

На правах рукописи



Крайник Виктория Викторовна

**КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ МОДЕЛЬНЫХ
ВОДНО-ЛИПИДНЫХ СИСТЕМ**

02.00.04 – физическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Тюмень – 2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Сургутский государственный университет ХМАО-Югры» на кафедре химии и ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет» на кафедре неорганической и физической химии

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ушкалова Валентина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Курина Лариса Николаевна

доктор химических наук, профессор
Щипанов Владимир Павлович

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Югорский государственный университет», г. Ханты-Мансийск

Защита диссертации состоится «29» октября 2010 года в 15 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета ДМ212.274.11 при ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет» по адресу: 625003, Тюмень, ул. Перекопская, 15^а, ауд. 410.

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-библиотечном центре ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет».

Автореферат разослан « 23» сентября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ларина Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Известно, что процессы окисления органических веществ молекулярным кислородом протекают по цепному механизму с вырожденным разветвлением. Изучение закономерностей таких процессов обусловило прогресс во многих областях жизни и деятельности человека. На этой основе совершенствуются процессы хранения, оценки качества пищевых продуктов, полимеров, лекарственных препаратов, моторных топлив и масел. С развитием радиационной химии были обнаружены неферментативные, свободнорадикальные процессы окисления, которые присутствуют в нормальной клетке и меняют свою интенсивность под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды. В последнее время сформирована научная гипотеза, согласно которой, молекулярный механизм развития многих заболеваний обусловлен изменением интенсивности свободнорадикального окисления липидов биомембран.

Очевидно, что теоретической основой для разработки методов диагностики, профилактики и лечения таких патологий, а также способов торможения окислительной деструкции липидосодержащих продуктов, должны служить закономерности окисления компонентов в сложных водно-липидных системах. Актуальным является изучение особенностей кинетики и механизма окисления в таких системах путем сравнения с кинетикой более простых систем.

Часть работы выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт № П1595).

Целью настоящей работы является изучение особенностей кинетики окисления водно-липидных систем, моделирующих биомембраны, в соответствии с классической схемой свободнорадикального окисления углеводов и их производных, торможения этих процессов антиоксидантами.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- выбор компонентного состава модельной водно-липидной системы;

- подбор оптимального диапазона рН комплексообразования меди (II) с α -аминокислотами;
- исследование дисперсных характеристик модельной системы;
- исследование кинетики и механизма окисления модельной системы в присутствии координационных соединений меди (II) с α -аминокислотами и выбор каталитической системы среди наиболее устойчивых и активных комплексов;
- изучение особенностей кинетики и механизма действия синтетических и природных антиоксидантов;
- уточнение на основе экспериментальных исследований классической схемы окисления молекулярным кислородом.

Научная новизна. Установлена кинетическая активность координационных соединений (КС) меди (II) с α -аминокислотами в процессах окисления компонентов водно-липидной системы молекулярным кислородом. Выявлен ряд активности аминокислот, обусловленный электронными эффектами в молекулах лигандов, различиями в структуре образующихся комплексов и дисперсных частиц.

Предложено уточнение классического механизма окисления применительно к многокомпонентным водно-липидным системам. Доказано участие КС меди (II) с α -аминокислотами в реакциях зарождения и продолжения цепей. Показано снижение энергии активации процессов образования и распада продуктов окисления липидов в присутствии КС меди (II).

Установлен различный характер влияния стандартного синтетического ингибитора (ионола) и природного антиоксиданта (α -токоферола) на процесс окисления модельной системы в зависимости от их концентрации, обусловленный участием ингибиторов не только в реакциях обрыва цепей, но и в реакциях зарождения и разветвления цепей.

На основании совокупности экспериментальных данных показаны низкие прогностические способности константы скорости обрыва цепей для

сложных многокомпонентных каталитических водно-липидных систем, моделирующих состав биомембран.

Практическая значимость. Предложен состав модельной водно-липидной системы для тестирования антиоксидантов. Система содержит эфиры высших ненасыщенных жирных кислот и воду в соотношении 1 : 3 (по объему) с добавками $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л эмульгатора цетилтриметиламмония бромида и КС $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л меди (II) с $(2-6) \cdot 10^{-3}$ моль/л α -аланином в качестве катализатора.

Предложен способ торможения процессов каталитической деструкции водно-липидных систем путем добавления двух-пятикратного избытка фенилаланина или лейцина, или гистидина.

Обнаруженные закономерности связи каталитической активности КС меди (II) с α -аминокислотами со строением лигандов, а также предполагаемые причины снижения эффективности стандартных ингибиторов, могут быть использованы для объяснения процессов, протекающих при свободно-радикальном окислении липидов в реальных биологических системах.

