

**Szerkezet, elektrokémiai tulajdonság és antioxidáns
kapacitás közötti összefüggések vizsgálata
katekolaminok esetében**

Szerző:

Silai Elisabeta Ileana

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Vegyészmérnöki Departman,
Vegyészmérnöki VI. Év

Témavezető:

dr. ing. Turdean L. Graziella,

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Vegyészmérnöki Departman

Absztrakt

Izoprenalin, adrenalin, levonordefrin, noradrenalin, dopamin, d-dopa és karbidopa redox folyamatait vizsgáltuk ciklikus és négyszöghullám voltammetria segítségével. A szerves vegyületek oxidációs folyamatainak elektrokémiai vizsgálata segíthetnek megérteni ezen vegyületek metabolizmusát az élő szervezetekben. A katekolaminok grafit elektródnál történő redox reakciói kvázi reverzibilis diffúzió által kontrollált folyamatok. Megállapíthatjuk hogy az oxidációs potenciál és az antioxidáns hatékonyság fordítottan arányos; az oxidációs potenciál csökkenése az antioxidáns hatékonyság növekedését idézi elő, a következő sorrendben: norepinefrin < levonordefrin < epinefrin < izoprenalin vagy carbidopa < d-DOPA < dopamin. Mindkét sorozatot az –OH és –NH₂ csoportok para – alkil szubsztituenseinek helye meghatározó szerepet tölt be.

1. Bevezetés

A szabad gyökök igen reaktív molekulák, amelyek a redox reakciók által jönnek létre : élelmiszerekben, szerves anyagokban, valamint az szervezetekben is. Reaktív szabad gyökök és reaktív oxigént tartalmazó gyökök (ROS) amelyek megtalálhatóak a biológiai szervezetekben különböző folyamatokban vehetnek részt: (i) oxidálhatják a nukleinsavakat, fehérjéket és lipideket, mint egy része a sejt normális anyagcseréének vagy (ii) befolyásolhatják a szabad-gyök általmediált betegségeket, mint a cukorbetegség, rák, reuma, veseelégtelenség, szív- és érrendszeri, gyulladások, fertőzések és neurológiai betegségek [1].

A legfontosabb szabad gyökök csoportba sorolhatóak a a biológiailag szempontból jelentős úgynevezett reaktív oxigént tartalmazó gyökök (ROS), amelyeket az élő szervezet generál (a szuperoxid aniont ($O_2^{\bullet -}$), szinglett oxigént (O_2^1), hidrogén-peroxidot (H_2O_2), hipoklórossavat (HOCl), hidroxil gyököt ($OH^{\bullet}$), peroxinitritet ($ONOO^-$), peroxilt ($ROO^{\bullet}$) és alkoxilt ($RO^{\bullet}$)). Ezek a vegyületek az antioxidánsokkal való kölcsönhatás következtében távoznak az élő szervezetekből. Ebből kifolyólag az antioxidánsok jelentős mértékben késleltetik vagy megakadályozzák a könnyen oxidálható anyagok oxidációját.

Az antioxidánsok két csoportra oszthatóak molekula tömegük függvényében (i) alacsony molekulatömegű vegyületek (például E- és C- vitamin, B- karotin, glutatoin, húgysav, bilirubin, stb.) és (ii) a nagy molekulatömegű vegyületek (pl. fehérje albumin,

transzferrin, cöruoplazmin, ferritin, szuperoxid-dizmutáz, glutation-peroxidáz, kataláz, stb.)

A teljes antioxidáns kapacitás (TAC) az antioxidáns enzimek és az antioxidánsok közötti teljes tevékenység kifejezése. Az antioxidáns kapacitás meghatározását már széles körben vizsgálták a hagyományos analitikai technikákkal, mint például: spektrofotometriával, fluoreszcenciával vagy kromatográfiával. Az elmúlt években, az elektrokémiai módszerek új lehetőségeket nyújtottak az antioxidáns kapacitás vizsgálatára.

