УДК 577.1:544.4:543.4

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ В ПРИСУТСТВИИ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ

© 2009 г.

В.В. Крайник [1]***, В.Н. Ушкалова*** [2]***, В.Г. Катанаева*** [2]

[1] Сургутский госуниверситет ХМАО-Югры
[2] Тюменский госуниверситет

kraynikvika@mail.ru

Поступила в редакцию 27.05.2009

Приведены результаты спектроскопического исследования процессов окисления молекулярным кислородом водно-липидного субстрата в присутствии комплексов меди с α-аланином. Установлен конкурентный характер образования и распада гидропероксидов. Предполагается участие комплексов в реакциях зарождения цепей и распада гидропероксидов.

Ключевые слова: спектроскопия, перекисное окисление, комплексы меди с α-аланином.

Введение

В последние годы, в связи с тем, что доказан свободно-радикальный механизм развития многих патологий, большое внимание уделяется процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ) биомембран [1–3].

Наиболее изучено каталитическое влияние соединений железа на процессы ПОЛ [4–5], между тем во многих окислительных системах клетки обнаружены катионы меди. Кинетическим методом нами была исследована каталитическая активность солей ряда *d*-элементов на окисление пробы, состоящей из этилолеата и воды (1:3 по объему) в присутствии в качестве эмульгатора цетилтриметиламмония бромида (ЦТМАБ). Каталитическая активность исследованных солей падает в ряду: $Cu^{2+} > Fe^{2+} > Fe^{3+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$ [6–7].

Медь в организме, как правило, присутствует в виде координационных соединений (КС) с белками, аминокислотами и другими биомолекулами [8]. Несмотря на важное значение указанных соединений, ряд аспектов их биологического действия, в том числе и влияние на ПОЛ, остается до конца невыясненным.

Цель настоящей работы – спектроскопическое исследование влияния комплексов меди с α-аминокислотами (АК) на процессы перекисного окисления липидного субстрата. Ранее [7] в специальном эксперименте нами было установлено каталитическое влияние на процессы окисления липидного субстрата КС меди(II) с α-аланином в соотношении 1:2. Данная работа является продолжением серии работ, посвященных изучению ПОЛ в водно-эмульсионной среде.

Экспериментальная часть

Методика получения и очистки реагентов описана ранее [7].

Комплексообразование в системе медь(II) – α-аланин изучали спектрофотометрическими методами Бьерума и сдвига равновесия [9–10], предварительно подобрав оптимальное значение *p*H. С этой целью снимали спектры поглощения смеси растворов хлорида меди(II) и α-аланина в соотношении 1:2 при *p*H 4–12 и строили зависимость $A_{max}=f(pH)$. По графику определяли интервал оптимальных значений *p*H, который соответствует практически постоянным значениям оптической плотности растворов [11].

Окисление молекулярным кислородом пробы, состоящей из этилолеата, ЦТМАБ, КС меди(II) с α-аланином и воды осуществляли в термостатированной ячейке при 25, 37, 60ºС (±0.2 ºС) и оптимальном перемешивании [12]. Конечная концентрация в растворе: этилолеат – 0.7, эмульгатор – $(1–3)\cdot10^{-3}$, медь – $(2–3)\cdot10^{-2}$, α-аланин – $(4–5)\cdot10^{-2}$ моль/л.

Во времени отбирали по 100 мкл пробы, экстрагировали 10-кратным избытком гексана и расслаивали добавлением 1.5 мл воды. Органический слой отделяли, разбавляли в 200 раз до концентрации этилолеата в пробе $1.2\cdot10^{-4}$ моль/л, сушили безводным сульфатом натрия и записывали спектры в области поглощения этилолеата и продуктов окисления в диапазоне 200–300 нм. Водную фазу переносили в кювету и записывали спектры в области поглощения соединений меди в диапазоне 400–900 нм.

Для изучения действия катализатора в органической фазе исходную пробу объемом 4 мл центрифугировали в течение 10 минут при

3000 об/мин, отбирали 0.35 мл органической фазы, добавляли 1 мл гексана, сушили и записывали спектры в области 400–900 нм.

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре СФ-2000, *p*H измеряли иономером И-130.2М, откалиброванным как описано в работе [7].

Растворы готовили по точной навеске на бидистилляте.