Достоверность полученных результатов обеспечивается совместным использованием ряда физико-химических методов исследования, адекватных поставленным задачам. Выявленные закономерности хорошо воспроизводятся при многократном повторении опытов и подтверждаются при статистической обработке данных.

На защиту выносятся следующие положения:

- экспериментальное обоснование выбора состава модельной системы для изучения свободнорадикального окисления липидов биомембран;
- новые данные по кинетике окисления липидов молекулярным кислородом в присутствии КС меди (II) с аминокислотами;
- новые данные по кинетике окисления липидов молекулярным кислородом в присутствии синтетического и природного ингибиторов в условиях, моделирующих окисление липидов биомембран;

- уточненная классическая схема механизма каталитического и ингибированного окисления углеводов применительно к многокомпонентным водно-липидным системам;
- практические рекомендации по тестированию антиоксидантов с помощью предложенной модельной системы и способ торможения окислительной деструкции водно-липидных систем.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на VI и VII открытой окружной конференции «Наука и инновации XXI века» (Сургут, 2005 и 2007 гг.), Международной конференции «Ломоносов-2007, 2008» (Москва, 2007 и 2008 гг.), VI Всероссийском научном семинаре «Химия и медицина» (Уфа, 2007 г.), Всероссийской конференции им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты» (Москва, 2008 г.), Всероссийской научной конференции «Химическая кинетика окислительных процессов. Окисление и антиокислительная стабилизация». (Уфа, 2009 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы. Работа изложена на 127 страницах, включая 36 рисунков, 11 таблиц и 4 листа приложений. Список литературы включает 184 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении освещены актуальность работы и сформулированы цели и задачи исследования.

В первой главе изложен обзор литературы, отражающий основы теории радикально-цепных реакций, кинетики, механизма окисления жирнокислотных компонентов липидов биомембран, торможения этих процессов. Освещена теория комплексообразования меди с природными аминокислота-

ми, теория мицеллообразования в присутствии аминокислот и белков, основы межфазного и мицеллярного катализа.

Во второй главе приводится описание методик, применяемых в работе.

В качестве липидного компонента использована смесь жирных кислот оливкового масла, этерифицированных этанолом в кислой среде по стандартной методике (липиды). Ингибиторы подвергались очистке по стандартным методикам. Кинетика окисления компонентов модельных водно-липидных систем изучена кинетическим методом с использованием термостатируемой волюмометрической установки. Кинетика накопления и распада продуктов окисления изучена методами спектрофотометрии и хромато-масс-спектрометрии.

Оптимальное значение рН комплексообразования установлено спектрофотометрически. Содержание меди в комплексах исследовалось методами молекулярного и атомно-абсорбционного анализа.

Дисперсные свойства модельной системы исследованы методами Ребиндера, рефрактометрии, удельной электропроводности, микроскопии.

Катализатор (хлорид меди) и эмульгатор (цетилтриметиламмоний бромид - ЦТМАБ) подобраны экспериментально и соответствуют их максимальной эффективности.

Результаты обрабатывались методом математического моделирования в графическом редакторе Microsoft Excel, для чего подбирались линии тренда и аппроксимирующие функции кинетических кривых, с последующим дифференцированием последних. Полученные дифференциальные кривые позволяют выбрать критерии эффективности и обосновать механизм действия КС меди (II) и ингибиторов.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistic for Windows.

В третьей главе приведены результаты выбора субстрата окисления, подбора оптимального значения рН комплексообразования меди (II) с α -

аминокислотами, исследования дисперсных характеристик модельной системы.

В соответствии с полученными экспериментальными данными, для исследования кинетики окисления компонентов модельных систем раствора КС меди (II) с аланином, валином, треонином, серином, лизином, фенилаланином и гистидином готовились при pH 9,0; КС с лейцином – при pH 5,5.

Экспериментально выявлено, что модельная водно-липидная система представляет собой сочетание мицелл со средним диаметром частиц $(8,8 \pm 1,0) \cdot 10^{-9}$ м и более крупных частиц типа липосом с эквивалентным радиусом частиц $(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$ м.

С учетом известных представлений и экспериментальных данных возможны две схемы расположения компонентов в структуре дисперсных частиц.