A polifenol természetüknek köszönhetően, a katekolaminok egy olyan vegyületcsoport, amely nagymértékű természetes antioxidáns hatékonysággal bír. A katekolaminok gyorsan reagálnak a ROS-sel, csökkentve ezek toxikus hatást valamint megakadályozzák a szabad gyökök láncreakciójának a kialakulását a szervezetben. Antioxidáns hatásuk a gyökfogó és fém-kelátképző tulajdonságuknak köszönhető [2]. A benzol gyűrűk és a hidroxilcsoportok együttes jelenléte lehet az oka az antioxidáns funkció kialakulásának, amelyet in vitró, vagy mint szabad rendszer elemeként jelenhet meg mint peroxid aniont fogó rendszer, a peroxid-gyökök a lipidek és a szabad gyökök stabilitása a hidrogénezés révén végbemenő oxidációs folyamatokban [3].

A dolgozat célja az, hogy kapcsolatot teremtsünk: a kémiai szerkezet, az elektrokémiai paraméterek (formális és standard potenciál), valamint a katekolaminok (izoprenalin, adrenalin, levonordefrin, levonordefrin, dopamin, d-dopa és karbidopa) antioxidáns aktivitása között, különböző elektrokémiai módszerek használatával (ciklikus voltammetria és négyszög hullám voltammetria). A grafit elektródán lezajló elektrokémiai folyamatok tanulmányozásakor alkalmazott kísérleti paraméterek (pásztázási sebesség és frekvencia) lehetővé tették a redox folyamatok kinetikájának és mechanizmusának a megértését.

2. Mérési módszerek és reagensek

2.1. Reagensek

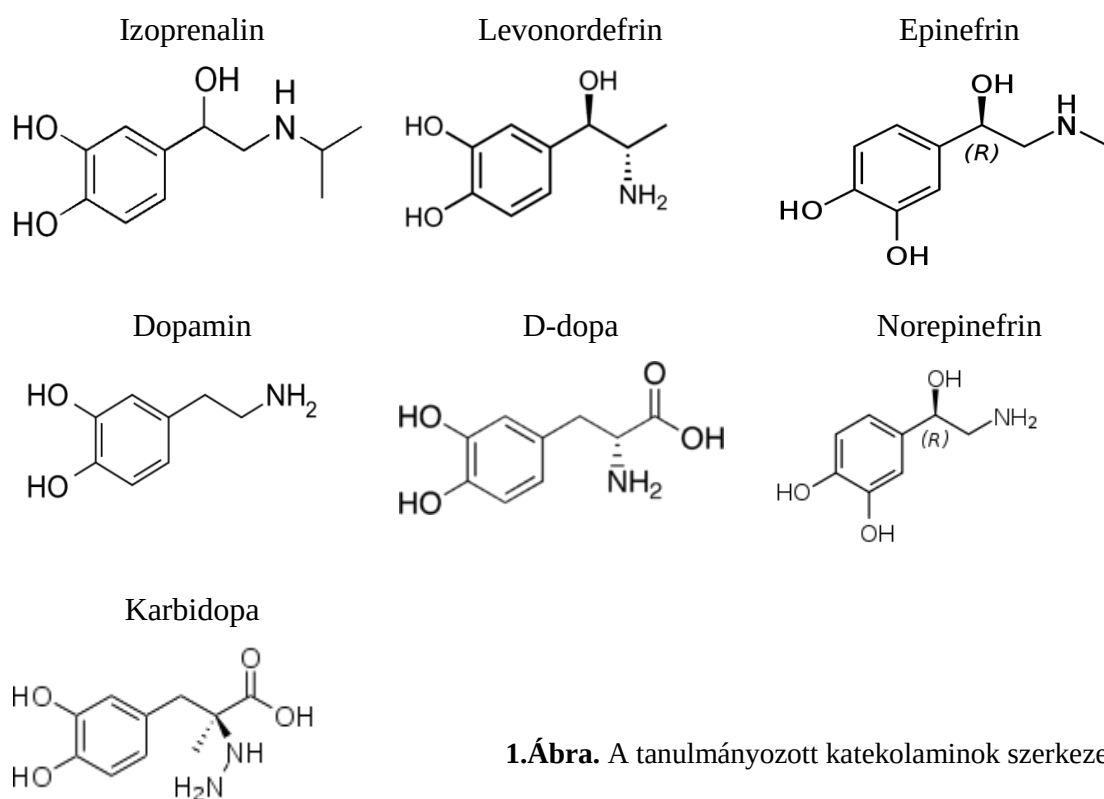
Az alábbi, különböző számú -OH és -NH₂ csoportokat tartalmazó vegyületeket alkalmaztuk:

