



УДК543+541

## ВЭЖХ в исследовании радиационно-химических превращений серотонина адипината

Ульянова Е.В.<sup>1</sup>, Антропова И.Г.<sup>2</sup>, Ревина А.А.<sup>1</sup>,  
Ларионов О.Г.<sup>1</sup>, Одинец А.Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

<sup>2</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва

<sup>3</sup> НПО "Сумма Технологий", Москва

Поступила в редакцию 16.08.2013 г.

### Аннотация

В данной работе для идентификации продуктов  $\gamma$ -радиолиза серотонина и расчёта степеней превращения исходного соединения был использован метод ВЭЖХ. Эти данные необходимы для оценки радиационной устойчивости биологически активных соединений и лекарственных препаратов на их основе, включая серотонин, поскольку в последнее время широко используются радиационно-химические методы стерилизации.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, серотонин,  $\gamma$ -облучение, радиационно-химическое моделирование реакций окисления

In this work to identify  $\gamma$ -radiolysis products serotonin and calculating degrees of conversion of the starting compound was used in the HPLC method. These data are needed to assess the radiation stability of biologically active compounds and formulations based on them, including serotonin, as recently widely used radiation-chemical methods of sterilization.

**Keywords:** HPLC, serotonin,  $\gamma$ -irradiation, radiation-chemical modeling of oxidation

### Введение

В последнее время появились сообщения о возможной коррекции сосудистой недостаточности с помощью отечественного фармакопейного препарата серотонина адипината (1% раствор). Последний является аналогом эндогенного биогенного амина серотонина (5-гидрокситриптамиин) [1]. Серотонин является производным триптофана и синтезируется в центральной нервной системе, играя роль медиатора, и в хромоаффинных клетках желудочно-кишечного тракта. Биосинтез растениями всех основных нейромедиаторных аминов, в том числе серотонина, был продемонстрирован в работе [2]. Физиологические функции серотонина чрезвычайно многообразны. В тёмное время суток при помощи серотонина в шишковидной железе синтезируется мелатонин – вещество, отвечающее за правильное распределение циклов сон-бодрствование в нашем организме. Важно, что мелатонин, продуцируемый с помощью серотонина, обладает ярко

выраженными антиоксидантными и иммуномоделирующими свойствами, регулирует кровообращение и другие важные процессы жизнедеятельности [3].

Для широкого практического применения медицинские препараты должны обладать важным свойством протекторного действия, позволяющим противостоять агрессивным факторам внешней среды, включая воздействие ионизирующего излучения. В настоящей работе использован метод радиационно-химического моделирования окислительно-восстановительных реакций с участием свободных радикалов и активных форм кислорода, генерированных при воздействии ионизирующего излучения. Данный метод позволяет определять способность индивидуальных соединений или более сложных систем, например вин, противостоять окислительному стрессу [4-5]. Для изучения механизма элементарных реакций, за счет которых снижается в присутствии серотонина поражающее действие радиации на живые системы, требуется использование физико-химических методов регистрации продуктов радиолиза и определения степени превращения исходного соединения. Ранее авторами [6] показано, что метод ВЭЖХ можно использовать для исследования протекторных свойств биологически активных соединений вина в условиях  $\gamma$ -облучения, поскольку удалось разделить и зарегистрировать спектры продуктов радиолиза, а также рассчитать степени превращения исходных компонентов. В данной работе представлены результаты исследования методом ВЭЖХ радиационно-химических превращений серотонина адипината и, для сравнения, адипиновой кислоты.

## Эксперимент

Для изучения радиационно-химических превращений серотонина использовали 1% раствор для инъекций серотонина адипината (ЗАО «ЛОПР», Москва), жидкостный хроматограф «Agilent 1100 Series» с диодно-матричным детектором и колонкой – Диасфер 110 C18 (6 мкм, 250×2 мм). Элюенты: А – вода (рН=3,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), В – ацетонитрил (рН=3,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Режим изократического элюирования: 3% В. Расход элюента – 300 мкл/мин. Объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование серотонина и продуктов его радиолиза проводили при 230 нм, спектр сканировали в диапазоне 200 – 700 нм.

Спектры оптического поглощения исходных и облученных растворов измерялись на спектрофотометре СФ-2000 в кварцевых кюветках ( $l=1$  см) при использовании соответствующих растворителей в качестве растворов сравнения.