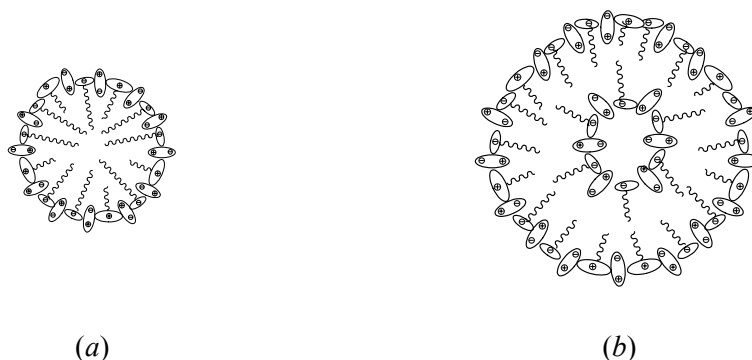


Рис.1 . Схематичное изображение частиц модельной системы:  – поляризованные молекулы липидов;

 - молекулы ЦТМАБ;  – диполи молекул воды

Ядро мицеллы составляют поляризованные молекулы липидов и катионы ЦТМАБ (рис. 1а). Потенциалопределяющий и адсорбционный слои представлены поляризованными молекулами воды, а диффузный слой образуют анионы Br^- и/или Cl^- .

Молекулы воды с растворенными КС меди (II) проникают в структуру ядра мицеллы на семь и более метиленовых групп ЦТМАБ и соприкасаются с окисляемыми центрами углеводородного скелета липидов. Нейтрализация зарядов координационного центра и лигандов при комплексообразовании повышает растворимость комплексов в липидах и способствует их контакту с

окисляемыми центрами. Кислород, растворимый в воде и липидах, проникает в активные центры, вероятно, по диффузионному механизму.

Частицы типа липосом представляют собой двухслойные структуры (рис. 1b). Внутренним полярным слоем в них являются сольubilизированные молекулы липидов. Внешний слой представлен поляризованными молекулами липидов и катионами ЦТМАБ. В соответствии с представленной схемой вода, возможно, располагается в центре образованных частиц.

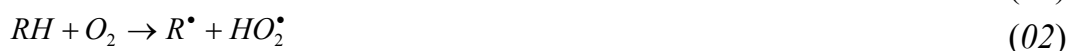
В четвертой главе приведены результаты исследований кинетики окисления компонентов модельной системы в присутствии КС меди (II) с α -аминокислотами и ингибиторов, исследования продуктов окисления и определения концентрации катализатора.

В соответствии с классической схемой окисления углеводов, скорость окисления (W_{O_2}) определяется выражением (1):

$$W_{O_2} = \frac{k_2}{\sqrt{2k_6}} [RH] \sqrt{W_i}, \quad (1)$$

где W_i , - скорость инициирования, моль·л⁻¹·с⁻¹; k_2 , k_6 – константы скорости реакций продолжения и обрыва цепей соответственно, л·моль⁻¹·с⁻¹.

Инициирование цепей:



Продолжение цепей:



Разветвление цепей:



Обрыв цепей:



где M – молекулярные продукты.

Нумерация реакций приводится согласно общепринятой схеме жидкофазного окисления углеводов.

Результаты настоящего исследования позволяют уточнить классическую схему окисления углеводов на стадиях механизма зарождения и разветвления.

Для изучения процессов окисления компонентов модельной системы 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. Окисление осуществляют по следующей методике: к 1 мл липидов добавляют по 1 мл $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л водных растворов ЦТМАБ и КС меди (II) с α -аминокислотами. Пробу доводят водой до 4 мл, термостатируют при температуре $60,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ и насыщают молекулярным кислородом. Волюмометрически, при непрерывном перемешивании, определяют объем поглощенного кислорода во времени.

Полученные кинетические кривые (КК) зависимости $[O_2] = f(t)$ имеют автоускоренный характер (рис. 2).

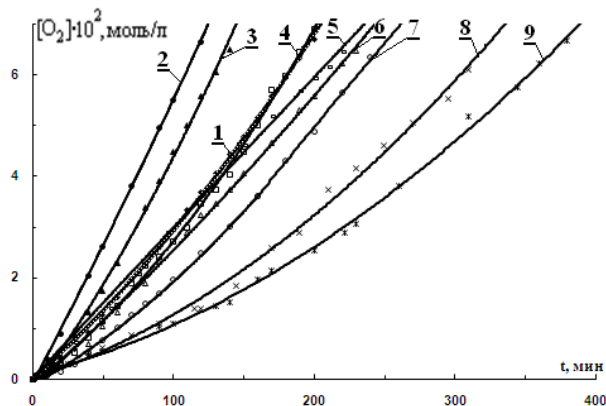


Рис. 2. Кинетика окисления компонентов модельной системы в присутствии координационных соединений меди (II) и α -аминокислот: (1) контроль, (2) аланин, (3) валин, (4) лизин, (5) треонин, (6) серин, (7) гистидин, (8) лейцин, (9) фенилаланин

Количественные параметры кинетики окисления компонентов модельной системы в присутствии КС меди (II) представлены в таблице 1. Все КК с дисперсией 0,99 описываются параболами.