- 4 - [1-hidroxi-2-(izopropilamino) etil] Benzen-1 ,2-diol (izoprenalin),
- (R) -4 - (1-hidroxi-2-(metilamino) etil) Benzen-1 ,2-diol (epinefrin),
- 4 - [(1R, 2S)-2-amino-1-hidroxi-propil]-benzol-1,2-diol (levonordefrin),

- 4 - [(1R)-2-amino-1-hidroxi-etil]-benzol-1,2-diol (norepinefrin),
- 4 - (2-aminoetil) Benzen-1,2-diol) (dopamin) és az
- (R)-2-Amino-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-propánsav-(d-DOPA)
- (2S) -3 - (3,4-dihidroxi-fenil)-2-hidrazino-2-metil-propionsav (karbidopa)

A fent látható anyagokból (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim Németország) 10^{-3} M-ös oldatokat állítottunk elő 0,1M-ös foszfát – puffer - oldattal (pH 7). A 0,1 M-ös foszfát puffer oldat készítésére megfelelő mennyiségű Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim Németország) oldottunk desztillált vízben. Az összes oldat elkészítéséhez desztillált vizet használtunk.

A vizsgált vegyületek szerkezetei az 1. ábrán láthatóak.



1.Ábra. A tanulmányozott catekolaminok szerkezetei

2.2. Mérési módszerek

A vizsgált vegyületek elektrokémiai viselkedésének a tanulmányozására ciklikus voltammetriát (CV) valamint négyszög hullám voltammetriát (SWV) használtunk. A méréseket egy számítógép-vezérelt potenciosztát – Autolab (PGStat10, EcoChemie, Hollandia) segítségével végeztük el. A standard elektrokémiai cella három elektródot tartalmazott: grafit munkaelektrod (Ringsdorff, Németország) (0,3 cm átmérőjű), Ag /

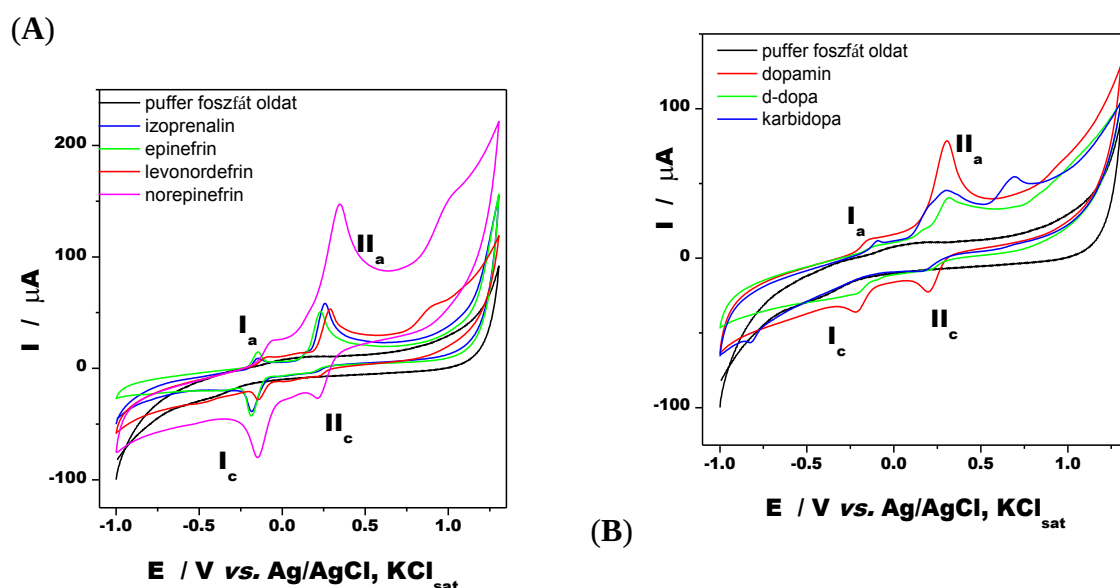
AgCl, KCl_{tel} referencia elektród (Radiometer, Franciaország) és kiegészítő vagy segéd elektródként használt Pt huzal. A munkaelektrodót alumínium porral tükör tisztára csiszoltuk minden kísérletet megelőzően