Для приготовления элюентов и растворов анализируемых соединений использовали: ацетонитрил (0 сорт, НПК "Криохром", Россия); ортофосфорную кислоту (хч); тридистиллированную воду, дополнительно очищенную на фильтрах Millipore, (Milli-P QG, Waters); этанол (96% extra pure, Merck, Германия).

Для исследования радиационно-химических превращений серотонина адипината его 0,01 % водные растворы подвергали  $\gamma$ -облучению на установке  $^{60}\text{Co}$  РХМ-  $\gamma$ -20 РХТУ имени Д.И. Менделеева в присутствии кислорода воздуха или закиси азота при разных дозах облучения 0,35 – 6,0 кГр. В соответствии с ферросульфатной дозиметрией мощность дозы составляла  $0,10 \pm 0,001$  Гр/с.

Хроматографические анализы проводились в пострadiационный период в течение суток после облучения растворов.

## Обсуждение результатов

Для изучения функциональной активности серотонина адипината были исследованы радиационно-химические превращения его водных растворов методом обращённо-фазовой ВЭЖХ. Поскольку анализируемые реакционные смеси достаточно просты, был выбран изократический режим, позволяющий за приемлемое время элюировать основной компонент.

Оптимальная длина волны для регистрации продуктов радиолитического превращения серотонина адипината выбрана на основании анализа спектров оптического поглощения исходного водного раствора и облучённых растворов при разных дозах облучения (рис. 1).

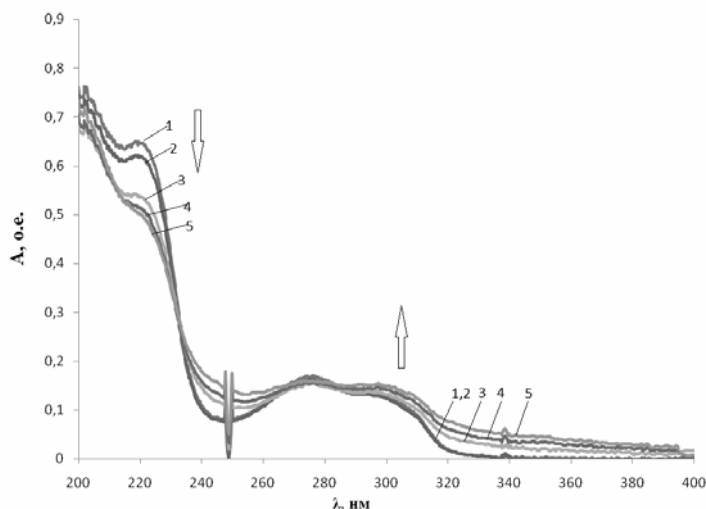


Рис. 1. Спектры оптического поглощения 0,01% водных растворов серотонина адипината, облученных при разных дозах облучения, Гр:  
1 - 0, 2 - 350, 3 - 700, 4 - 1050, 5 - 1500

На представленных спектрах обнаружена изобестическая точка в области  $\lambda \sim 230$ -235 нм, в которой оптическая плотность анализируемого раствора не меняется в процессе облучения, т.е. коэффициенты экстинкции  $\epsilon_{230}$  исходного серотонина адипината и его продуктов одинаковы.

Таким образом, с целью идентификации продуктов радиолитического превращения серотонина адипината, а также расчёта степеней превращений исходного соединения были получены хроматограммы ( $\lambda = 230$  нм) 0,01% водных растворов серотонина адипината до и после  $\gamma$ -радиолитического превращения при разных дозах (0,35-6,0) кГр в присутствии растворённого кислорода в системе (рис. 2,3).