Результаты и их обсуждение

В спектрах поглощения растворов хлорида меди(II) в присутствии α-аланина при *p*H 4.5 присутствует полоса поглощения с максимумом при 730 нм. С увеличением *p*H от 4.5 до 7.5 происходит увеличение интенсивности, а максимум полосы закономерно смещается гипсохромно, что, очевидно, связано с процессами ступенчатого комплексообразования в исследуемой системе. При *p*H от 7.5 до 10 наблюдается постоянная интенсивность и положение максимума при 620 нм, что соответствует оптимальным условиям комплексообразования. Дальнейшие исследования проводились при *p*H 9. Исходя из литературных и экспериментальных данных, при этом значении *p*H преобладают комплексы состава 1:2 с lgβ 10.5 [10, 13].

В УФ-спектрах пробы, окисленной при 37±0.2ºС, наблюдается полоса с максимумом в области 202–204 нм, в области 220–230 нм она выходит на плато и затем снижается в области 250 нм (рис. 1). В течение первого часа окисления оптическая плотность при 202–204 и 220–230 нм меняется экстремально, достигая максимального значения через 15 мин после начала эксперимента. В течение следующего часа окисления оптическая плотность постепенно снижается.

Для более полной оценки процесса окисления аналогичный эксперимент был проведен при 24 и 60±0.2ºС. Экстремальный характер изменения оптической плотности наблюдается и при данных температурах окисления. Максимальное значение оптической плотности появляется через 60 и 5 мин после начала эксперимента при 24 и 60±0.2ºС соответственно.

В спектрах водной фазы отмечается полоса с максимумом в области 620 нм, соответствующая поглощению КС меди(II) с α-аланином (рис. 2). Через 5 мин после начала эксперимента оптическая плотность снижается в 2 раза, в течение последующих 2 часов окисления оптическая плотность меняется незначительно.

В спектрах органической фазы в видимой области (рис. 3) присутствует полоса с максимумом в области 670 нм, вероятно относящаяся к аналогичным комплексам меди(I). Данное предположение подтверждается литературными источниками. Из [14–15] известно, что КС меди(I) в зависимости от лигандов в органических растворителях поглощают в области 400–670 нм.

Интенсивность данной полосы в течение 30 мин окисления увеличивается, а затем сохраняется на определенном уровне в течение всего эксперимента (рис. 3).

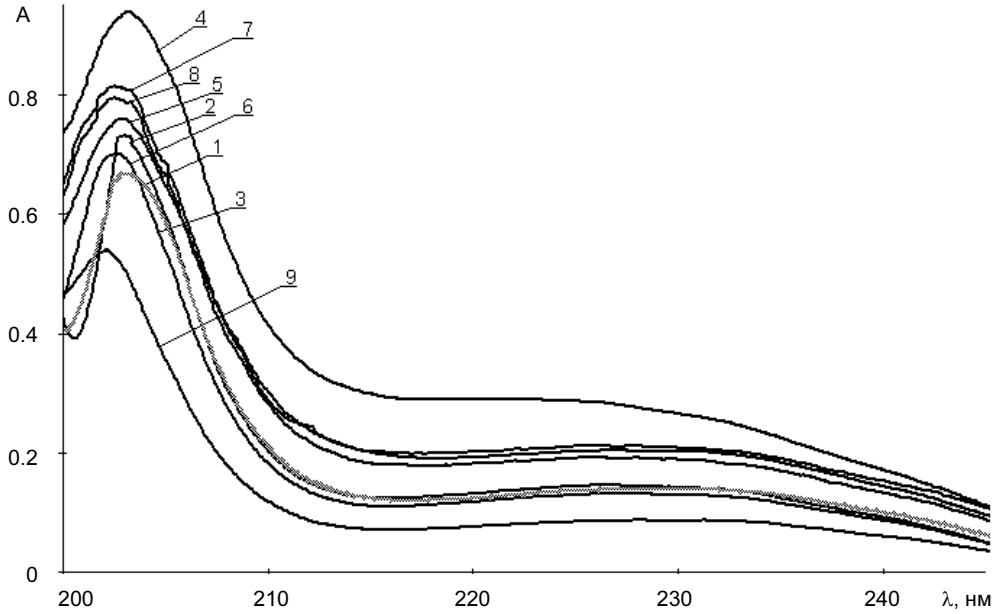

Рис. 1. Изменения в УФ-спектрах поглощения растворов этилолеата: 1 – 0, 2 – 5, 3 – 10, 4 – 15, 5 – 20, 6 – 30, 7 – 60, 8 – 90, 9 – 120 мин окисления при 37°С, А – оптическая плотность