3. Kísérleti eredmények és megbeszélések

3.1. Ciklikus és négyszöghullám voltametria

A katekolaminok grafit elektródon végbemenő elektrokémiai redox reakcióit ciklikus voltammetriával (CV) és négyszöghullám voltammetriával (SWV) tanulmányoztuk.

A 2.A és a 2.B ábrán látható ciklikus voltammogramokat 10^{-3} M katekolaminos puffer oldatban mértük.

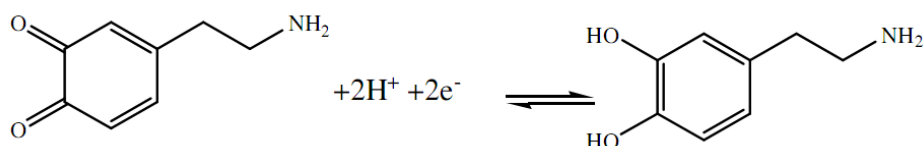


2. Ábra Grafit elektróddal végzett ciklikus voltammogramok, A: izoprenalin 10^{-3} M, epinefrin, levonordefrin, norepinefrin és B: dopamin, d-DOPA, carbidopa.

Kísérleti körülmények: elektrolit, 0,1 M foszfát-puffer-oldat (pH=7)(vékony folytonos vonal), kiinduló potenciál -1 V vs. Ag/AgCl, KCl_{tel}, pásztázási sebesség 50 mV/s.

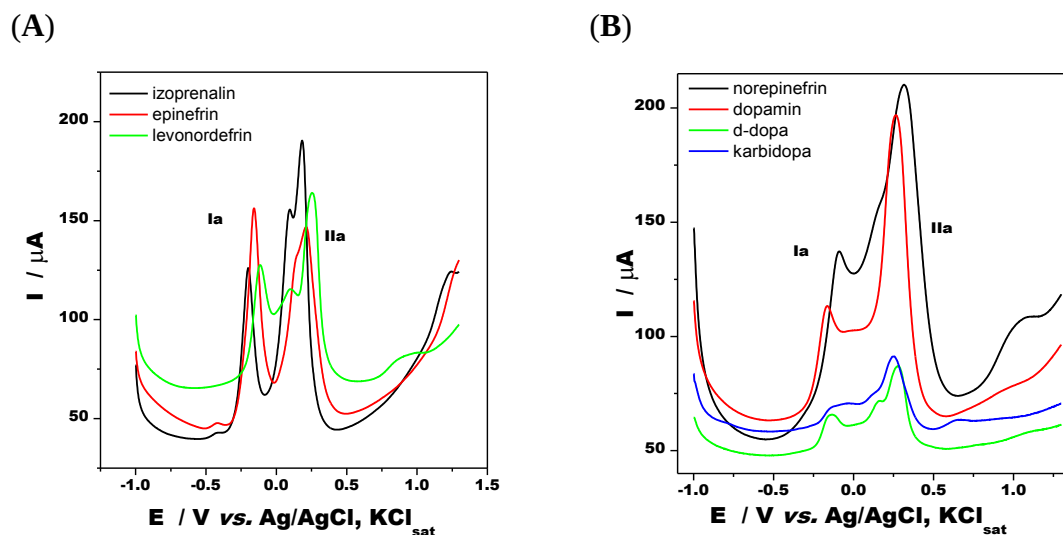
A tanulmányozott potenciál intervallumon belül, amelyben a katekolaminok redox viselkedését tanulmányoztuk, az elektrolit oldat nem mutat jellegzetes redox csúcsokat, ugyanakkor megfigyelhető a jellegzetes kapacitív áramon amely az elektromos kettős réteg feltöltődéséből származik (fekete vonal, a 2A. és 2B.)