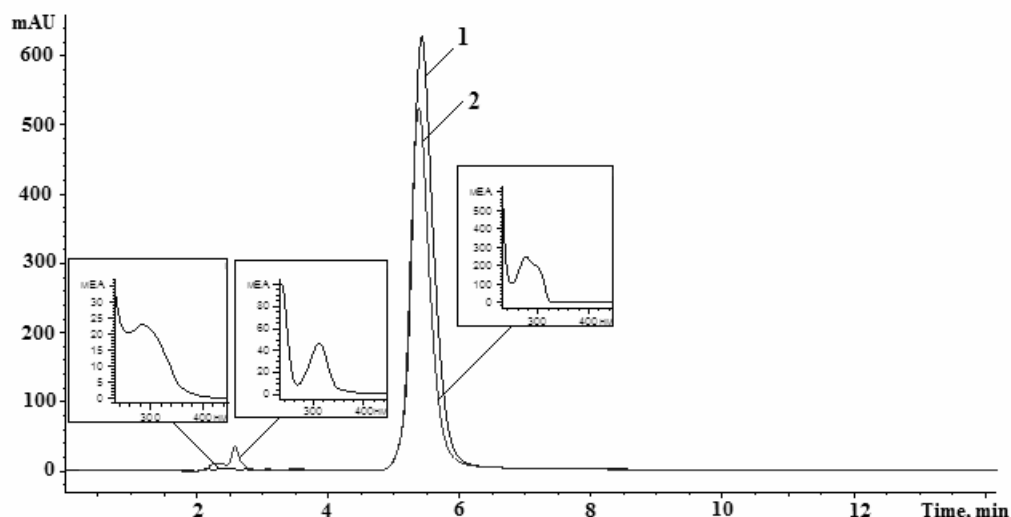


Рис. 2. Хроматограммы 0,01 % раствора серотонина адипината в воде до (1) и после облучения (2), зарегистрированные при 230 нм. Доза облучения – 0,36 кГр. На вставках приведены спектры серотонина и его продуктов радиоллиза ( $t_{r,1}=2,07$  мин.,  $t_{r,2}=2,46$  мин.)

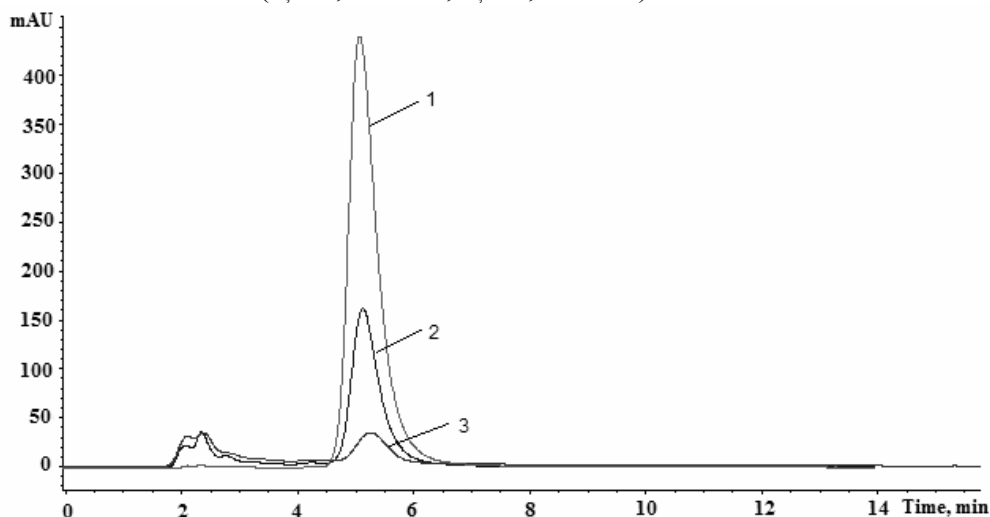


Рис. 3. Хроматограммы 0,01 % раствора серотонина адипината в воде до (1) и после воздействия дозой 2,1 кГр (2) и 6 кГр (3) в среде  $O_2$ , зарегистрированные при 230 нм

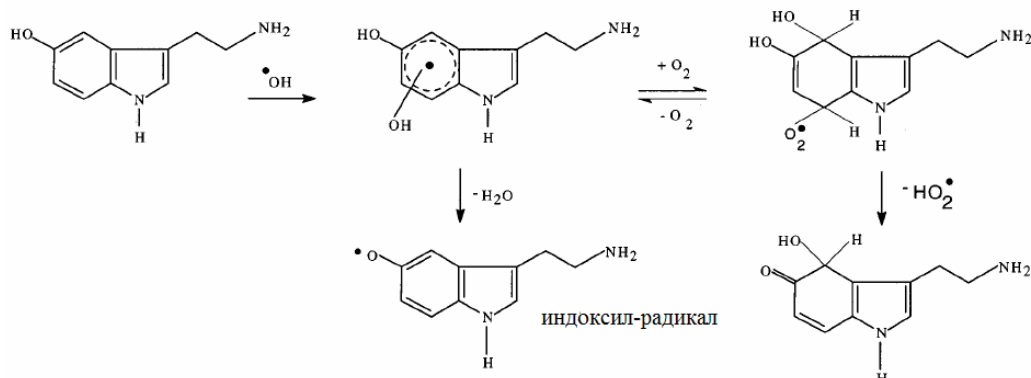
Степени превращения серотонина ( $\alpha$ ) рассчитывались по площадям соответствующих пиков и приведены в табл. 1. Видно, что в результате облучения происходит уменьшение площадей пиков основного компонента и нарастание площадей пиков двух продуктов радиоллиза при увеличении дозы до 1,78 кГр (5 ч. облучения). Время удерживания  $t_r$  серотонина адипината составило 5,38 мин., а его продуктов 2,07 мин. и 2,46 мин. Видно, что при облучении раствора серотонина адипината дозой 1,78 кГр (5 ч. облучения) степень его превращения составляет более 60 %, однако удалось зарегистрировать только два продукта с низкими концентрациями. Другие продукты радиоллиза, вероятно, являются низкомолекулярными и сильно полярными, поэтому они не удерживаются на используемой колонке.

