

VYUŽITIE UV/VIS SPEKTROSKOPIE PRI STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÝCH VLASTNOSTÍ HYDROXYBENZOOVÝCH KYSELÍN PRI REAKCII S PEROXONITRITOM

BEÁTA VELIKÁ, BEÁTA HUBKOVÁ, MÁRIA MAREKOVÁ a IVAN KRON

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská republika
bvelika@gmail.com

Došlo: 22.7.13, prepracované 27.5.14, prijaté 20.11.14.

Kľúčové slová: voľné radikály, antioxidant, hydroxybenzoové kyseliny, peroxonitrit

Úvod

Vyvážená strava bohatá na ovocie a zeleninu s vysokým obsahom prírodných antioxidantov preukázateľne znižuje riziko vývoja chronických ochorení, akými sú diabetes, koronárna choroba srdca a ciev, rakovina, Alzheimerova choroba, sivý zákal^{1–3}. Hydroxybenzoové kyseliny a ich deriváty, obsiahnuté v mnohých prírodných produktoch vykazujú antioxidačné vlastnosti^{4–8}.

K voľným radikálom a reaktívnym metabolitom, ktoré sú vychytávané hydroxybenzoovými kyselinami, patria najmä voľné radikály a reaktívne metabolity dusíka, ako napríklad oxidy dusíka (NO[•] a NOO[•]), nitrózoperoxylový radikál (ONOO[•]), peroxonitrit (ONOO⁻), ako aj hydroxylový radikál (OH[•]) vznikajúci z kyseliny peroxodusitej^{9,10} (ONOOH). Peroxonitrit, vznikajúci z oxidu dusného a superoxidu, spôsobuje peroxidáciu lipidov a následné bunkové poškodenie, je zodpovedný za inaktiváciu mnohých enzýmov, za aktiváciu signalizácie stresu, uvoľnenie proapoptotických faktorov ako aj za kardiovaskulárnu dysfunkciu pri septickom šoku¹¹.

V predloženej práci popisujeme výsledky reakcií štrnástich derivátov kyseliny benzoovej s peroxonitritom, s cieľom určiť perspektívnu zlúčeninu vhodnú pri predchádzaní oxidačného poškodenia.

Materiál a metódy

Zásobné roztoky: fosforečnanový tlmivý roztok (PBS, $c = 0,05 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7,4); roztok kyseliny chlorovodíkovej (HCl, $c = 0,6 \text{ mol l}^{-1}$); roztok dusitanu draselného (KNO₂, $c = 0,6 \text{ mol l}^{-1}$) roztok hydroxidu sodného (NaOH, $c = 1,2 \text{ mol l}^{-1}$), roztok peroxidu vodíka (H₂O₂, $c = 30\% \text{ v/v}$). Výsledná koncentrácia štandardných roztokov študovaných derivátov kyseliny benzoovej (obr. 1) bola 0,1 % w/w.

Zásobný roztok peroxonitritu bol pripravený vždy pred meraním podľa Beckmana a spol.¹² a pozostával z roztoku peroxidu vodíka v kyseline chlorovodíkovej s prídavkom KNO₂ a NaOH. Takto pripravená zmes bola vymrazená cez noc pri teplote $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Koncentrácia peroxonitritu v zásobnom roztoku bola stanovená výpočtom na základe absorpcie pri vlnovej dĺžke 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$). Na výslednú koncentráciu 0,5 mmol l⁻¹ peroxonitritu bol zásobný roztok riedený fosforečnanovým tlmivým roztokom.

Použitie chemikálie boli čistoty p.a. a na prípravu roztokov bola použitá deionizovaná voda (Simplicity, Millipore, Francúzsko) prebublávaná dusíkom.

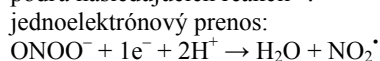
Reakcie vychytávania peroxonitritu boli detegované UV/VIS spektrofotometrom Shimadzu MultiSpec-1501 pri vlnovej dĺžke od 200 nm do 500 nm, v kinetickom režime, počas 60 min, pri teplote $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v reakčnej zmesi 0,5 mmol l⁻¹ peroxonitritu obsahujúcej 0,0025 % w/w študovanej látky.

