

Определен состав покрытия сплавом Zn-Pb, полученного из электролита предложенного состава. В сплаве содержится от 1,2 до 7,5% Pb. Выход сплава по току составляет 77%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев В.Н. А. с. СССР № 411159. 1974.
2. Поветкин В.В., Данчук Л.Н. Патент РФ № 2118671. 1997.
3. Хансен Н. Андерко, К. / Структура двойных сплавов. М: Металлургия. 1982. Т. 2.
4. Медведев Г.И., Макрушин Н.А., Дубенков А.Н. // Ж.П.Х. 2002. Т. 75. № 11. С. 1834-1838.
5. Нечаев Е.А., Кукрин В.П. Итоги науки и техники. Электрохимия. М: 1989. Т. 29. С. 93-152.

Виктория Викторовна КРАЙНИК —
преподаватель кафедры химии
kraunikvika@mail.ru

Людмила Анатольевна ЖУРАВЛЕВА —
доцент кафедры химии,
кандидат химических наук
zhlaLA@yandex.ru

Сургутский государственный университет ХМАО-Югры

УДК 543.23:542.943.7:544.142.3

ВЫБОР МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ

SELECTION OF MODEL SYSTEM FOR ANTIOXIDANTS TESTING

АННОТАЦИЯ. Исследована кинетика окисления водно-липидного субстрата в присутствии комплексов меди (II) с аминокислотами. На основании полученных данных выбрана модельная система тестирования антиоксидантов. Отмечены особенности механизма действия природного ингибитора α -токоферола при водно-эмульсионном окислении.

SUMMARY. The water-lipid oxidation kinetics has been studied of copper (II) complexes with amino acids depending on ligand nature. Model system for antioxidants testing has been chosen. Features of the mechanism of α -tocopherol were determined in water-lipid oxidation in the presence of copper (II) complexes with α -alanine as a catalyst.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Окисление липидов, антиоксиданты, комплексы меди с аминокислотами.

KEY WORDS. Lipid oxidation, antioxidants, copper complexes with amino acids.

Поиск эффективных антиоксидантов является актуальным для пищевой и фармацевтической промышленности, медицины. Многочисленные исследования показали, что нарушение регуляции перекисного окисления липидов биомембран лежит в основе развития ряда заболеваний и патологий, способствует старению организма [1], [2], [3]. Поэтому в настоящее время в медицине большое внимание уделяется антиоксидантотерапии, как профилактическому методу снижения стрессовой чувствительности, улучшения адаптации к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, а также лечебного средства в совокупности

с противовоспалительными, гипотензивными и другими препаратами. Очевидно, что прогресс в антиоксидантотерапии, улучшении качества пищевых продуктов и фармацевтических препаратов возможен только на основе разработки эффективных методов тестирования антиоксидантной активности биологически активных соединений и лекарственных препаратов.

Целью работы является разработка модельной системы для тестирования антиоксидантов кинетическим методом, в условиях, моделирующих биомембраны.

В качестве модели исследовано каталитическое окисление эмульсии этилолеата в воде. Выбор этилолеата обусловлен тем, что олеиновая кислота и ее эфиры входят в состав большинства липидов живых организмов [3], [4], [5] и более доступна.

Экспериментальная часть. Этилолеат получают этерификацией олеиновой кислоты марки «ч.» этанолом в кислой среде с последующей очисткой и вакуумной перегонкой по стандартной методике [6]. Препараты аминокислот: DL-аланин (х.ч.), L-валин (х.ч.), L-лейцин (ч.), L-серин (ч.д.а.), DL-треонин (х.ч.) перекристаллизовывают из водно-этанольной смеси. DL- β -фенил- α -аланин (ч.), L-гистидин (ч.д.а.), L-лизин (ч.), хлорид меди (II) (х.ч.), цетилтриметиламмоний бромид (ч.) используют без дополнительной очистки. Ионол марки «ч.» очищают двукратной кристаллизацией из абсолютного этанола [6]. Для приготовления растворов и водной эмульсии используют бидистиллированную воду.

Окисление проводят по методике [7]: в 1 мл эфира ненасыщенной жирной кислоты добавляют по 1 мл водных растворов цетилтриметиламмония бромида (ЦТМАБ) и комплексного соединения (КС) хлорида меди с α -аминокислотами с конечными концентрациями в пробе: медь — $(1-3) \cdot 10^{-3}$, α -аминокислота — $(5-10) \cdot 10^{-3}$, ЦТМАБ — $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л в контрольной пробе и с добавками ингибитора. Пробу доводят водой до 4 мл, термостатируют при температуре $60 \pm 0,2$ °С, насыщают молекулярным кислородом. Волюмометрически при непрерывном перемешивании определяют объем поглощенного кислорода во времени.

Для оценки эффективности антиоксиданта и его механизма действия используют метод математического моделирования. С этой целью в Microsoft Excel методом наименьших квадратов подбирают линии тренда и наилучшие аппроксимирующие функции кинетических кривых (КК), с последующим дифференцированием последних. В результате получают график в виде линейных участков, по которым выбраны критерии эффективности и механизма действия координационных соединений и ингибиторов.

Результаты и их обсуждение. Поскольку большинство промышленных инициаторов не активны в водно-липидной среде, то для инициирования процесса были использованы катализаторы. Показано [8], [9], что катионы меди являются наиболее активными катализаторами в ряду других d -элементов: $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.

С учетом результатов этих исследований в настоящей работе использованы катионы меди с конечной концентрацией в субстрате $(1-2) \cdot 10^{-3}$ моль/л в качестве катализатора.

Известно [10], [11], что микроэлементы в клетке и биологических жидкостях чаще всего функционируют в виде координационных соединений (КС) с белками, аминокислотами и другими компонентами. Очевидно, что при выборе кинетической модели биомембран необходимо учитывать тот факт, что катионы катализатора должны входить в состав комплексов.

Для изучения процессов окисления липидного субстрата в присутствии аминокислот в качестве лигандов, выбран следующий состав КС: содержание катионов

меди (II) и α -аминокислот в концентрациях $(1-2) \cdot 10^{-3}$ и $(5-10) \cdot 10^{-3}$ моль/л соответственно, что обеспечивает максимальную эффективность комплексообразования. Для количественного сравнения результатов графически определены начальные и конечные скорости КК, кривые с хорошей дисперсией описываются параболой (табл. 1). В соответствии с теорией цепных разветвленных процессов, парабола соответствует мономолекулярному механизму разветвления цепей и бимолекулярному механизму обрыва цепей.