Таблица 1. Хроматографические данные радиолитического распада серотонина адипината в среде O<sub>2</sub> при мощности дозы облучения 0,36 кГр/ч

Время облучения, час.	S(CA), AU*s	S(прод. 1), AU*s	S(прод. 2), AU*s	S(прод. 3), AU*s	α(CA), %
0	15.5	-	-	-	-
1	11.7	0.180	0.356	-	24.5
2	9.9	0.260	0.481	-	36.1
3	8.0	0.366	0.613	-	48.4
4	7.1	0.450	0.767	-	54.2
5	5.6	0.540	0.825	-	63.9
6	5.6	0.361	0.602	0.250	63.9
14.3	1.4	0.708	1.026	0.460	91.0
17.1	1.1	0.540	0.688	0.367	92.9

S(CA) – площадь пика серотонина адипината; S(прод. 1) – площадь пика продукта 1 радиолитического распада серотонина адипината; S(прод. 2) – площадь пика продукта 2 радиолитического распада серотонина адипината; S(прод. 3) – площадь пика продукта 3 радиолитического распада серотонина адипината; α(CA) – степень превращения серотонина адипината; S – площадь пиков, AU\*s

Образование одного из продуктов радиолитического распада серотонина, по-видимому, может происходить в результате его взаимодействия с гидроксил-радикалом в соответствии со следующей схемой [7]:



Установлено, что  $\cdot\text{OH}$ -аддукты серотонина подвергаются дегидратации ( $k=8\pm 1 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$ ) с формированием индоксил-радикала. Реакция взаимодействия  $\cdot\text{OH}$ -аддуктов серотонина с растворённым кислородом является обратимой и конкурирует с реакцией дегидратации. Авторы показали, что индоксил-радикал с кислородом не взаимодействует.

При увеличении дозы облучения с 2,1 кГр до 5, 5 кГр (от 6 ч. до 14,3 ч., см. табл. 1) происходит образование третьего продукта радиолитического распада серотонина адипината, концентрация которого, также как и первых двух продуктов, в течение указанного периода времени нарастает. При дозе облучения 6 кГр (17 ч. облучения) происходят радиационно-химические превращения всех первичных продуктов радиолитического распада серотонина адипината, т.к. наблюдается снижение их концентраций. Степень превращения исходного серотонина адипината к этому времени уже превышает 90 %. Таким образом, серотонин адипинат обладает высокой радиационно-химической чувствительностью.

Для того, чтобы оценить влияние адипиновой кислоты на радиолитический распад серотонина адипината были проведены хроматографические исследования

радиолиза 0,01% водного раствора данной кислоты. Как видно из сравнения хроматограмм на рис. 4, адипиновая кислота не претерпевает изменений в процессе облучения, т.е. является радиационно-устойчивой.

