлоробутанолгидрат)	5	28,2	-
ЭДТА- $\text{Na}_2$ (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты)	0,5	1,3	-
ЭДТА (кислота)	-	-	Концентрация не указана
Глицерол (глицерин)	60	651,5	-
Хлористоводородная кислота (HCl)	до pH 2,5-4,0	до pH 2,5-4,0	не указан pH
Вода для инъекций	до 1 мл	до 1 мл	до 1 мл

Примечание: (-) - вещество отсутствует.

С 2014 года в аптечной сети стал появляться препарат 0,1% раствора адреналина гидрохлорида другого производителя под торговой маркой “Адреналин-Виал” (Адр-Виал). В отличие от Адр-МЭЗ, для Адр-Виал прописаны вспомогательные вещества, но без указания их концентраций. Кроме того, два компонента, глицерин и хлоробутанол, имеющиеся в Адр-МЭЗ, в препарате Адр-Виал отсутствуют (таблица). Другими словами, аптечные препараты 0,1% адреналина гидрохлорида разных производителей по составу вспомогательных веществ не идентичны. Поскольку Адр-Виал постоянно имеется в аптечной сети, мы стали использовать и его в нашей работе. Однако, как оказалось, кинетика реакции автоокисления адреналина, содержащегося в этой фармацевтической форме, существенно отличается от кинетики автоокисления Адр-МЭЗ (рис. 1 А и Б). Это различие связано, прежде всего, с отсутствием лаг-периода и с более высокой скоростью реакции при автоокислении Адр-Виал в сравнении с Адр-МЭЗ. Постоянно работая с препаратом Адр-МЭЗ, ещё ранее мы показали, что окисление добавляемого в щелочной карбонатный

буфер 0,23 мМ адреналина происходит с лаг-периодом в первые секунды и с последующим линейным продолжением. Эти результаты представлены на рисунках 1А (кривые 1-4) и 1Б (кривые 1-2). При автоокислении Адр-Виал лаг-период отсутствует, кинетика процесса линейна в продолжение всего времени регистрации (рис. 1А, кривые 5-9; рис. 1Б, кривые 3-4), и скорость реакции существенно выше по сравнению со скоростью окисления Адр-МЭЗ. Следует отметить, что содержание самого адреналина в обоих этих препаратах соответствует 0,1% или 5,5 мМ: спектры поглощения в области 280 нм практически идентичны (данные не представлены).

Кинетика образования диформаза (560 нм) в процессе автоокисления Адр-МЭЗ и Адр-Виал представлена на рисунке 2. В отличие от кинетики образования адренохрома (рис. 1), кинетика образования диформаза при окислении Адр-МЭЗ и Адр-Виал сходна, линейна, лаг-период не обнаруживается и интенсивность реакции зависит только от концентрации (рис. 2). Регулировать скорость реакции в этих условиях можно путём изменения концентрации адреналина.

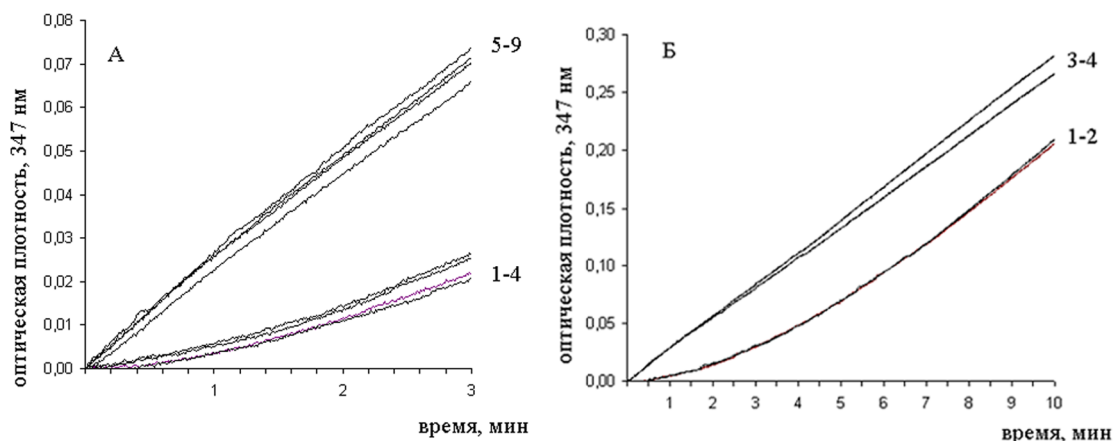
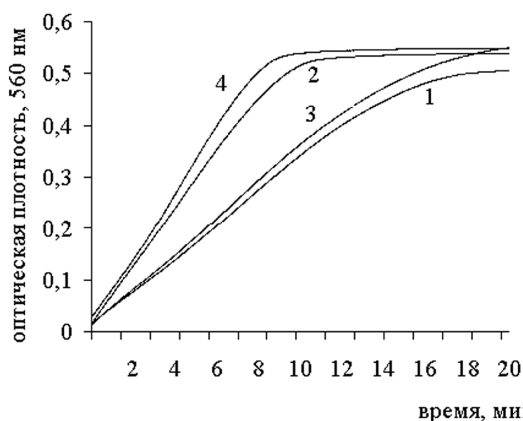