Таблица 1

Количественные параметры кинетики окисления липидного субстрата в присутствии α -аминокислот

Аминокислоты	$W_{нач} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$W_{кон} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$a \cdot 10^9$ моль·л ⁻¹ ·с ⁻²	Уравнение параболы $f(x)$
контроль	3,4±0,1	6,2±0,1	11,0±0,2	$3 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
аланин	5,0±0,3	9,5±0,1	15,0±0,3	$4 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 4 \cdot 10^{-2} \cdot x$
валин	3,8±0,2	9,3±0,3	16,0±0,5	$1 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
лизин	3,1±0,5	6,7±0,4	11,0±0,4	$7 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
треонин	3,0±0,3	6,1±0,2	10,0±0,3	$3 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
серин	3,0±0,3	5,1±0,3	8,0±0,3	$2 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
гистидин	2,1±0,3	5,1±0,5	4,0±0,2	$1 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
лейцин	2,0±0,4	4,9±0,4	3,1±0,5	$4 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 0,6 \cdot 10^{-2} \cdot x$
фенилаланин	1,4±0,2	4,0±0,4	3,0±0,3	$2 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 0,7 \cdot 10^{-2} \cdot x$

Изменение кинетики окисления липидного субстрата в зависимости от природы аминокислоты может быть объяснено несколькими факторами:

1) электронные эффекты в молекулах лигандов, различным образом влияющие на каталитическую активность катиона меди;

2) различия в структуре образующихся комплексов;

3) различия в строении образующихся эмульсий.

Полученные результаты позволяют предполагать, что каталитическую активность проявляют хелатированные катионы меди. Этот вывод подтверждается изменением активности в ряду аминокислот, который соответствует ослаблению донорной активности боковой цепи. Исключение составляет лейцин, исследования проводились при рН 5,5. Поскольку в щелочной среде лейцин выпадал в осадок в виде гидроксокомплексов. Вероятно, протонирование лиганда в кислой среде снижает каталитическую активность хлорида меди (II). Кроме того, протонирование влияет на степень образования комплекса, снижая количество образовавшихся комплексных частиц, что также способствует снижению каталитической активности меди.

Следующими факторами, объясняющими снижение каталитической способности хелатированной меди (II), могут быть различия в структуре образовавшихся комплексов.

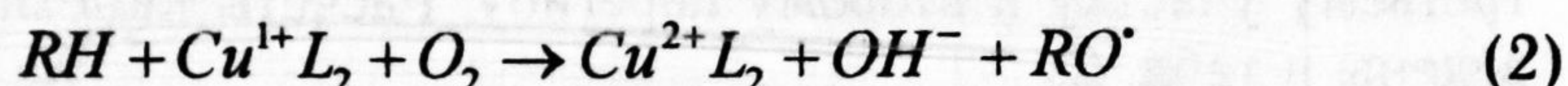
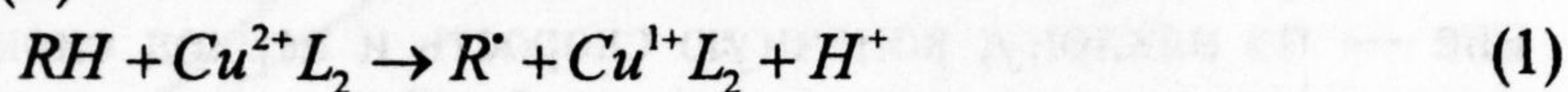
Известно [12], [13], что аминокислоты, содержащие дополнительные донорные группы в боковой цепи, способны образовывать связи с ионом металла не только посредством карбокси- и аминогруппы. Вероятно, снижение каталитической активности координированной таким образом меди может быть обусловлено дополнительным экранированием каталитического центра.

Кроме того, с усложнением структуры координационного соединения затрудняется проникновение катализатора внутрь мицелл. Поэтому еще одним факто-

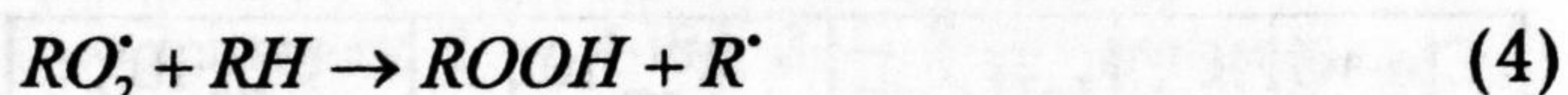
ром, объясняющим снижение каталитической активности координационных соединений, является отсутствие контакта субстрата окисления с катализатором.

Исходя из литературных [7], [8], [9], [14], [15], [16] и полученных экспериментальных данных можно предположить, что механизм влияния комплексов на процесс окисления происходит по следующей схеме.

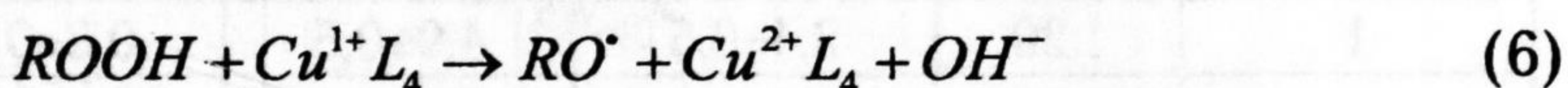
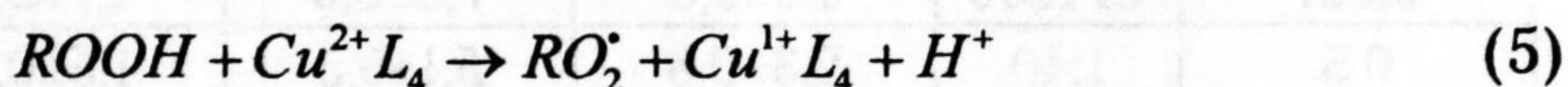
Инициирование процесса происходит за счет участия КС меди в реакциях зарождения цепей (1), (2):



Продолжение цепей протекает по следующим дополнительным реакциям (3), (4):



Далее, возможно, участие катализатора в стадии распада гидропероксидов, не обеспечивающей разветвления цепей (5), (6):



В соответствии с предполагаемой схемой все приведенные реакции идут конкурентно, что позволяет установиться равновесию комплексов Cu^{1+} и Cu^{2+} [16].

Таким образом по результатам проведенных исследований в качестве катализатора окисления модельного субстрата предложено КС меди (II) с α -аланином, приготовленном в боратном буферном растворе с рН 9. Конечная концентрация в растворе Cu^{2+} — $(2-3) \cdot 10^{-3}$, аминокислоты — $(4-5) \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Поскольку данный субстрат моделирует свободнорадикальное окисление липидов биомембран, изучение влияния α -токоферола (α -ТФ) в условиях выбранной модели представляет большой интерес. Исследован широкий интервал его концентрации в соотношении с избытком катализатора: 3,3:1; 10:1; 40:1; 50:1; 3000:1; 14300:1. Типичные КК приведены на рис. 1.