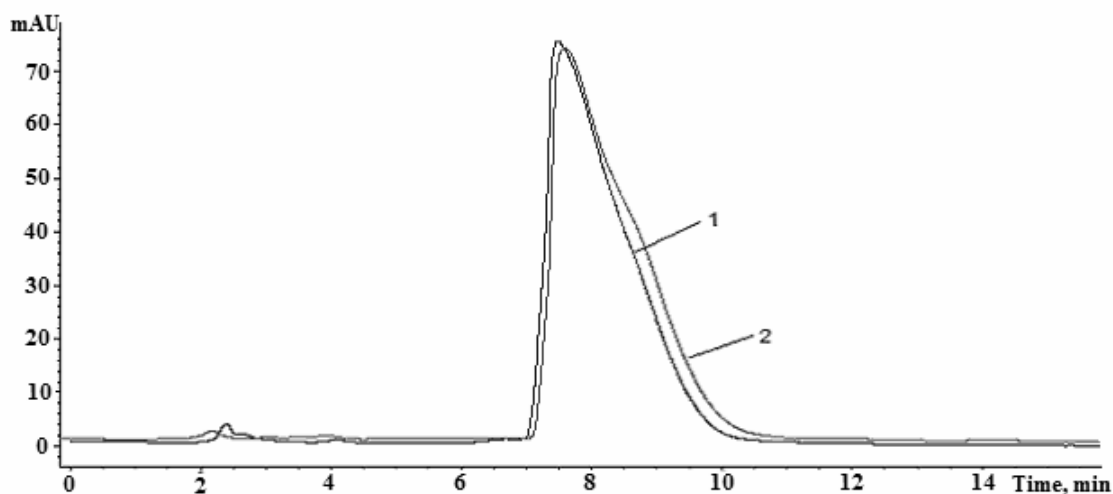


Рис. 4. Хроматограммы 0,01 % раствора адипиновой кислоты в воде до - 1 и после 1 часа облучения (0,36 кГр) – 2, зарегистрированные при 230 нм

С целью идентификации продуктов радиолиза серотонина адипината в присутствии закиси азота, а также расчёта степеней его превращений в этих условиях были получены и проанализированы хроматограммы его 0,01% водного раствора до и после  $\gamma$ -радиолиза при разных дозах облучения (рис. 5).

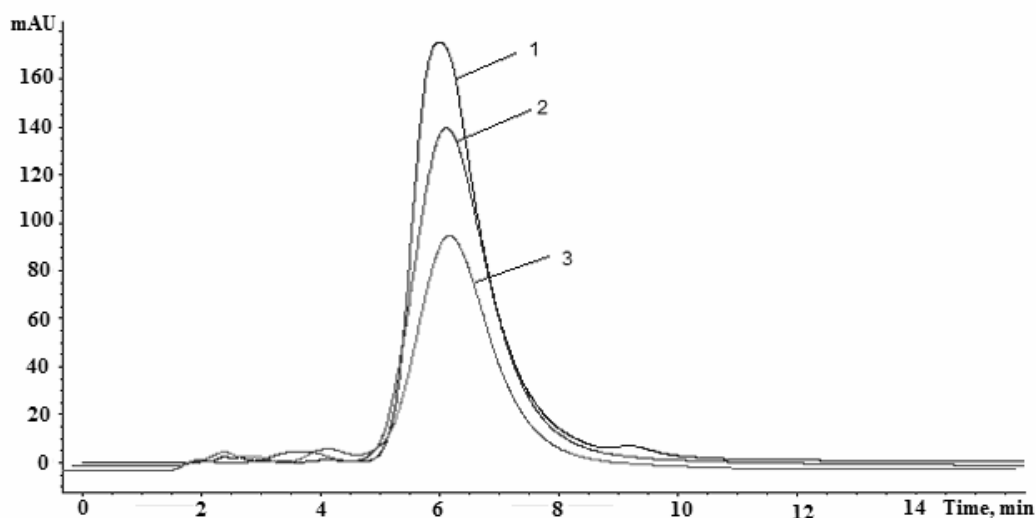


Рис. 5. Хроматограммы ( $\lambda = 230$  нм) 0,01 % водного раствора серотонина адипината, насыщенного  $N_2O$ , до (1) и после 1 (2) и 2 (3) часов облучения, доза облучения – 0,36 кГр и 0,70 кГр, соответственно

Степени превращения серотонина ( $\alpha$ ) рассчитывались по площадям соответствующих пиков и приведены в табл. 2.

В результате облучения раствора серотонина адипината в среде закиси азота происходит образование тех же продуктов, что и в среде растворённого молекулярного кислорода, т.к. данные продукты имеют идентичные времена удерживания и спектры оптического поглощения, однако динамика накопления данных продуктов в этом случае иная. Как видно из табл. 2, при увеличении дозы

облучения от 0 до 1,4 кГр происходит постоянное нарастание концентрации продукта 1, в то время как содержание продукта 2 достигает максимума при дозе облучения 0,7 кГр, после которой начинается его снижение. Образование продукта 3 в присутствии закиси азота наблюдается уже при дозе облучения от 1,05 кГр, в то время как в аэрированных условиях требуется доза в 2 раза больше. Следует отметить, что для дальнейшего препаративного выделения продуктов 1 и 3 целесообразно использовать среду закиси азота, поскольку в этих условиях при меньшей дозе облучения можно получить больший выход искомого соединения. С другой стороны, для выделения продукта 2 необходимо проводить облучение раствора серотонина адипината в присутствии молекулярного кислорода при дозах не менее 2 кГр.