Рисунок 1. Кинетики образования адренохрома в течение 3 мин (А) и 10 мин (Б) в реакции автоокисления 0,23 мМ Адр-МЭЗ (А - кривые 1-4, Б - кривые 1-2) и 0,23 мМ Адр-Виал (А - кривые 5-9, Б - кривые 3-4) в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,5. Регистрация при 347 нм, температура 21°C.



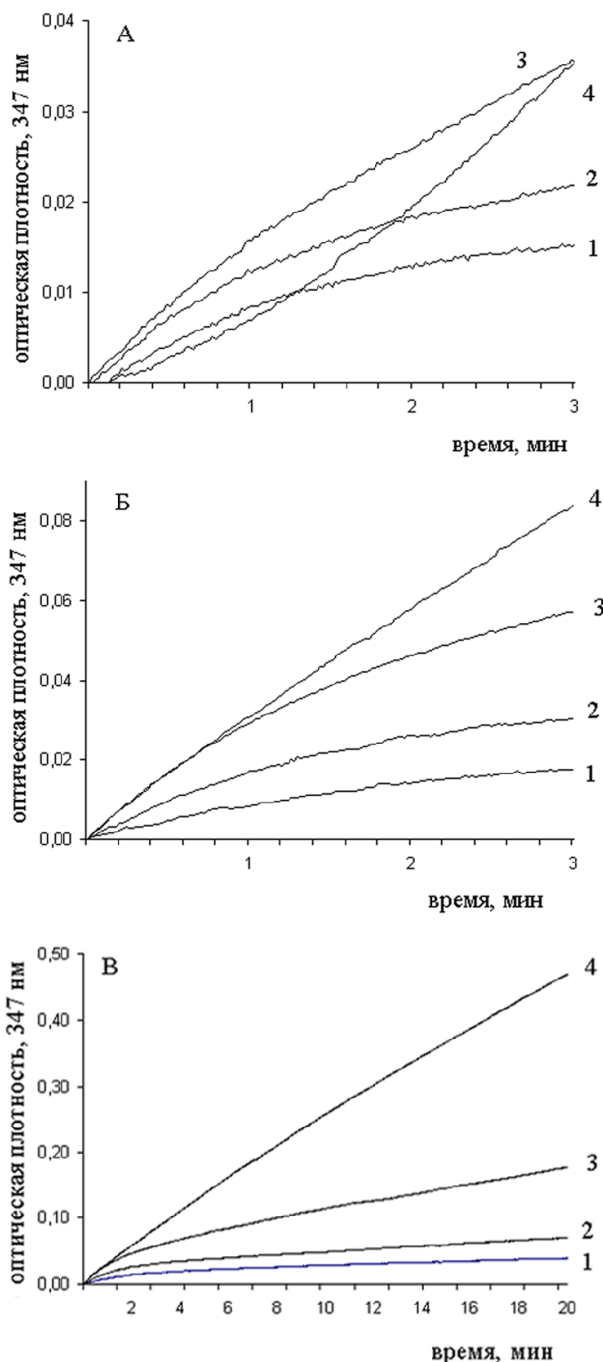
**Рисунок 2.** Кинетики образования диформаза при восстановлении 25 мкМ НСТ в реакции автоокисления 28,8 мкМ и 57,5 мкМ Адр-МЭЗ (кривые 1 и 2) и 28,8 мкМ и 57,5 мкМ Адр-Виал (кривые 3 и 4) в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,5. Регистрация при 560 нм.