Показано, что в зависимости от соотношения концентраций α -ТФ и катионов меди в составе координационного соединения меняется характер КК. Качественно можно выделить четыре типа КК.

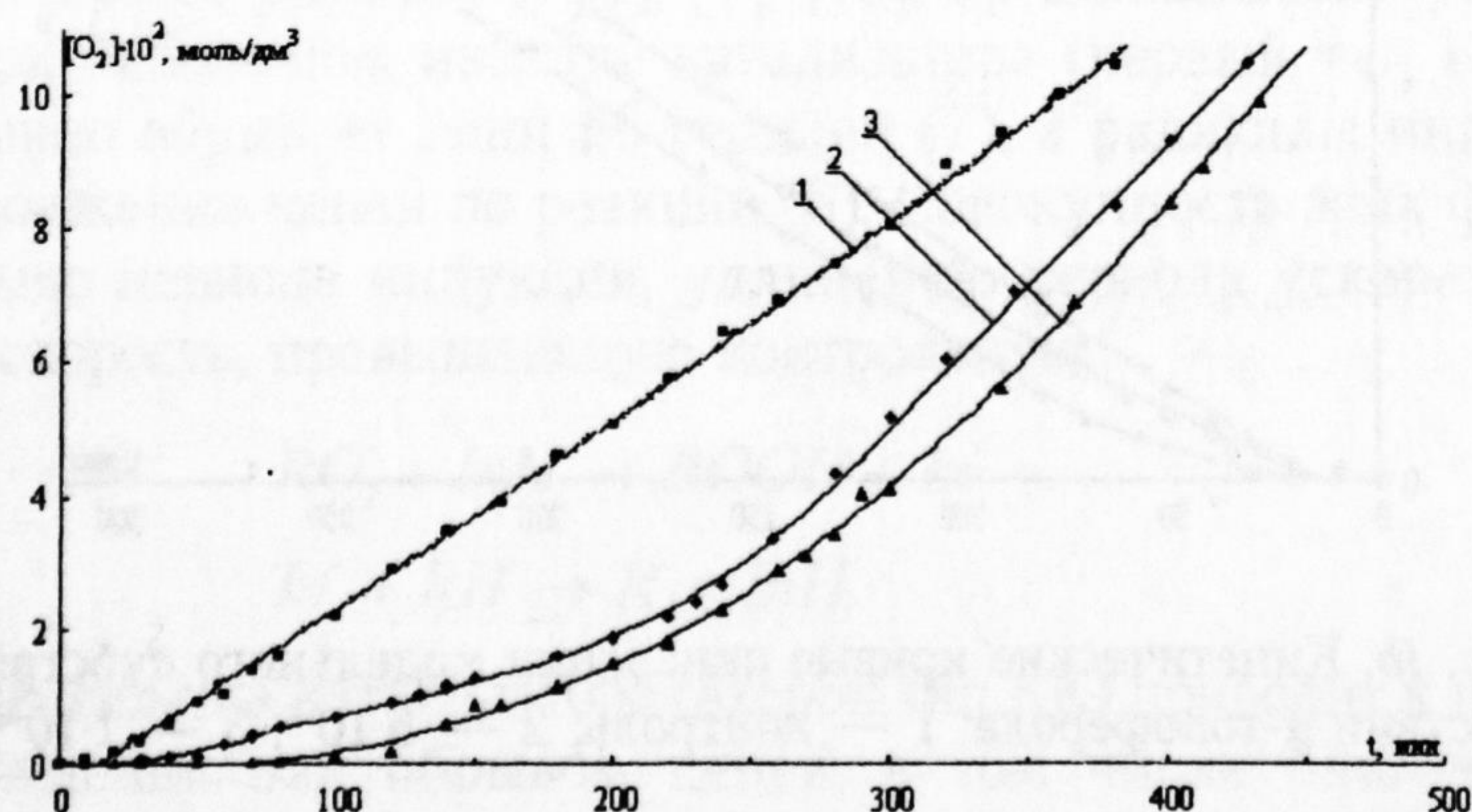


Рис. 1а. Кинетические кривые окисления модельного субстрата в присутствии α -токоферола: 1 — контроль; 2 — $2 \cdot 10^{-4}$; 3 — $6 \cdot 10^{-4}$ моль/л

При соотношениях катализатор:ингибитор ($\text{Cu}^{2+}:\text{InH}$) 3,3:1; 10:1 (рис 1a) наблюдается период полного торможения пропорциональной концентрации α -ТФ, медленный выход из периода индукции и достижение постоянной скорости процесса. По величинам дисперсии кривые аппроксимированы тремя функциями: начальный участок — прямой, следующий — параболой и третий участок — прямой. Первая производная позволяет определить период индукции — по первой точке перегиба; изменение начальной скорости — по второму участку; ускорение — по наклону; конечную скорость и период окончания ускорения — по третьему участку и второму перегибу. Расчеты кинетических параметров приведены в табл. 2.

Таблица 2

Количественные параметры кинетики окисления модельного субстрата в присутствии α -токоферола (α -ТФ)

$C[\alpha\text{-тф}] \cdot 10^4$, моль/л	$\text{InH}:\text{Cu}^{2+}$	$W_{\text{нач}} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$W_{\text{кон}} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$a \cdot 10^8$ моль·л ⁻¹ ·с ⁻²	τ_1 , мин.	τ_2 , мин.
контроль	—	$2,4 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$	—	—
0,001	1:14000	$1,0 \pm 0,5$	$7,8 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,4$		
0,5	1:40	$2,3 \pm 0,8$	$5,1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,5$	—	—
1	1:20	$2,4 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$	20 ± 6	—
2	1:10	$0,8 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,3$	50 ± 5	220 ± 10
6	1:3,3	$0,5 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,3$	80 ± 5	240 ± 12

Показано, что с уменьшением концентрации ингибитора период полного торможения τ_1 , период окончания ускорения τ_2 и конечная скорость снижаются; начальная скорость возрастает. При дальнейшем уменьшении концентрации α -ТФ период полного торможения исчезает (рис. 1b). КК аппроксимируют параболой, при этом конечные скорости процесса составляют $(5,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$ моль·л⁻¹·с⁻¹, а ускорение снижается с увеличением концентрации ингибитора и уменьшением избытка катализатора соответственно (табл. 2).