A dopamin esetében a ciklikus voltamogrammon megjelenő két pár redox csúcs két proton és két elektron redox reakciót képvisel (3. Ábra), amely a dopamin tipikus redox reakciója. [4, 5]:



3. Ábra A dopamin redox reakciója

Érdemes megemlíteni, hogy az első vagy a második anódos vagy katódos csúcs intenzitása sokkal kisebb, mint a tükörképének az egyik megfelelője, bizonyítva a vizsgált katekolaminos vegyületek kvázi-reverzibilis redox viselkedését. A négyszöghullám voltammetriát választottuk a katekolaminok tanulmányozására, mivel a legfejlettebb és a legkifinomultabb pulzus voltammetriás technikák közé tartozik és mivel jelentős előnyöket mutat a sebesség és az érzékenység terén [6]. A 4. ábra foglalja össze a különböző katekolaminok vizsgálatokor kapott (SW) voltamogrammmokat.



4.Ábra. Grafit elektróddal végzett négyszöghullám voltamogrammmok; (A) izoprenalin 10^{-3} M, adrenalin, levonordefrin és (B) norepinefrin, dopamin, d-DOPA, karbidopa.

Kísérleti körülmények: elektrolit; 0,1 M foszfát-puffer-oldat ($pH=7$); idő intervallum 0,1 s; kezdeti potenciál -1 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} ; pásztázási sebesség 0,00195 V; amplitúdó 50 mV.

A CV és a SWV technikák által tanulmányozott katekolaminok első és második anódos csúcsai, az oxidációs potenciáljuk (E_{pa}) és a becsült formális potenciáljuk ($E^{0'}$) az 1. táblázatban összehasonlítva vannak feltüntetve. A táblázat adatait tanulmányozva megállapíthatjuk, hogy minden esetben, az anódos folyamatokat képviselő I. vagy II csúcsok potenciáljai . legalább 50 mV-al el vannak tolódva negatív potenciál tartomány irányába ez a jelenség megfigyelhető a SWV valamint a CV esetében is.

Elmondható hogy minél alacsonyabb egy anyag vagy vegyület oxidációs potenciálja annál nagyobb az antioxidáns kapacitása, ami azt jelenti hogy könnyebben adományoz elektront, Ugyanakkor fontos kihangsúlyozni, hogy az termodinamikai tulajdonságának köszönhetően, az oxidációs potenciál nem forgalmaz semmilyen információt a reakció sebességét illetően.

A katekolamin származékok amelyek para-alkil szubsztituenseket tartalmaztak , elektron donor szerepet töltenek be, sokkal könnyebben oxidálhatóak . Az oxidálhatóság nagymértékben függ -OH és -NH₂ csoportok a szétálló ágba elfoglalt helyzetétől. Ugyanakkor a kettős kötés (= O) fontosságát bizonyítja a D-DOPA és karbidopa esetében mért legalacsonyabb oxidációs potenciál, ellentétben a kettős kötet (= O) nem tartalmazó dopaminnal ahol az oxidációs potenciál nagyobb volt. [7].