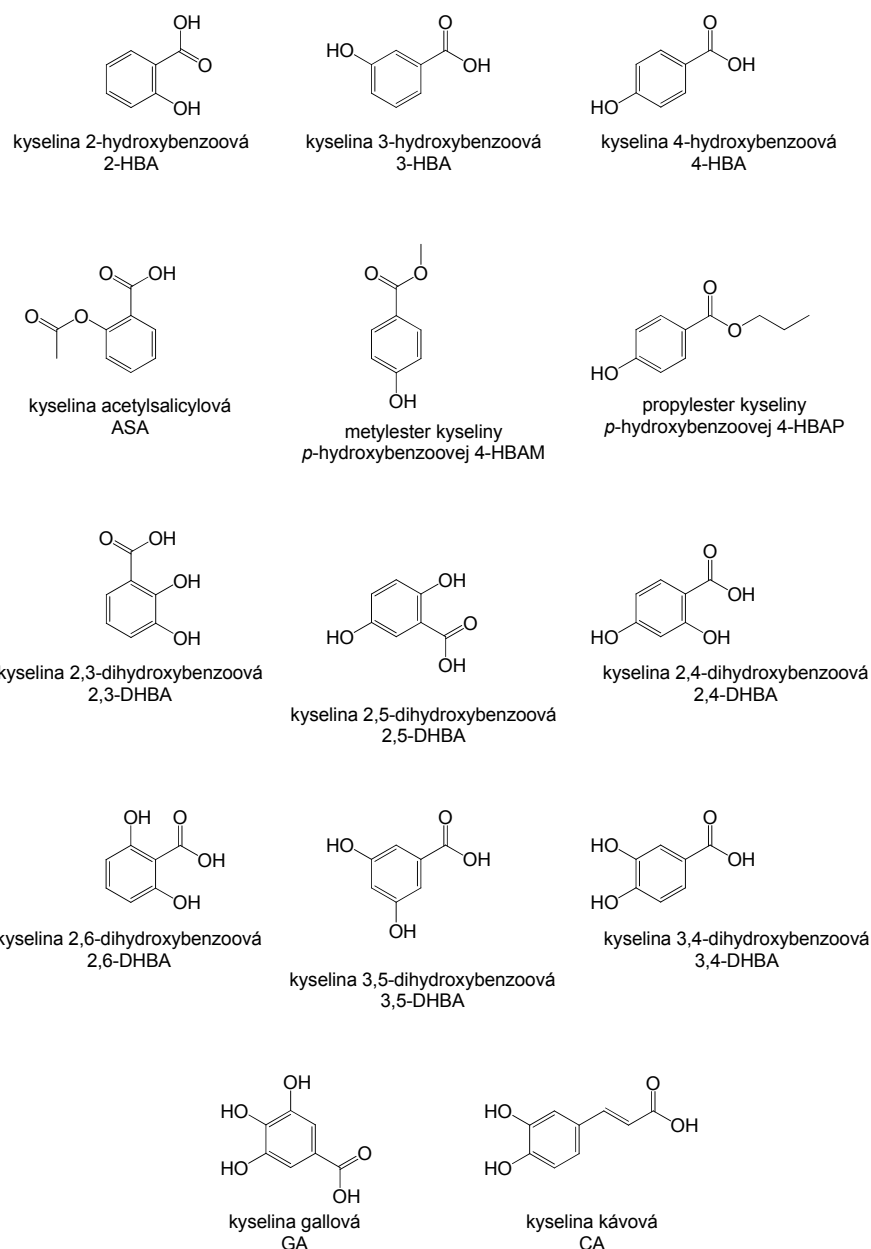
Výsledky

Antioxidačné vlastnosti testovaných látok sme posudzovali na základe nárastu absorpcie v oblasti vlnových dĺžok 325 až 400 nm, charakteristických pre vznikajúce produkty reakcie peroxonitritu a testovanej látky, a zároveň na základe rýchlosti jednotlivých reakcií. Spomedzi študovaných hydroxybenzoových kyselín sme najväčší nárast absorpcie v spomenutej oblasti pozorovali v prípade reakcie peroxonitritu s kyselinou gallovou. Na základe zmien absorpcií sme vypočítali reakčné rýchlosti pre konkrétne reakcie (tab. I). Reakcia s najvyššou reakčnou rýchlosťou bola zaznamenaná v prípade reakcie peroxonitritu s kyselinou gallovou, ktorá aj na základe porovnania reakčných rýchlostí vykazuje najlepšie antioxidačné vlastnosti a najväčšiu schopnosť vychytávať peroxonitrit ($v = -7,67 \cdot 10^{-6} \text{ mol min}^{-1}$). Kyselina kávová dosahovala v podobnej reakcii po 30. minúte druhú najvyššiu reakčnú rýchlosť ($v = -6,67 \cdot 10^{-6} \text{ mol min}^{-1}$), avšak rýchlosť reakcie po 60. minúte dosiahla hodnotu $v = -1,33 \cdot 10^{-6} \text{ mol min}^{-1}$, ktorá bola až štvrtá najvyššia v poradí za kyselinou 2,4-dihydroxybenzoovou, kyselinou 3,4-dihydroxybenzoovou a kyselinou gallovou. Najnižšiu reakčnú rýchlosť spomedzi meraných reakcií sme zaznamenali v prípade kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovej, ktorá dosahovala hodnotu $v = -0,02 \cdot 10^{-8} \text{ mol min}^{-1}$.