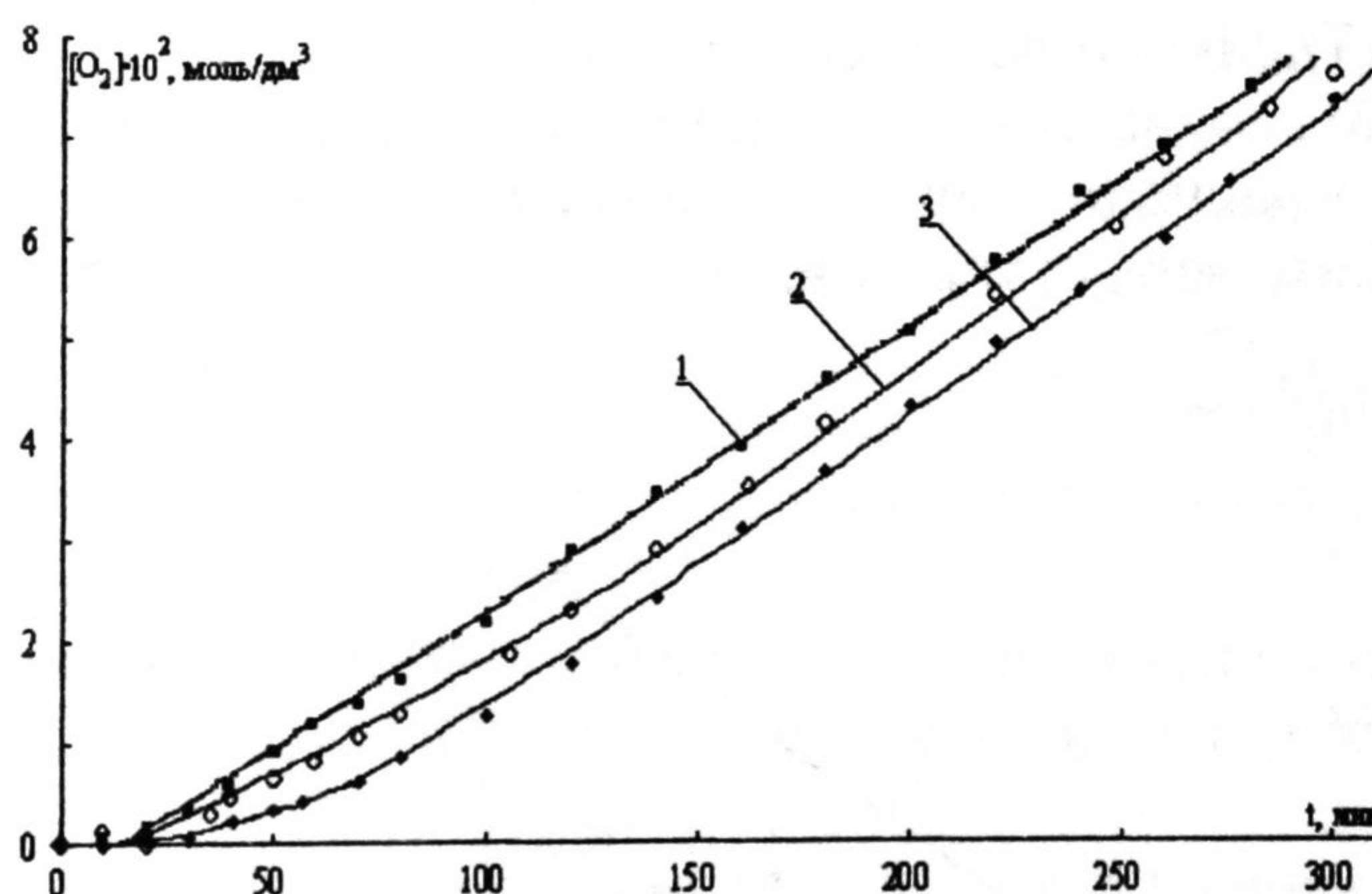


Рис. 1b. Кинетические кривые окисления модельного субстрата в присутствии α -токоферола: 1 — контроль; 2 — $5 \cdot 10^{-5}$; 3 — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л

При увеличении избытка катализатора в 50 раз и выше характер КК усложняется (рис. 1c) и их удается аппроксимировать только полиномами пятой степени.