Как известно, изолированные –C=C– связи характеризуются интенсивным поглощением (ε ≈ 10000) вблизи 190 нм. Введение ауксохромов, в том числе гидропероксидных групп, батохромно смещает эту полосу на 10–40 нм. Таким образом, в результате исследования спектров органической фазы в процессе окисления установлено, что полоса 202–204 нм принадлежит α-ненасыщенным гидропероксидам. В условиях эксперимента гидропероксиды быстро разлагаются, и наблюдается экстремальное изменение оптической плотности (рис. 1). Подтверждением этого факта является увеличение оптической плотности в области 202–204 нм с увеличением температуры до 60±0.2ºС. С течением времени процессы распада преобладают над процессами образования гидропероксидов, о чем свидетельствует незначительное снижение оптической плотности по сравнению с начальными этапами окисления.

Также известно, что карбонильные группы имеют слабую полосу при 260–290 нм (ε ≈ 50). Карбонильные группы, сопряженные с алкеновой группой, имеют интенсивное поглощение

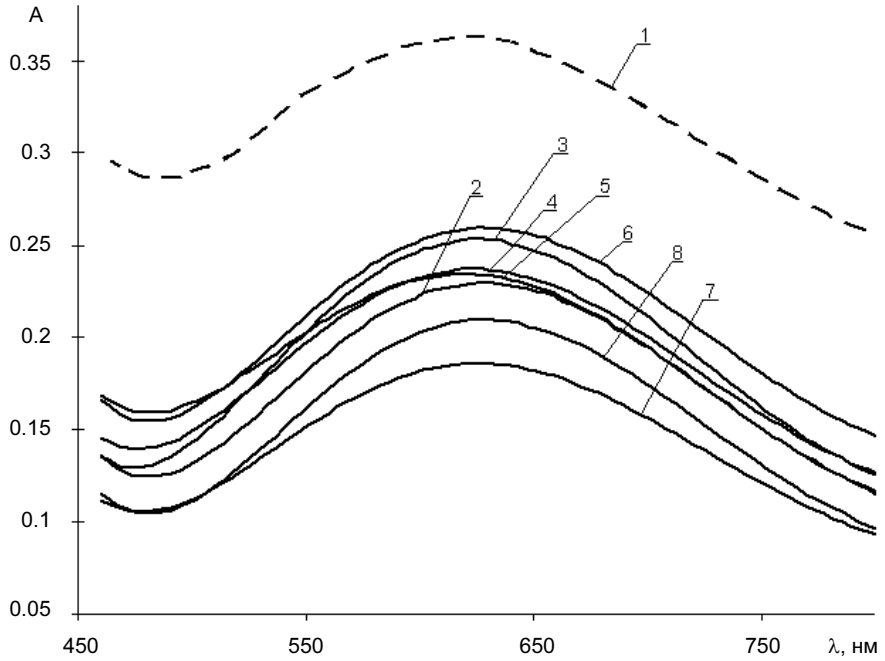

Рис. 2. Изменения в спектрах поглощения водной фазы: 1 – 0, 2 – 5, 3 – 10, 4 – 20, 5 – 30, 6 – 60, 7 – 90, 8 – 120 мин окисления при 37°С