Diskusia

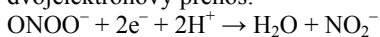
Štúdiu peroxonitritu sa venuje vysoká pozornosť, o čom svedčia aj postupne pribúdajúce práce^{13–16}. Peroxonitrit vzniká v extrémne rýchlej reakcii¹⁷, ktorej rýchlostná konštanta je $k = 6,7 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$. Patrí k pomerne silným oxidantom, prijímať dokáže jeden alebo dva elektróny, a to podľa nasledujúcich reakcií¹⁷:





Obr. 1. Štruktúry študovaných derivátov kyseliny benzoovej

dvojelektrónový prenos:



Spomedzi fenolov sa najlepšie antioxidačné schopnosti prisudzujú hydroxybenzoovým kyselinám s čo najväčším počtom hydroxylových funkčných skupín, umiestneným na susediacich uhlíkových atómov. Sroka a Cisowski¹⁸ skúmali schopnosť vychytávať peroxidový radikál rôznymi hydroxybenzoovými kyselinami. Najvyššiu účinnosť potvrdili v prípade trihydroxybenzoových kyselín, s hydroxylovými skupinami lokalizovanými na susediacich uhlíkových atómov a najnižšiu v prípade

monohydroxybenzoových kyselín. V prípade dihydroxybenzoových kyselín uvádzajú Sroka a Cisowski¹⁸ vyššiu antioxidačnú účinnosť, ak hydroxylové funkčné skupiny sú situované na susediacich uhlíkových atómov. Kyselina gallová je triviálnym názvom kyseliny 3,4,5-trihydroxybenzoovej, ktorej tri hydroxylové skupiny sú na benzenové jadro napojené na susediacich uhlíkových atómov, v polohách meta – para – meta vzhľadom ku karboxylovej skupine. Spomedzi študovaných zlúčenín sme najvyššiu reakčnú rýchlosť v reakcii s nitroperoxidom a najvyššiu schopnosť vychytávať nitroperoxid na základe tvorby nit-