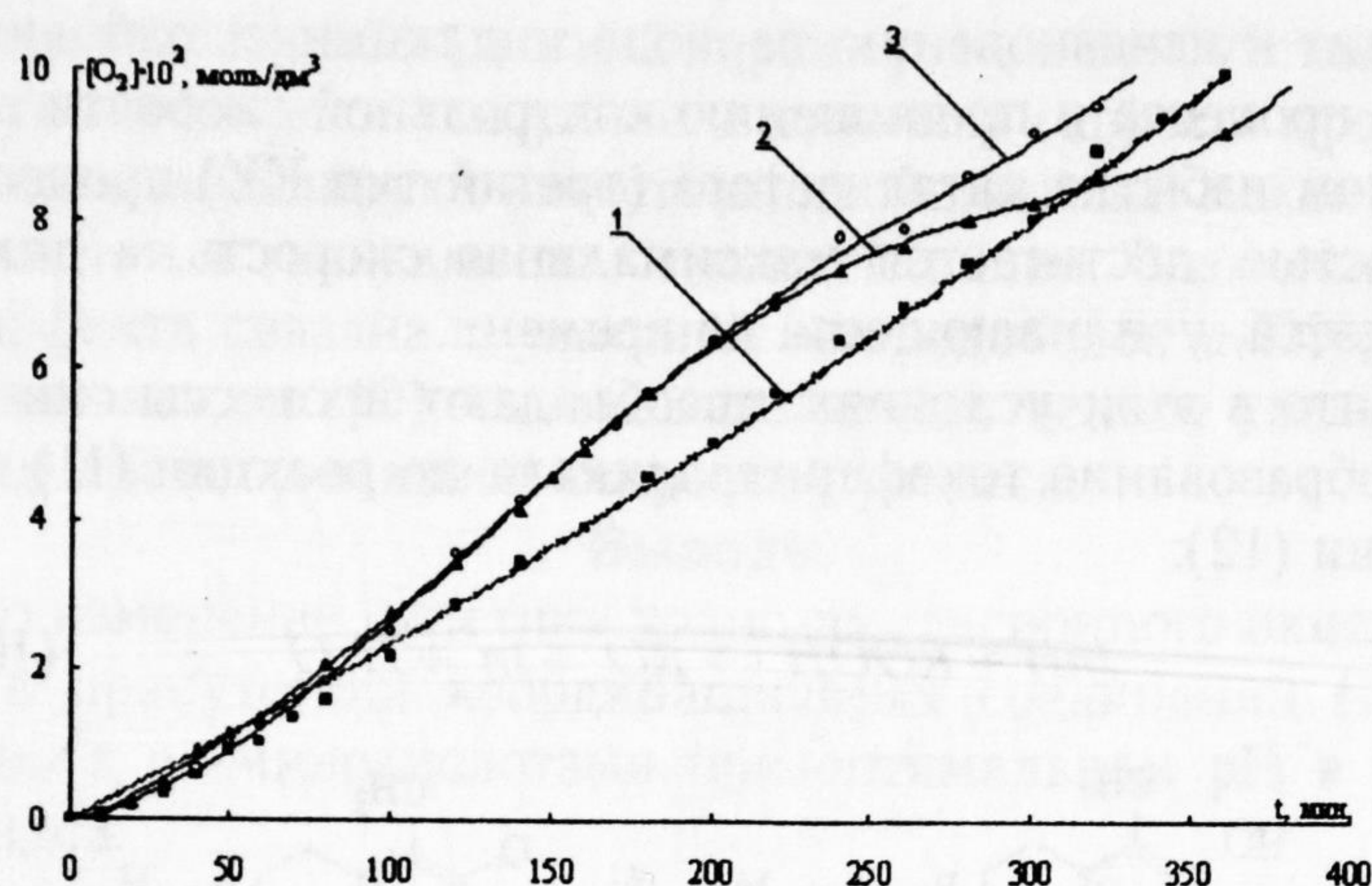


Рис. 1с. Кинетические кривые окисления модельного субстрата в присутствии α -тоферола: 1 — контроль; 2 — $4 \cdot 10^{-5}$, 3 — $7 \cdot 10^{-7}$ моль/л

Дифференцирование полиномов позволяет проанализировать характер изменения скорости. На рис. 2а и 2б представлены типичные результаты.

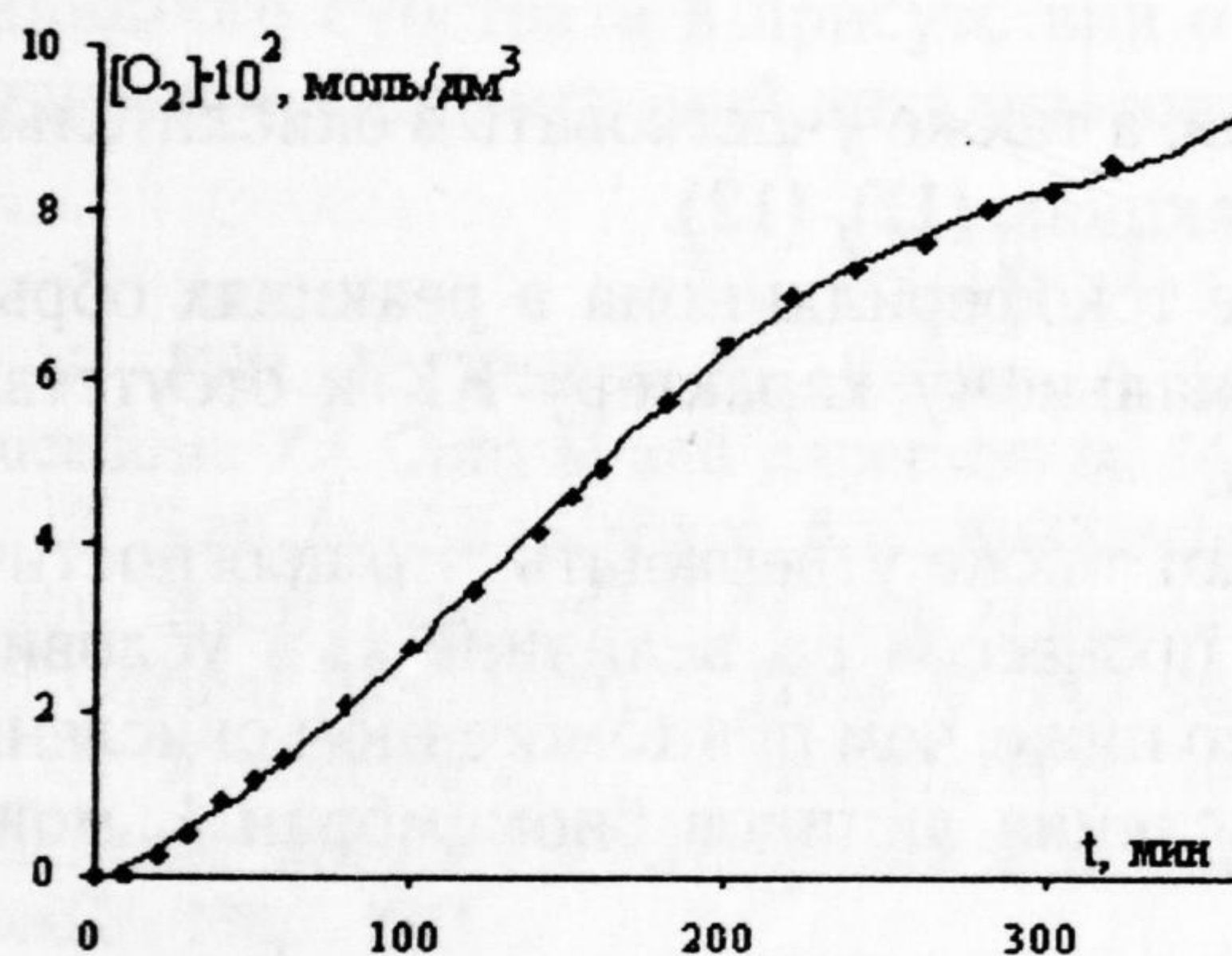


Рис. 2а. КК окисления модельного субстрата в присутствии $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л α -токоферола и аппроксимация зависимости полиномом пятой степени с дисперсией 0,99