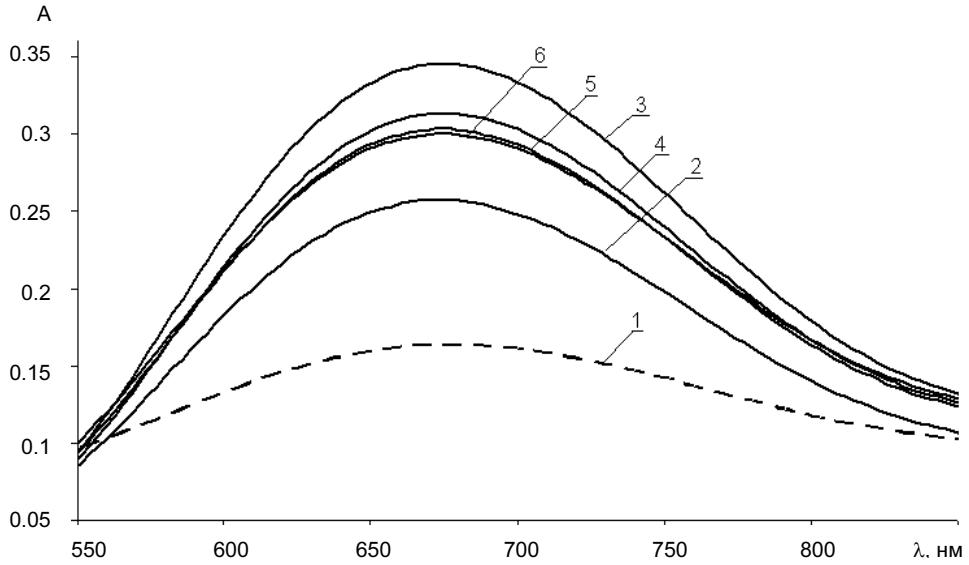

Рис. 3. Изменения в спектрах поглощения органической фазы: 1 – 0, 2 – 10, 3 – 30, 4 – 60, 5 – 90, 6 – 120 мин окисления при 60°С

при 215–230 нм. Например, кротоновый альдегид поглощает при 217 нм с $\varepsilon \approx 15650$, а метилвинилкетон – при 219 с $\varepsilon = 3600$. Вторая полоса $n \to \pi^*$ переходов для этих соединений, расположенная в области 320–325 нм, очень слабая, с $\varepsilon \approx 20$ [15]. Таким образом, по результатам спектроскопического исследования можно предположить, что гидропероксиды разлагаются с образованием ненасыщенных карбонильных соединений, поглощающих в области 217–230 нм (рис. 1).

Результаты исследования пробы в видимой области позволяют сделать вывод о том, что в процессе окисления катализатор (КС меди(II) с α-аланином) не разрушается. В пользу этого предположения свидетельствует постоянное положение максимума полосы комплекса в процессе окисления и отсутствие в спектрах полосы с максимумом при 800 нм, характерной для несвязанной меди(II). Катализатор расходуется до определенной концентрации, о чем свидетельствует снижение оптической плотности в водной фазе (рис. 2, кривые 1–2), затем устанавливается равновесная концентрация катализатора (рис. 2, кривые 2–8). Каталитическим действием обладает, вероятно, безводный комплекс меди(I), образующийся в органической фазе, концентрация которого также достигает равновесного значения в процессе окисления (рис. 3, кривые 3–6).

Из литературы известен механизм окисления молекулярным кислородом эфиров олеиновой и линолевой кислот [16–17]. Окисление протекает по радикально-цепному механизму с образованием первичных радикалов и первичных гидропероксидов. Олеаты образуют четыре изомерных радикала и четыре соответствующих гидропероксида по схеме:

Спектроскопически эти изомеры не различимы.

Исходя из литературных [2–4, 17] и полученных экспериментальных данных, предполагается следующая схема механизма влияния комплексов на процесс окисления.

Увеличение концентрации гидропероксидов возможно объяснить участием КС меди в реакциях зарождения (1) и (2):

$$RH + Cu^{2+}L_4 \to R^{\bullet} + Cu^{1+}L_4 + H^+, \quad (1)$$

$$RH + Cu^{1+}L_4 + O_2 \to Cu^{2+}L_4 + OH^- + RO^{\bullet}. \quad (2)$$

Далее следуют реакции продолжения цепей (3)–(4):

$$R^{\bullet} + O_2 \to RO_2^{\bullet}, \quad (3)$$

$$RO_2^{\bullet} + RH \to ROOH + R^{\bullet}. \quad (4)$$

Уменьшение концентрации гидропероксидов, более интенсивное с увеличением температуры, объясняется, возможно, участием катализатора в стадии распада гидропероксидов, не обеспечивающей разветвления цепей (5)–(6):

$$ROOH + Cu^{2+}L_4 \to RO_2^{\bullet} + Cu^{1+}L_4 + H^+, \quad (5)$$

$$ROOH + Cu^{1+}L_4 \to RO^{\bullet} + Cu^{2+}L_4 + OH^-. \quad (6)$$

В соответствии с предполагаемой схемой все приведенные реакции идут конкурентно, что позволяет установление равновесия комплексов Cu^{1+} и Cu^{2+}.