1.Táblázat. A vizsgált katekolaminok elektrokémiai paraméterei.
(Kísérleti körülmények: lásd a 2. és 4. Ábra)

Catechoamini c compounds	CV, $v = 50 \text{ mV/s}$				SWV, $f = 10 \text{ s}^{-1}$	
	Peak Ia		Peak IIa		Peak Ia	Peak IIa
	$E_{pa} /$ V vs. ER	$E^{0'} /$ V vs. ER	$E_{pa} /$ V vs. ER	$E^{0'} /$ V vs. ER	$E_{pa} /$ V vs. ER	$E_{pa} /$ V vs. ER
isoprenaline	-0.150	-0.168	0.255	0.220	-0.201	0.184
epinephrine	-0.146	-0.166	0.230	0.196	-0.159	0.212
levonordefrin	-0.097	-0.119	0.289	0.255	-0.117	0.254
norepinephrine	-0.067	-0.107	0.343	0.285	-0.098	0.315
dopamina	-0.141	-0.178	0.284	0.243	-0.171	0.266
d-DOPA	-0.107	-0.161	0.313	0.260	-0.140	0.275
carbidopa	0.289	0.231	0.685	-	-0.131	0.254

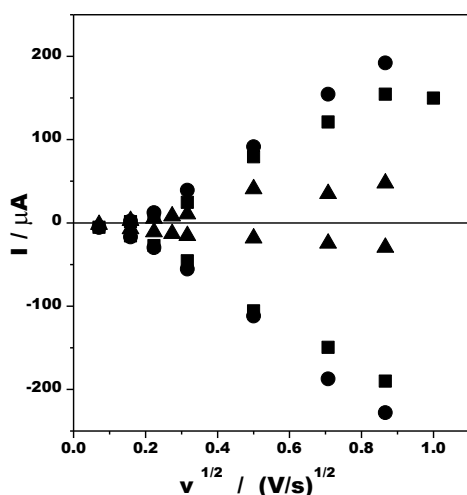
$E^{0'}$ az anódos (E_{pa}) illetve katódos (E_{pc}) csúcs potenciáljainak a számtani közepe.

3.2. A pásztázási sebesség és a frekvencia hatása

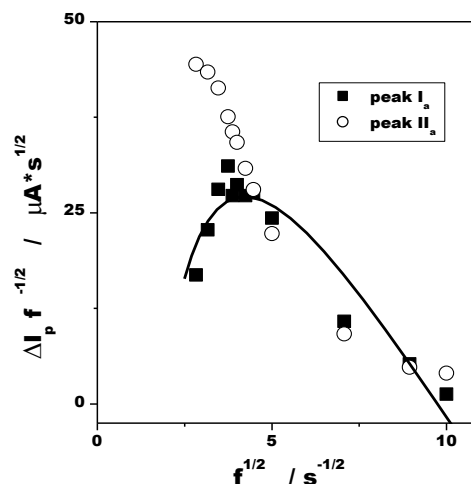
Annak érdekében, hogy megállapítsuk a vizsgált redox reakció típusát ciklikus voltamogrammmokat vettünk fel különböző pásztázási sebességnél. Az összes kísérletben az elektrolit oldat pH értéke 7 volt. A különböző katekolaminok ciklikus voltammogrammjainak a vizsgálatából elmondhatjuk hogy a csúcsáram intenzitása lineáris a pásztázási sebesség négyzetgyökével (5. ábra), ami várható volt egy diffúzió által kontrollált redox folyamat esetében. Ez a jelenség a tanulmányozott katekolaminok gyors elektronleadásnak köszönhető. Amint a 5. ábrán látható, az anódos és katódos csúcs áram aránya állandó különböző pásztázási sebességeknél. Ebből kifolyólag megállapítható, hogy az adott kísérleti körülmények között a lezajló kémiai reakció sebessége nem nagyobb, mint az ezt követő elektron átadás. A feltételezés alapja a kis méretű katekolaminok molekulák, valamint az $-OH$ csoportok para helyzete [4].