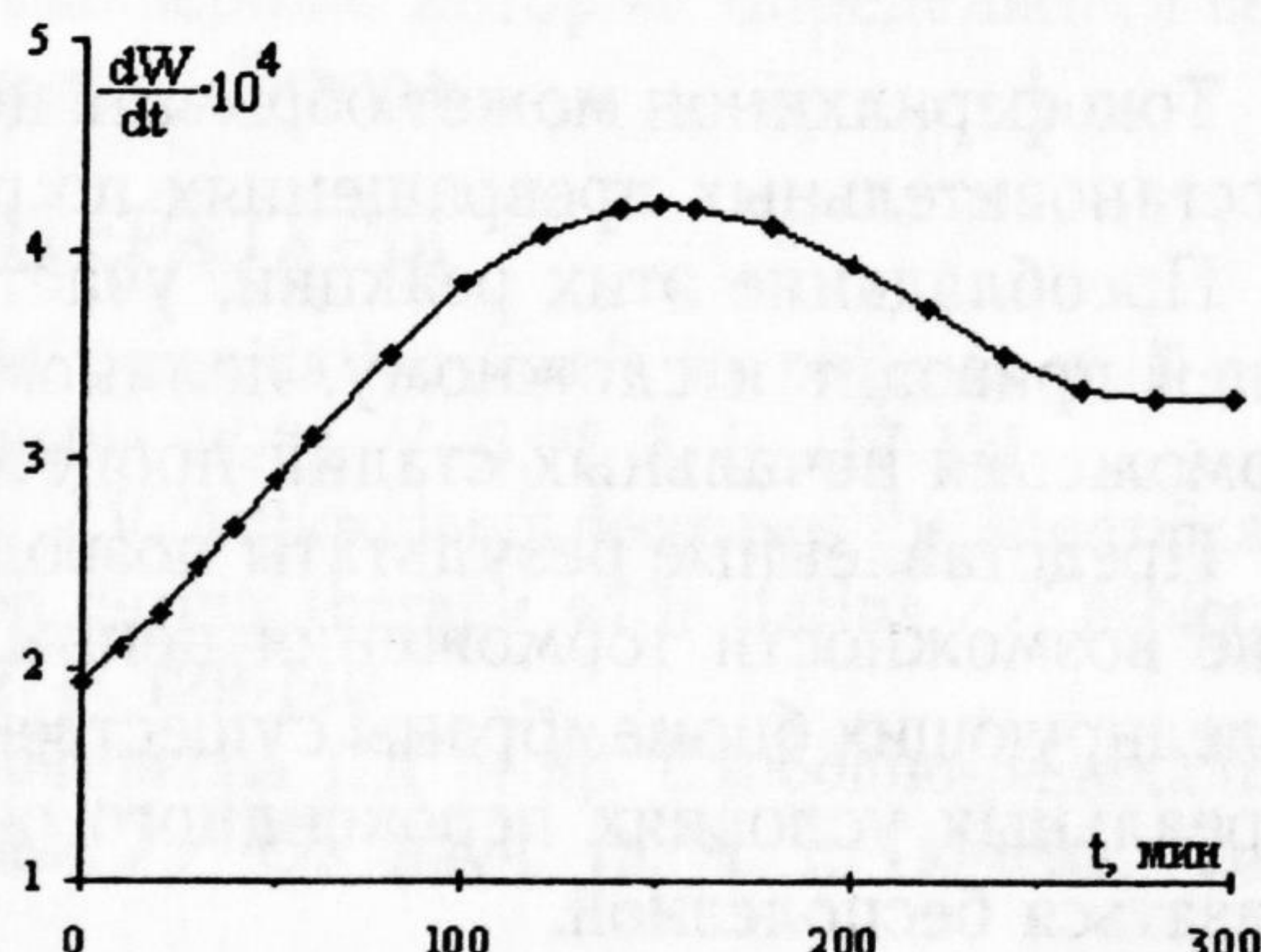
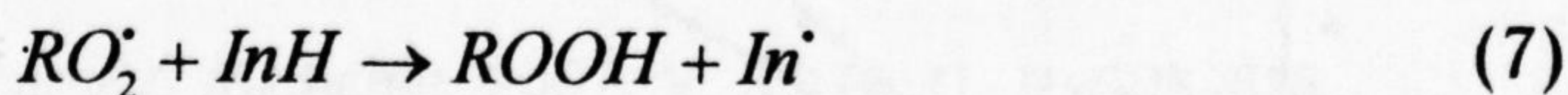
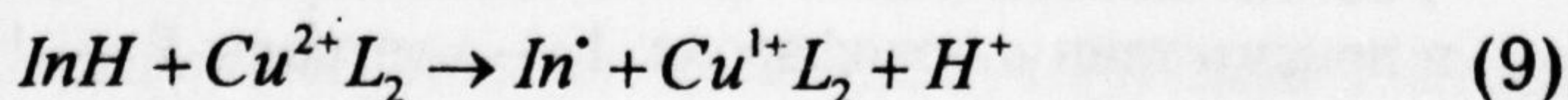


Рис. 2б. Зависимость скорости окисления модельного субстрата в присутствии $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л α -токоферола от времени

Базируясь на экспериментальных и теоретических результатах исследований кинетики гомогенного окисления [3], [7], [15], представленные результаты показали, что при небольшом избытке катализатора (первый тип КК), вероятно, α -ТФ эффективно обрывает цепи по реакции (7), а радикалы ингибитора участвуют в продолжении цепей по реакции (8). Совокупность этих факторов приводит к наличию периода индукции, удлинению периода ускорения и выходу на конечную скорость, превышающую контрольную.