Tabuľka I

Rýchlosť reakcie vychytávania peroxonitritu študovanými derivátmi kyseliny benzoovej (koncentrácia peroxonitritu je stanovená výpočtom na základe absorpcie pri λ_{302} a $\varepsilon = 1670 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Čas [min]	$A [\lambda_{302 \text{ nm}}]$	$c [\text{mol l}^{-1}]$	$v [\text{mol min}^{-1}]$	Čas [min]	$A [\lambda_{302 \text{ nm}}]$	$c [\text{mol l}^{-1}]$	$v [\text{mol min}^{-1}]$
<i>2-HBA</i>				<i>3-HBA</i>			
0	0,429	$0,26 \cdot 10^{-3}$		0	0,309	$0,19 \cdot 10^{-3}$	
30	0,339	$0,20 \cdot 10^{-3}$	$-2,00 \cdot 10^{-6}$	30	0,319	$0,19 \cdot 10^{-3}$	nd ^a
60	0,263	$0,16 \cdot 10^{-3}$	$-1,33 \cdot 10^{-6}$	60	0,321	$0,19 \cdot 10^{-3}$	nd ^a
<i>4-HBA</i>				<i>4-HBAM</i>			
0	0,579	$0,35 \cdot 10^{-3}$		0	0,987	$0,59 \cdot 10^{-3}$	
30	0,603	$0,36 \cdot 10^{-3}$	nd ^a	30	0,981	$0,58 \cdot 10^{-3}$	$-3,33 \cdot 10^{-7}$
60	0,569	$0,34 \cdot 10^{-3}$	$-6,67 \cdot 10^{-7}$	60	0,971	$0,58 \cdot 10^{-3}$	$-2,0 \cdot 10^{-7}$
<i>4-HBAP</i>				<i>ASA</i>			
0	0,765	$0,46 \cdot 10^{-3}$		0	0,674	$0,40 \cdot 10^{-3}$	
30	0,768	$0,46 \cdot 10^{-3}$	nd ^a	30	0,583	$0,35 \cdot 10^{-3}$	nd ^a
60	0,76	$0,45 \cdot 10^{-3}$	nd ^a	60	0,508	$0,32 \cdot 10^{-3}$	$-1,0 \cdot 10^{-6}$
<i>2,3-DHBA</i>				<i>2,4-DHBA</i>			
0	0,22	$0,13 \cdot 10^{-3}$		0	0,988	$0,59 \cdot 10^{-3}$	0
30	0,305	$0,18 \cdot 10^{-3}$	nd ^a	30	0,916	$0,55 \cdot 10^{-3}$	nd ^a
60	0,237	$0,14 \cdot 10^{-3}$	$-1,33 \cdot 10^{-6}$	60	0,786	$0,47 \cdot 10^{-3}$	$-2,67 \cdot 10^{-6}$
<i>2,5-DHBA</i>				<i>2,6-DHBA</i>			
0	0,062	$3,71 \cdot 10^{-5}$		0	0,384	$0,23 \cdot 10^{-3}$	
30	0,064	$3,83 \cdot 10^{-5}$	nd ^a	30	0,378	$0,23 \cdot 10^{-3}$	nd ^a
60	0,054	$3,23 \cdot 10^{-5}$	$-0,02 \cdot 10^{-8}$	60	0,364	$0,22 \cdot 10^{-3}$	$-3,33 \cdot 10^{-7}$
<i>3,4-DHBA</i>				<i>3,5-DHBA</i>			
0	1,149	$0,68 \cdot 10^{-3}$		0	0,199	$0,12 \cdot 10^{-3}$	
30	0,139	$0,08 \cdot 10^{-3}$	nd ^a	30	0,291	$0,17 \cdot 10^{-3}$	nd ^a
60	0,001	$0,001 \cdot 10^{-3}$	$-2,65 \cdot 10^{-6}$	60	0,238	$0,14 \cdot 10^{-3}$	$-1,0 \cdot 10^{-6}$
<i>GA</i>				<i>CA</i>			
0	0,772	$0,46 \cdot 10^{-3}$		0	0,551	$0,33 \cdot 10^{-3}$	0
30	0,391	$0,23 \cdot 10^{-3}$	$-7,67 \cdot 10^{-6}$	30	0,224	$0,13 \cdot 10^{-3}$	$-6,67 \cdot 10^{-6}$
60	0,289	$0,17 \cdot 10^{-3}$	$-2,0 \cdot 10^{-6}$	60	0,142	$0,09 \cdot 10^{-3}$	$-1,33 \cdot 10^{-6}$

^a nd – rýchlosť reakcie nebola stanovená, keďže rýchlosť reakcie nezodpovedala predpokladanému reakčnému mechanizmu

roderivátov charakterizovaných zvýšením signálu absorpcie v oblasti vlnových dĺžok 325–400 nm zaznamenali v prípade kyseliny gallovej. Teóriu Sroku a Cisowského¹⁸ sme tým našimi výsledkami potvrdili. Ďalším účinným antioxidantom v našom experimente je kyselina kávová (kyselina 3,4-dihydroxyškoricová) a kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, obe s hydroxylovými funkčnými skupinami na susediacich uhlíkových atómov v polohách meta a para, ako aj kyselina 2,4-dihydroxybenzoová s hydroxylovými funkčnými skupinami v polohe orto

a para. Zaujímavé je zistenie, že napriek svojim dvom hydroxylovým skupinám v polohe orto a meta (na vzdialených uhlíkových atómov) vykazovala kyselina 2,5-dihydroxybenzoová nižšiu reakčnú rýchlosť než študované monohydroxybenzoové kyseliny.

Kováč a Leško¹⁹ vo svojej práci upozornili na skutočnosť, že pri reakciách tvorby nitroderivátov vykazujú tvorené produkty zvýšené absorpcie pri vyšších vlnových dĺžkach než boli maximá samotných reaktantov pred reakciou. Túto skutočnosť sme pri reakciách peroxonitritu

s testovanými antioxidantnými látkami očakávali a zaznamenali v prípade kyseliny gallovej, kávovej, 2,4-dihydroxybenzoovej a kyseliny 3,4-dihydroxybenzoovej.

Záver

Nami testované látky patria pre účely štúdia vplyvu štruktúry hydroxybenzoových kyselín na ich antioxidantné vlastnosti k vhodným modelovým zlúčeninám, keďže hydroxylové funkčné skupiny na benzénovom jadre sú prítomné v rôznom počte a v rôznych polohách. Na základe výsledkov nášho experimentu usudzujeme, že poloha hydroxylových funkčných skupín na benzénovom jadre má na antioxidantnú schopnosť hydroxybenzoových kyselín väčší vplyv než samotné množstvo hydroxylových funkčných skupín. Spomedzi študovaných látok patrí k najlepším antioxidantom kyselina gallová. Vynikajúce výsledky sme dosiahli aj s kyselinou 2,4-dihydroxybenzoovou, 3,5-dihydroxybenzoovou a kyselinou kávovou.