Továbbá, az 6. Ábrán látható, a grafit elektródon való 10^{-3} M izoprenalin oxidációja $\Delta I_p f^{1/2} - F^{1/2}$ függvénye. Megjegyzés képpen, a $\Delta I_p f^{-1/2}$ a nett csúcsáramnak felel meg, valamint az ellenállás q paraméterének az $F^{1/2}$. Egy jól látható maximummal társul a $\Delta I_p f^{-1/2}$ vs $F^{1/2}$ dependenciája.

Az 5. ábrán bemutatott adatok érvényesítik az elméletileg megjósolt háló-csúcsáram parabolikus függőségét az ellenállás paraméteren egy reverzibilis elektród reakció esetében vékonyrétegű voltammetriával [8].



5. Ábra. A pásztázási sebesség hatása a csúcs áramerősség I csúcsára egy 10^{-3} M izoprenalin (■) adrenalin (●) és levonordefrin (▲) esetében.
Kísérleti körülmények: lásd a 2. ábrát.



6.Ábra. Az SW frekvencia hatása az SW csúcsáram és a frekvencia négyzetgyöke hányadosára 10^{-3} M izoprenalin oxidálásakor grafit elektródon.

4. Következtetések

A vizsgált katekolaminok redox folyamatait ciklikus és négyszöghullám voltammetria segítségével tanulmányoztuk, két eltérő módszer lehetőséget adott arra hogy megállapítsuk a kutatott vegyületek antioxidáns kapacitását, ugyanakkor a az –OH és –NH₂ csoportok hatását is kihangsúlyozhattuk. Elmondható hogy az oxidációs potenciál csökkenésével nő a katekolaminok antioxidáns kapacitása a következő sorrendben: norepinefrin < levonordefrin < adrenalin < izoprenalin és carbidopa < d-DOPA < dopamin. Figyelembe véve az oxidációs potenciál csökkenését a katekolaminok antioxidáns cselekvőképessége a következő sorrendben növekedik: noradrenalin < levonordefrin < adrenalin < izoprenalin vagy carbidopa < d-DOPA < dopamin és ez arányos a I. csúcs potenciál negatív irányába történő eltolódásával.

A köztes oxidációs termékek fontosságának köszönhetően valamint annak hogy elektrokémiai és más szelektív módszerekkel irányíthatóak, analizálhatóak (pl. potenciosztatikus körülmények között), e vegyületek további vizsgálata szükséges ahhoz hogy elérjék a potenciális alkalmazhatóságukat mind az öregedés és terápiás folyamatokban.

Köszönetnyilvánítás

G.L. Turdean hálás köszönetét fejezi anyagi támogatásával a Romániai Oktatási Minisztériumnak (támogatás PN-II-ID-PCE-2011-3-0366/2012).

5. Hivatkozások

1. Psotova J., Zahalkova J., Hrbac J., Simanek V., Bartek J., *Biomed. Papers*, **2001**, 145, 81-83.
2. Korotkova E. I., Voronova O. A., Dorozhko E. V., *J. Solid State Electrochem.*, **2012**, 16, 2435–2440.
3. Masek A., Zaborski M., Chrzescijanska E., *Food Chemistry*, **2011**, 127, 699–704.
4. Mohammad-Shiri H., Ghaemi M., Riahi S., Akbari-Sehat A., *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2011**, 6, 317 – 336.
5. Chen S.-M., Chen J.-Y., Vasantha V. S., *Electrochim. Acta*, **2006**, 52, 455–465.
6. Li Y., Liu X., Wei W., *Electroanalysis*, **2011**, 23, 2832-2838.
7. Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R., Pizzariello A., *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1481–1489.
8. Mirceski V., Gulaboski R., Scholz F., *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 566, 351-360.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	2
2.	Mérési módszerek és reagensek	3
	2.1. Reagensek	3
	2.2. Mérési módszerek	4
3.	Kísérleti eredmények és megbeszélések	5
	3.1. Ciklikus és négyszöghullám voltametria	5
	3.2. A pásztázási sebesség és a frekvencia hatása	8
4.	Következtetések	9
5.	Hivatkozások	10