Таблица 2. Хроматографические данные радиолита серотонина адипината в присутствии N<sub>2</sub>O.

Доза облучения, кГр	S(CA), AU*s	S(прод. 1), AU*s	S(прод. 2), AU*s	S(прод. 3), AU*s	$\alpha$ (CA), %
0	14.971	-	-	-	
0.36	13.554	0.111	0.477	-	9.5
0.7	9.974	0.371	0.548	-	33.4
1.05	7.345	0.429	0.376	0.341	50.9
1.40	5.624	0.668	0.373	0.833	62.4

S(CA) – площадь пика серотонина адипината; S(прод. 1) – площадь пика продукта 1 радиолита серотонина адипината; S(прод. 2) – площадь пика продукта 2 радиолита серотонина адипината; S(прод. 3) – площадь пика продукта 2 радиолита серотонина адипината;  $\alpha$ (CA) – степень превращения серотонина адипината

### Заключение

Показано, что метод ВЭЖХ можно использовать для исследования протекторных свойств серотонина адипината в условиях  $\gamma$ -облучения, поскольку данным методом удалось разделить и зарегистрировать спектры продуктов радиолита, а также рассчитать степени превращения исходного соединения в зависимости от дозы облучения и среды.

Установлено, что при дозе облучения >6 кГр в присутствии молекулярного кислорода происходят радиационно-химические превращения всех первичных продуктов радиолита серотонина адипината, а степень превращения исходного соединения при этом превышает 90 %.

Выбраны условия для радиационно-химического получения и хроматографического выделения продуктов радиолита серотонина адипината.

Показано, что адипиновая кислота не претерпевает изменений в процессе  $\gamma$ -облучения, т.е. является радиационно-устойчивым соединением.

### Список литературы

1. Козлов И.А., Клыпа Т.В., Рыбаков В.Ю., Матвеев Ю.Г. Первый опыт назначения серотонина адипината для коррекции сосудистой недостаточности у

- кардиохирургических больных. // Вестник интенсивной терапии. 2006. № 1. Интенсивная терапия в кардиологии. С. 7-9
2. Рощина В.В. Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины. Пушкино: ПНЦ АН СССР, 1991. С. 31–37.
3. Слесарев В.И.. Химия: Основы химии живого. // СПб.: Химиздат. 2009. 783с.
4. Revina A.A. Radiation-chemical Contribution to the Study of Polyfunctional Activity of Natural Pigments. // The III-d Int. Symposium on Natural Colourants. Princeton. USA. 1998. P. 278-292
5. Ревина А.А. Радиационно-химическое моделирование быстротекущих процессов с участием промежуточных кислородсодержащих реакционных центров в различных системах. // Автореф. диссертации, д.х.н. Москва. ИХФ РАН. 1995.
6. Ульянова Е.В., Ларионов О.Г., Ревина А.А., Андриевская Д.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в исследовании антиоксидантных свойств вин. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т.10. N.4. С.522-532.
7. Hela P.G., Anipindi N.R., Priyadarsini K.I., O'Neill OH radical induced one-electron oxidation of serotonin and Triptamine. // J. Phys. Chem. B 1999. V. 103. P. 8606-8611

---

**Ульянова Екатерина Владимировна** - ст. науч. сотр., к.х.н., ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

**Ларионов Олег Георгиевич**, гл. науч. сотр. ИХФЭ РАН, д.х.н., профессор, ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

**Ревина Александра Анатольевна** - вед. науч. сотр. ИХФЭ РАН, д.х.н., профессор. ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

**Антропова Ирина Геннадьевна** - ассистент РХТУ им. Д.И. Менделеева, к.х.н., Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва

**Одинец Алексей Глебович** - руководитель лаборатории нанобиотехнологий РНЦ восстановительной медицины и курортологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ, д.б.н., профессор, НПО "Сумма Технологий", Москва

**Ulyanova Ekaterina V.** - scientific worker of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: [k.uljanova@mail.ru](mailto:k.uljanova@mail.ru)

**Larionov Oleg G.** - The main scientific worker of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow

**Revina Aleksandra A.** - The chief scientific worker of A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow

**Antropova Irina G.** - The assistant of D.Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

**Odinets Alexey G.** - head of the Laboratory of nanobiotechnology RSC Rehabilitation Medicine and Balneology of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Doctor of Biological Sciences, Professor. SPA «The amount of technology», Moscow