Sledovanie a poznanie antioxidantných vlastností týchto látok je veľmi dôležité, pretože tieto látky nachádzajú čoraz väčšie uplatnenie, a to nie len v potravinárskom priemysle, ako konzervačné látky, či aditíva zvyšujúce biologickú hodnotu potravín, ale aj v medicíne, napríklad pri výrobe liekov a výživových doplnkov a stávajú sa tak bežnou súčasťou nášho každodenného života. Vďaka svojim jednoduchým chemickým štruktúram sa využívajú pri pochopení súvislostí medzi antioxidantnými vlastnosťami a štruktúrou zložitejších molekúl, odvodených od hydroxybenzoových kyselín, alebo zložitejších molekúl s podobnými funkčnými skupinami. Vedomosti o antioxidantných vlastnostiach a vzťahu medzi štruktúrou a antioxidantnými vlastnosťami látok sú dôležité z hľadiska pochopenia pôsobenia antioxidantov a možnosti ich správneho využitia v rôznych medicínskych oboroch, a to buď priamo pri prevencii a liečbe ochorení, alebo pri detekcii markerov patologických procesov.

Vybrané hydroxybenzoové kyseliny – kyselina gallová, kyselina 2,4-dihydroxybenzoová, kyselina 3,5-dihydroxybenzoová, kyselina kávová – majú vďaka schopnosti vychytávať peroxonitrit veľký potenciál v prevencii ochorení spôsobených oxidantným stresom.

Práca bola finančne podporená z projektu VEGA 1/0115/14.

LITERATÚRA

1. Van Duyn M. A. S., Pivonka E.: *J. Am. Diet. Assoc.* **100**, 1511 (2000).

2. Liu R. H.: *Am. J. Clin. Nutr.* **78S**, 517S (2003).
3. Smith F. L., Eyzaguirre P.: *Afr. J. Food, Agric., Nutr. Dev.* **7**, 1 (2007).
4. Farkas O., Jakus J., Héberger K.: *Molecules* **9**, 1079 (2004).
5. Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C.: *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 2305 (2005).
6. Choi K., Lee Y., Jung M. G., Kwon S. H., Kim M., Jun W. J., Lee J., Lee J. M., Yoon H.: *Mol. Cancer Res.* **7**, 2011 (2009).
7. Al-Salih R. M. H.: *Thi-Qar Medical Journal* **4**, 109 (2010).
8. Totani N., Tateishi S., Takimoto T., Maeda Y., Sasaki H.: *J. Oleo Sci.* **60**, 457 (2011).
9. Boveris A., Valdez L., Alvarez S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 90 (2002).
10. Liaudet L., Rosenblatt-Velin N., Pacher P.: *Curr. Vasc. Pharmacol.* **11**, 196 (2013).
11. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L.: *Physiol. Rev.* **87**, 315 (2007).
12. Beckman J. S., Chen J., Ischiropoulos H., Crow J. P.: *Methods Enzymol.* **223**, 229 (1994).
13. O'Donnell B. A., Li E. X., Lester M. I., Francisco J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 12678 (2008).
14. Trostchansky A., Rubbo H.: *Free Radical Biol. Med.* **44**, 1887 (2008).
15. Schopfer F. J., Cipollina C., Freeman B. A.: *Chem. Rev.* **111**, 5997 (2011).
16. Woodcock S. R., Bonacci G., Gelhaus S. L., Schopfer F. J.: *Free Radical Biol. Med.* **59**, 14 (2013).
17. Hippeli S., Rohnert U., Koske D., Elstner E. F.: *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **52**, 564 (1997).
18. Sroka Z., Cisowski W.: *Food Chem. Toxicol.* **41**, 753 (2003).
19. Kováč Š., Leško J.: *Spektrálne metódy v organickej chémii*. Alfa – vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava 1980.

B. Veliká, B. Hubková, M. Mareková, and I. Kron
(*Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, P. J. Šafárik University, Košice and Labmed Co., Košice, Slovak Republic*): **UV-VIS Spectrophotometric Determination of Antioxidant Activity of Hydroxybenzoic Acid Derivatives in Their Reactions with Peroxonitrite**

Hydroxybenzoic acids are effective radical scavengers. Gallic, 2,4-di-hydroxybenzoic, 3,5-dihydroxybenzoic, and caffeic acids gave the best results.