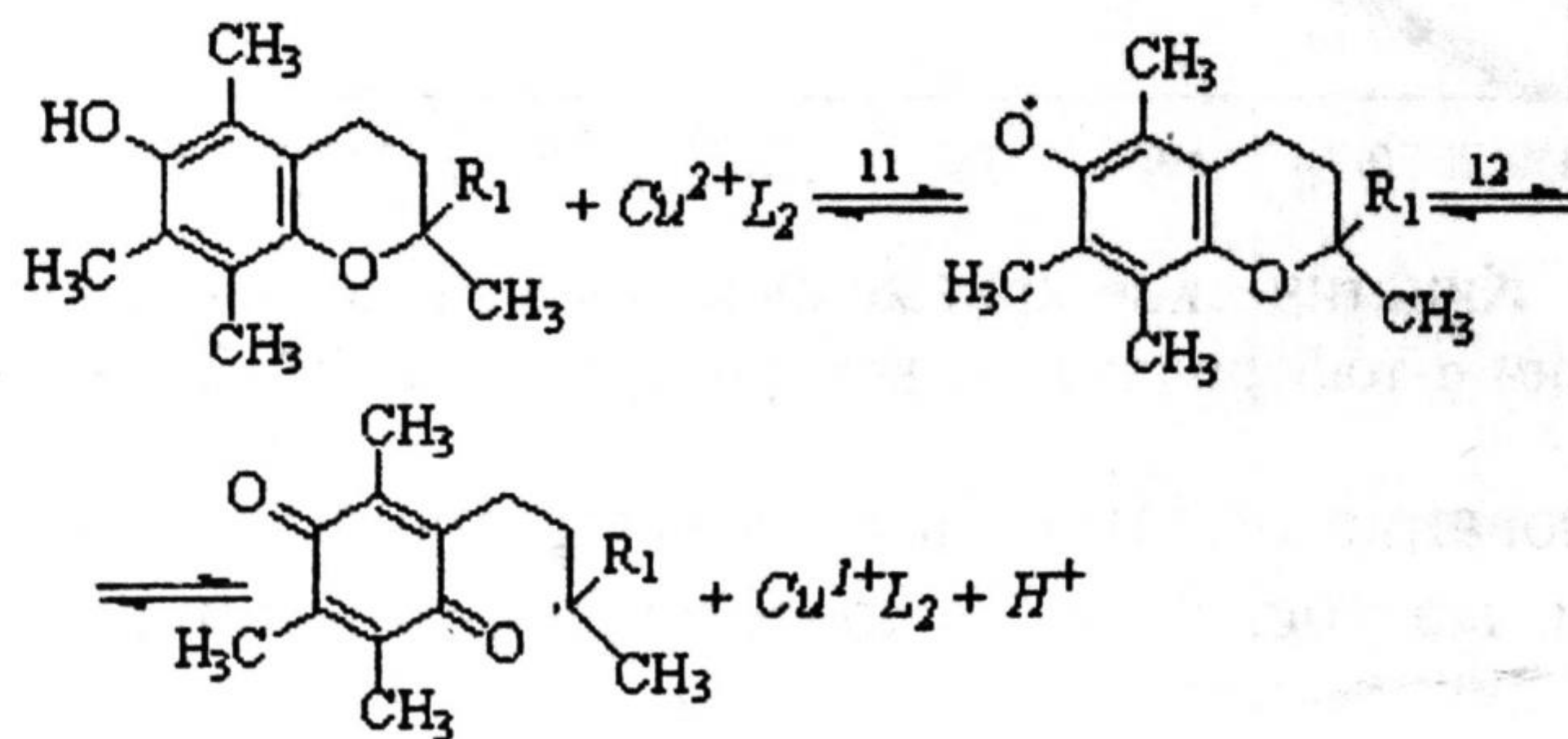
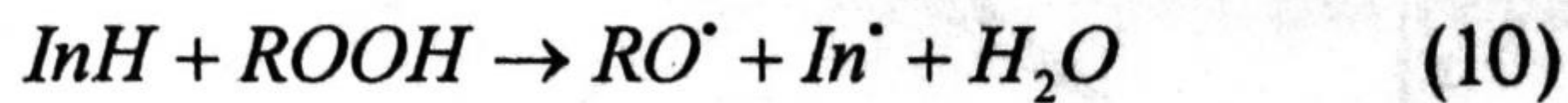
Увеличение избытка катализатора (второй тип КК) приводит к преобладанию реакций зарождения над обрывом цепей, в том числе благодаря участию α -токоферола в реакции (9):



Это приводит к исчезновению периода индукции, параболическому характеру описания процесса и превышению контрольной скорости процесса.

При большом избытке катализатора (третий тип КК) процесс начинается с высокой скоростью, достигается максимальная скорость, а далее следует замедление процесса, усиливающееся во времени.

Очевидно, что в этих условиях, преобладают процессы окисления α -ТФ по реакции (10), образование токоферилрадикала по реакции (11) и токоферилхинона по реакции (12):



Токоферилхинон может обрывать цепи, а также участвовать в окислительно-восстановительных превращениях по реакциям (11), (12).

Преобладание этих реакций, участие токоферилхинона в реакциях обрыва цепей приводит к сложному, полиномиальному характеру КК и отсутствию торможения начальных стадий процесса.

Представленные результаты позволяют также утверждать, что прогностические возможности торможения цепных процессов по величине k_7 в условиях моделирующих биомембраны существенно ниже, чем при гомогенном окислении. В реальных условиях пероксидного окисления липидов биомембран k_7 может оказаться бесполезной.

В целом, снижение антиоксидантной активности α -ТФ, вероятно, обусловлено прежде всего его участием в реакциях продолжения цепей (8).

На рис. 1d (кривая 2) приведены результаты окисления субстрата при очень большом избытке катализатора, в сравнении с контрольной пробой (кривая 1).