При снижении концентрации вносимого в щелочной буфер адреналина (в виде Адр-МЭЗ или Адр-Виал), форма кинетической кривой образования адренохрома существенно меняется, кривая приобретает вид гиперболы на начальном участке с последующим быстрым выходом на плато (рис. 3 А, Б и В, кривые 1-3). Рассчитать величину антиоксидантной или прооксидантной активности в этом случае не представляется возможным. При добавлении в реакционную среду 0,23 мМ адреналина кинетические кривые окисления и Адр-МЭЗ (рис. 3А, кривая 4), и Адр-Виал (рис. 3 Б и В, кривая 4) приобретают “свой” характерный вид, описанный выше (рис. 1 А и Б). На рисунке 3 В представлена 20 мин регистрация автоокисления Адр-Виал, демонстрирующая форму кинетических кривых в течение продолжительного времени.

Таким образом, установлено, что при регистрации образования адренохрома нельзя снижать скорость реакции путём уменьшения концентрации как Адр-Виал, так и Адр-МЭЗ.

Необходимо также отметить, что не следует снижать скорость реакции при автоокислении Адр-Виал ниже 0,02 опт. ед/мин (например, изменением pH буфера), поскольку кинетическая кривая также приобретает вид гиперболы (данные не приводятся).

Проведённые исследования показали, что оба препарата, как Адр-МЭЗ, так и Адр-Виал, могут быть использованы в методике. Однако, работая с препаратами адреналина от разных производителей, которые представлены в аптечной сети, необходимо учитывать, что, регистрируя образование адренохрома, нужно вносить в реакционную систему строго рекомендованную по методике концентрацию адреналина (0,23 мМ) и не меньше. Скорость реакции для Адр-Виал должна быть в пределах 0,03-0,06 опт. ед/мин. Используя НСТ, можно регулировать скорость реакции, варьируя количество добавляемого адреналина, и можно изменять величину pH буфера, что делалось ранее [11], при этом линейность процесса сохраняется.



**Рисунок 3.** Кинетики образования адренохрома в реакции автоокисления при разных концентрациях адреналина: 1 - 28,8 мкМ, 2 - 57,5 мкМ, 3 - 0,115 мМ, 0,23 мМ. А - Адр-МЭЗ, Б и В - Адр-Виал. Время регистрации - 3 мин (А и Б) и 20 мин (В). Условия проведения реакции как на рисунке 1.

С практической точки зрения, для удобства расчёта скоростей реакции использование Адр-Виал предпочтительнее, хотя важный параметр – лаг-период – оказывается потерянным. Мы работаем с любым из этих препаратов, который в данный момент доступен в аптечной сети. Следует отметить, что наличие лаг-периода – важный показатель цепной реакции, характеризующий период инициации реакции. Именно изменение его величины может однозначно указывать на наличие про/антиоксидантных

свойств исследуемого материала. Этот показатель, рассчитанный при исследовании антиоксидантных свойств гидрофобных соединений (масла), был полезен для объяснения полученных результатов [18, 19]. Он также обсуждается в работе [20], где применена наша методика. Наличие лаг-периода может иметь принципиальное значение: укороченный лаг-период или его полное исчезновение в сравнении с “контрольной пробой” указывают на прооксидантный эффект исследуемого образца, а при обнаружении антиоксидантного эффекта лаг-период более продолжительный в сравнении с “контрольной пробой” [18-20].

Различия кинетических кривых образования адренохрома двух фармацевтических форм адреналина, Адр-МЭЗ и Адр-Виал, могут быть связаны с присутствием вспомогательных веществ. Однако решение этого вопроса не является целью данной работы и необходимы дополнительные исследования в этом направлении.