Выводы

Установлено участие КС меди с α-аланином в процессе окисления водно-липидного субстрата. Обнаружено установление равновесных

$$CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOR \xrightarrow{+O_2}$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH{=}CH\text{-}\dot{C}H\text{-}(CH_2)_6\text{-}COOR +$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_6\text{-}\dot{C}H\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOR +$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_6\text{-}CH{=}CH\text{-}\dot{C}H\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOR +$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}\dot{C}H\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_6\text{-}COOR \xrightarrow[+RH]{+O_2}$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH{=}CH\text{-}\underset{\underset{OOH}{|}}{C}H\text{-}(CH_2)_6\text{-}COOR +$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_6\text{-}\underset{\underset{OOH}{|}}{C}H\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOR +$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_6\text{-}CH{=}CH\text{-}\underset{\underset{OOH}{|}}{C}H\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOR +$$

$$CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}\underset{\underset{OOH}{|}}{C}H\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_6\text{-}COOR +$$

концентраций комплексов Cu^{2+} и Cu^{1+}. Установлен конкурентный характер образования и распада гидропероксидов. Предполагается участие комплексов меди в реакциях зарождения цепей и распада гидропероксидов.

Список литературы

1. Касаткина О.Т., Карташева З.С., Писаренко Л.М. Влияние поверхностно-активных веществ на жидкофазное окисление углеводородов и липидов // Журн. общей химии. 2008. Т. 78. № 8. С. 1298–1309.

2. Huang D., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // J. Agric. Food chem. 2005. V. 53. P. 1841–1856.

3. Roginsky V.A., Lassi E.A. Review of methods to determine chain-breaking activity in food // Food chem. 2005. V. 92 (2). P. 235–254.

4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 249 с.

5. Roginsky V.A., Barsukova T.K., Stegmann H.B. Iron bound to ferritin catalyzes ascorbate oxidation: effects of chelating agents // Biochimica et Biophysica Acta. 1997. V. 1335. P. 33–39.

6. Журавлева Л.А., Ушкалова В.Н., Крайник В.В. Разработка метода тестирования средств антиоксидантотерапии // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. Тамбов: ТГТУ, 2006. № 2(4). С. 144–154.

7. Крайник В.В., Журавлева Л.А., Ушкалова В.Н. Моделирование процессов окисления липидов биомембран // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2008. № 5. С. 31–38.

8. Удрис Г.А., Нейланд Я.А. Биологическая роль меди. Рига: Зинатне, 1990. 189 с.

9. Шлефер Г.Л. Комплексообразование в растворах. Л.: Химия, 1964. 381 с.

10. Инцеди Я. Применение комплексов в аналитической химии. М.: Мир, 1979. 376 с.

11. Булатов М.И., Калинкин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд., перераб. Л.: Химия, 1986. 432 с.

12. Ушкалова В.Н., Иоанидис Н.В., Кадочникова Г.Д. и др. Контроль перекисного окисления липидов. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1993. 181 с.

13. Яцимирский К.Б., Крисс Е.Е., Гвяздовская В.Л. Константы устойчивости комплексов металлов с биолигандами. Справочник. Киев: Наукова Думка, 1979. 228 с.

14. Марченко З.Н. Фотометрическое определение элементов: Пер. с польск. М.: Мир, 1971. 501 с.

15. Справочник химика / Под ред. Б.П. Никольского. Л.: Химия, 1967. Т. 4. 920 с.

16. Fatemi S.H., Hammond E.G. Analysis of oleate, linoleate and linolenate hydroperoxides on oxidized ester mixtures // Lipids. 1980. V. 15. № 5. P. 379–385.

17. Эмануэль Н.М. Химическая и биологическая кинетика // Успехи химии. 1981. Т. 50. № 10. С. 1721–1809.

SPECTROSCOPIC STUDY OF OXIDATION PROCESSES IN THE PRESENCE OF COPPER COMPLEXES

V.V. Krainik, V.N. Ushkalova, V.G Katanaeva

The spectroscopic study results have been given of molecular oxidation of a water-lipid substrate in the presence of copper complexes with α-alanine. The competitive character of hydroperoxide formation and decay has been determined. The complexes are assumed to participate in reactions of hydroperoxide chain formation and decay.

Keywords: spectroscopy, peroxidation, copper complexes with α-alanine.