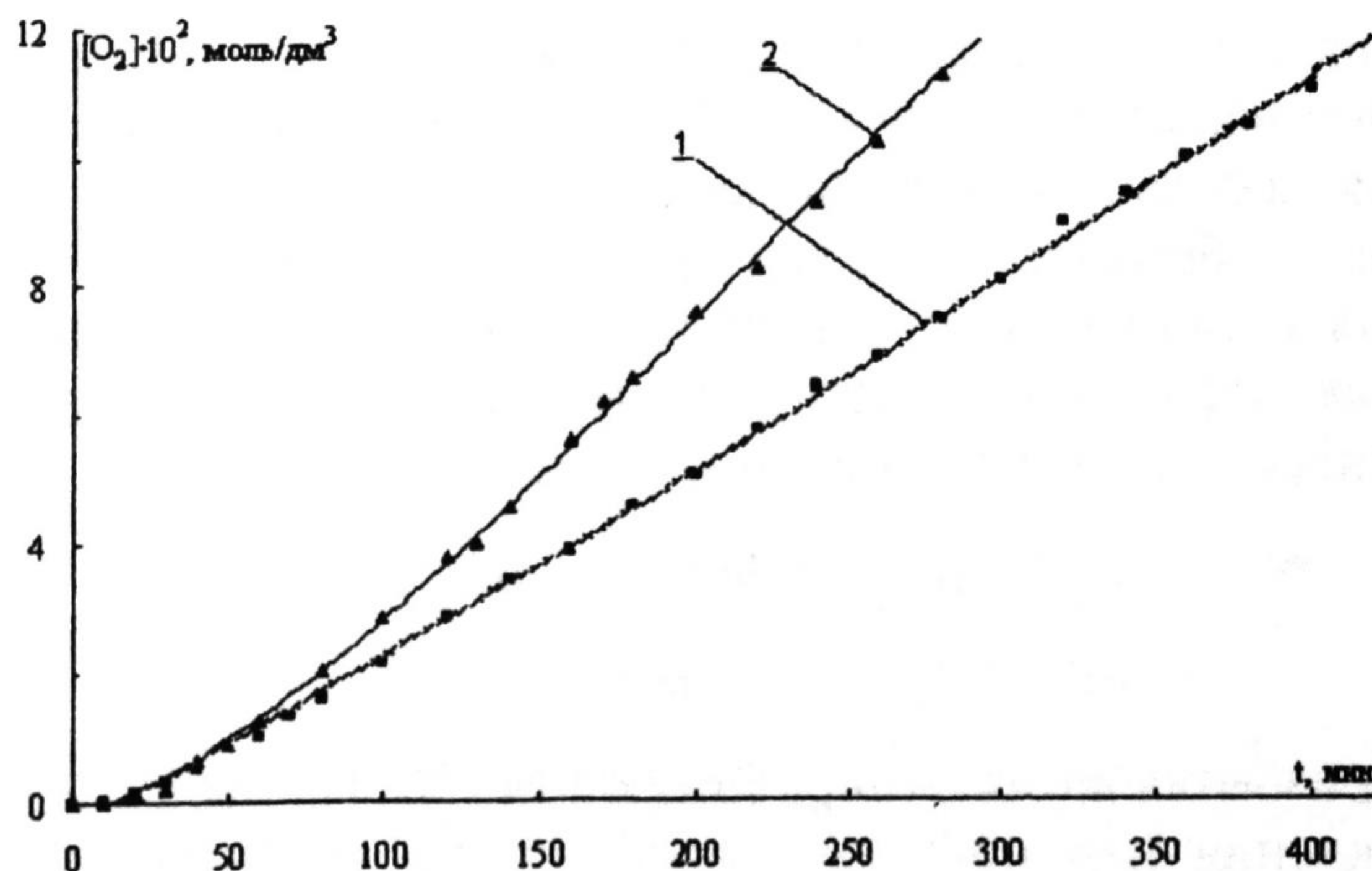


Рис. 1d. Кинетические кривые окисления модельного субстрата в присутствии α -токоферола: 1 — контроль; 2 — $1,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л

Обе кривые имеют параболический характер, но в присутствии микродобавок α -токоферола увеличивается ускорение и конечная скорость процесса (табл. 2).

Эти результаты моделируют известный двойственный механизм воздействия компонентов клетки в зависимости от концентрации. Возможная причина наблюдаемого эффекта связана с участием микродобавок α -ТФ в квадратичном распаде гидропероксидов (10), что вызывает существенное увеличение скорости разветвления цепей и суммарной скорости процесса.

Выводы

1. Показано изменение кинетики водно-эмульсионного окисления липидного субстрата в присутствии координационных соединений $(1-2) \cdot 10^{-3}$ меди с $(5-10) \cdot 10^{-3}$ моль/л α -аминокислотами при оптимальном рН в зависимости от природы лигандов.

2. Предложен состав модельного субстрата для изучения окисления жирнокислотных компонентов биомембран, содержащий пробу липидного субстрата и воды в соотношении 1:4 (по объему) с добавками $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л цетилтриметиламмония бромида и координационных соединений $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л меди с $(2-6) \cdot 10^{-3}$ моль/л α -аланином в качестве катализатора.

3. Выявлены особенности механизма процессов каталитического окисления липидного субстрата в присутствии α -токоферола, который определяется соотношением концентраций катализатора и ингибитора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kilic, N., Ozden, M., Kalkan, A. Lipid peroxidation levels in patients with acute brucellosis // *Clinical and Experimental Medicine*. 2005. V. 5 № 3. P. 117-121.
2. Lankin, V.Z., Tikhaze, A.K., Kukharchuk, V.V. Antioxidants decreases the intensification of low density lipoprotein *in vivo* peroxidation during therapy with statins // *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003. V. 249. № 2. P. 129-140.
3. Ушкалова В.Н., Иоанидис Н.В., Кадочникова Г.Д. и др. Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике // Сб. науч. тр. Ч. 1. Тюмень: Изд-во ТюмГУ. 1997. 132 с.
4. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции / Пер. с англ. М.: Мир. 1997. 624 с.
5. Камкин А.Г., Киселева И.С. Физиология и молекулярная биология мембран клеток. М.: Академия. 2008. 585 с.
6. Общий практикум по органической химии / Под ред. А.Н. Коста. М.: Мир. 1965. 678 с.
7. Ушкалова В.Н., Иоанидис Н.В., Кадочникова Г.Д., Деева З.М. Контроль перекисного окисления липидов. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1993. 181 с.
8. Журавлева Л.А., Ушкалова В.Н. Исследование антиоксидантных свойств капотена кинетическим методом // *Химико-фармацевтический журнал*. М.: Изд-во ФОЛИУМ, 2006. Т. 40. № 11. С. 11-14.
9. 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.
10. Bradberry, S. Copper // *Medicine*. 2007. V. 35 № 11. P. 608-616.
11. Удрис Г.А., Нейланд Я.А. Биологическая роль меди. Рига: Зинатне. 1990. 189 с.
12. Болотин С.Н., Буков Н.Н., Волынкин В.А., Панюшкин В.Т. Координационная химия природных аминокислот. М.: Изд-во ЛКИ. 2008. 240 с.
13. Стаценко О.В. Некоторые особенности комплексообразования оксиаминокислот с медью (II) по данным спектров ЭПР: Автореф. ... канд. хим. наук. Краснодар. КубГУ. 2003. 22 с.
14. Decker, E.A., McClements, D.J. Transition metal and hydroperoxide Interactions // *Int. News Fats, Oils and Relat. Mater*. 2001. V. 12. № 3. P. 251-256.

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

16. Крайник В.В., Ушкалова В.Н., Катанаева В.Г. Спектроскопическое исследование процессов окисления в присутствии комплексов меди / Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2009. № 6. С. 101-105.

Вадим Викторович ЕРМАКОВ —
зав. лабораторией биогеохимии окружающей среды,
профессор, доктор биологических наук

Сергей Федорович ТЮТИКОВ —
старший научный сотрудник лаборатории
биогеохимии окружающей среды,
кандидат биологических наук

Сабзбахор Давлатовна ХУШВАХТОВА —
старший научный сотрудник лаборатории
биогеохимии окружающей среды,
кандидат химических наук

Валентина Николаевна ДАНИЛОВА —
младший научный сотрудник лаборатории
биогеохимии окружающей среды

*Институт геохимии и аналитической химии
РАН им. В.И. Вернадского
ermakov@geokhi.ru*

Виктор Александрович БОЕВ —
доцент кафедры геоэкологии
Тюменского государственного университета,
кандидат биологических наук
vikboev2009@mail.ru

Людмила Николаевна БАРАБАНЩИКОВА —
преподаватель кафедры химии

Елена Александровна ЧУДИНОВА —
преподаватель кафедры анатомии и физиологии
acadagro@tmn.ru

*Тюменская государственная
сельскохозяйственная академия*

УДК 543:546.711 + 546.23

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА В БИОМАТЕРИАЛАХ

PECULIARITIES OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SELENIUM IN BIOLOGICAL MATERIALS

АННОТАЦИЯ. Представлены данные по сравнительному определению селена в биоматериалах посредством атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС), спектрофлуориметрии и высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).