Важный результат настоящей работы – получен ответ: можно использовать в нашей методике оба препарата адреналина представленные в аптечной сети; как Адр-МЭЗ, так и Адр-Виал.

Поскольку в настоящей работе речь идёт о регуляции реакции автоокисления адреналина, необходимо отметить выявленное нами ранее активирующее действие биологически значимых ионов металлов с постоянной валентностью  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  [17, 21]. Известно присутствие  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в биологических материалах, водно-спиртовых экстрактах и т.д.; и это может нивелировать эффект действия других составляющих исследуемого материала при использовании этой модельной супероксидгенирующей системы. Например, в плазме крови (но не сыворотке), содержание ионов кальция может доходить до 2 мМ, и проявляется её активирующее действие [17].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регулируя и стандартизируя скорость реакции автоокисления адреналина, устанавливая её заданные параметры (величина скорости, лаг период, линейный участок кинетической кривой), можно решать разные практические задачи. Учитывая рекомендации настоящей работы и ранние наши публикации, можно определять активность СОД в гемолизате цельной крови, гемолизате отмытых эритроцитов, супернатантах гомогенатов тканей и других биологических жидкостях, а также антиоксидантную и прооксидантную активность фармацевтических форм (настойки, экстракты и т.д.), растворов различных субстанций и веществ, а также гидрофобных препаратов. Ранее было показано, что способность гемолизатов цельной крови ингибировать реакцию автоокисления адреналина зависит от интенсивности этой реакции. Так, образцы крови больных, в отличие от гемолизатов крови здоровых людей, слабее ингибируют окисление адреналина при высокой скорости его автоокисления [22]. Способность ингибировать

высокую скорость автоокисления адреналина была оценена как антиоксидантная мощность. Этот показатель отражал, таким образом, потенциальный антиоксидантный резерв крови больных и здоровых людей. Представленные в работе рекомендации позволяют проводить такие исследования, поскольку можно регулировать параметры реакции и делать необходимые измерения как при длине волны 347 нм, так и 560 нм.

## ВЫВОДЫ

1. При исследовании про/антиоксидантных свойств различных материалов, используя реакцию автоокисления адреналина, необходимо стандартизовать скорость реакции в “контрольной пробе”.

2. Можно работать как с Адр-МЭЗ, так и Адр-Виал, имеющимися в аптечной сети.

3. При работе на длине волны 347 нм добавка адреналина как Адр-МЭЗ, так и Адр-Виал должна быть только 0,23 мМ, то есть 100 мкл из ампулы в 2 мл буфера и скорость реакции не должна быть ниже 0,02 опт.ед/мин при использовании Адр-Виал. Рекомендуемый диапазон для определения антиоксидантной активности должен быть 0,03-0,06 опт.ед/мин, антиоксидантной мощности не менее 0,1 опт.ед/мин.

4. При регистрации диформаза (применение НСТ, длина волны 560 нм) кинетика автоокисления адреналина всегда линейна, и можно создавать более мягкие условия для исследования про/антиоксидантных свойств различных материалов: снижать рН карбонатного буфера и менять концентрацию адреналина.

*Работа частично поддержана грантом РФФИ №14-04-01517а.*

*Автор благодарит Н.Е. Лямину за техническую помощь в работе.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bindoli A., Rigobello M.P., Galzigna L. (1989) Toxicol. Lett., **48**, 3-20.
2. Marques F., Duarte R.O., Moura J.J., Bicho M.P. (1996) Biopl. Signals., **5**, 275-282.
3. Smythies J., Galzigna L. (1998) Biochim. Biophys. Acta., **1380**, 159-162.
4. Jomova K., Valko M. (2011) Toxicology, **283** (2-3), 65-87.
5. Bors W., Michel C., Saran M., Lengfelder E. (1978) Biochim. Biophys. Acta, **540**, 162-172.
6. Сирота Т.В. (2015) Биомед. химия, **61**(1), 115-124. DOI: 10.18097/PBMC20156101115
7. Сирота Т.В. (2015) Труды IX Международной конференции “Биоантиоксидант”, Москва, сс. 279-288. ISBN: 978-5-209-06790-0.
8. Misra H.P., Fridovich I.J. (1972) Biol. Chem., **247**, 3170-3175.
9. Сирота Т.В. (1999) Вopr. мед. химии, **45**, 263-272.
10. Сирота Т.В. (1999) Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Патент на изобретение № 2144674.

11. Сирота Т.В. (2013) Биомед. химия, **59**(4), 399-410.  
DOI: 10.18097/pbmc20135904399
12. Сирота Т.В. (2012) Биомед. химия, **58**(1), 77-87.  
DOI: 10.18097/pbmc20125801077
13. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. (1965)  
Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе,  
М.: Наука, с. 13, 203-204.
14. Денисов Е.Т., Саркисов О.М., Лихтенштейн Г.И. (2000)  
Химическая кинетика, М.: Химия, с. 397-413.
15. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Anal. Biochem., **44**,  
276-287.
16. Nishikimi N., Rao N.A., Yagi K. (1972) Biochem. Biophys.  
Res. Commun., **46**, 849-854.
17. Sirota T.V., Lange N.V., Kosjakova N.I. et al. (2000) Current  
Topics Biophys., **24**, 185-189.
18. Semen K.O., den Hartog G.J.M., Kaminsky D.V.,  
Sirota T.V., Maij N.G.A.A., Yelisyeyeva O.P., Bast A.  
(2013) Natural Products Chemistry & Research 2:122.  
doi: 10.4172/2329-6836.1000122
19. Yelisyeyeva O.P., Semen K.O., Ostrovska G.V., Kaminsky D.V.,  
Sirota T.V., Zarkovi N., Mazur D., Lutsyk O.D., Rybalchenko K.,  
Bast A. (2014) Food Chemistry, **147**, 152-159.
20. Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Ветрова Е.Н., Пономарева Н.И.  
(2011) Аналитика и контроль, **15**(2), 202-208.
21. Сирота Т.В. (2016) Биофизика, **61**(1), 22-27.
22. Сирота Т.В., Хундерякова Н.В., Кондрашова М.Н. (2002)  
VI Международная конференция Биоантиоксидант,  
с. 527-528.

Поступила: 18. 05. 2016.  
Принята к печати: 07. 11. 2016.

## STANDARDIZATION AND REGULATION OF THE RATE OF THE SUPEROXIDE-GENERATING ADRENALINE AUTOOXIDATION REACTION USED FOR EVALUATION OF PRO/ANTIOXIDANT PROPERTIES OF VARIOUS MATERIALS

*T.V. Sirota*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; e-mail: sirotatv@rambler.ru

The superoxide-generating reaction of adrenaline autooxidation is widely used for determination of the activity of superoxide dismutase and pro/antioxidant properties of various materials. There are two variants of the spectrophotometric registration of the products of this reaction. The first is based on registration of adrenochrome, as adrenaline autooxidation product at 347 nm; the second employs nitro blue tetrazolium (NBT) and registration of diformazan, a product of NBT reduction at 560 nm. In the present work, recommendations for the standardization of the reaction rate in both variants have been proposed. The main approach consists in the use of the pharmaceutical form of 0.1% adrenaline hydrochloride solution. Although each of two adrenaline preparations available in the Russian market has some features in kinetic behavior of its autooxidation; they are applicable in the superoxide generating system based on adrenaline autooxidation. Performing measurements at 560 nm, the reaction rate can be regulated by lowering the concentration of added adrenaline, whereas during spectrophotometric registration at 347 nm, this cannot be done. These features of adrenaline autooxidation may be due to the fact that the intrinsic multistage process of the conversion of adrenaline to adrenochrome, which is recorded at 347 nm, is coupled with the transition of electrons from adrenaline and intermediate products of its oxidation to oxygen, carbon dioxide, and carbonate bicarbonate ions, which is detected in the presence of added NBT.

**Key words:** adrenaline (epinephrine), adrenochrome, superoxide, nitro blue tetrazolium, superoxide dismutase