Различия во влиянии природы α -аминокислоты на начальную скорость ($W_{нач}$) процесса свидетельствуют об участии КС в реакциях зарождения цепей по реакциям (03) и (04):

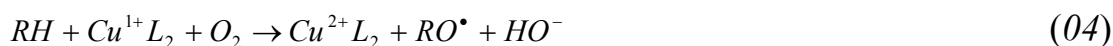



Таблица 1

Количественные параметры кинетики окисления компонентов модельной системы в присутствии комплексов меди (II) с α -аминокислотами

Аминокислоты	Формула радикала	$W_{нач} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$W_{макс} \cdot 10^6$, 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	-CH ₃	5,0±0,3	9,5±0,1	15,0±0,3	$5 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 4 \cdot 10^{-2} \cdot x$
валин	-CH(CH ₃) ₂	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	-(CH ₂) ₄ NH ₂	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	-CH(CH ₃)OH	3,0±0,3	5,9±0,2	10,0±0,3	$3 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
серин	-CH ₂ OH	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	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	2,0±0,4	4,9±0,4	3,1±0,5	$4 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 6 \cdot 10^{-3} \cdot x$
фенилаланин	-CH ₂ C ₆ H ₅	1,4±0,2	4,0±0,4	3,0±0,3	$2 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 7 \cdot 10^{-3} \cdot x$

Исходя из структуры хелатов и механизма комплексообразования, согласно которому положительный заряд координационного центра распределяется между двумя бидентатными лигандами, изменения активности КС в реакциях зарождения цепей можно связать с донорно-акцепторными свойствами заместителей в молекулах аминокислот и стерическими факторами.

Изменение величины ускорения (a) в зависимости от природы лигандов, очевидно, связано с участием КС в реакции разветвления цепей (3.3).



Эффективность этого влияния может быть объяснена указанным выше изменением донорно-акцепторной активности заместителей в молекулах аминокислот и соответствующим снижением (при высокой донорной активности) или увеличением (при акцепторной активности) энергии активации реакции (3.3).

Уменьшение $W_{нач}$ процесса окисления в присутствии серина гистидина, в качестве лигандов, может быть связано с усложнением типа координации

за счет *-ОН* группы или *-N* гетероцикла. Это в целом увеличивает жесткость структуры и уменьшает подвижность КС, экранирует координационный центр и, таким образом, влияет на энергию активации указанных реакций.

Исключение составляет КС с лейцином. Вероятно, протонирование лиганда в кислой среде снижает каталитическую активность хлорида меди (II).

Классическая теория цепных разветвленных процессов рассматривает параболический характер КК, как доказательство мономолекулярного характера разветвления и бимолекулярного механизма обрыва цепей. Поэтому параболический характер КК, установленный в нашем исследовании, подтверждает предполагаемый нами мономолекулярный механизм распада гидропероксидов.

По результатам проведенных исследований в качестве катализатора окисления компонентов модельной системы предложено КС меди (II) с α -аланином, приготовленном в боратном буферном растворе с $\text{pH} = 9$.

По данным хромато-масс-спектрометрии установлено в составе модельной системы присутствие двух важнейших компонентов, которые определяют механизм окисления. К ним относятся этилолеат (80 %) и этиллинолеат (9 %). Спектроскопическое исследование каталитического окисления липидного компонента позволило выявить не только продукты его окисления, но предположить общую схему радикально-цепного процесса.

В УФ-спектрах окисленной пробы, появляется полоса с максимумом ($\lambda_{\text{макс}}$) при 202–204 нм (первая полоса) и широкая менее интенсивная полоса с $\lambda_{\text{макс}}$ при 230 нм (вторая полоса). Первая полоса была отнесена к поглощению первичных продуктов (алкенил-гидропероксидов), вторая - к поглощению вторичных продуктов (α , β -ненасыщенных карбонильных соединений).

На рис.3 приведены зависимости изменения интенсивностей первой и второй полос во времени при различных температурах окисления. Показано, что оптическая плотность меняется экстремально, достигая максимального значения через 120 мин. (24°C), 15 мин. (37°C) и 5 мин. (60°C) после начала

эксперимента. В течение следующего часа окисления оптическая плотность остается величиной постоянной.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что при каталитическом окислении происходит параллельное образование и распад первичных и вторичных продуктов окисления липидов. Эти результаты согласуются с известными литературными данными о том, что катионы резко ускоряют распад гидропероксидов и окисление альдегидов.

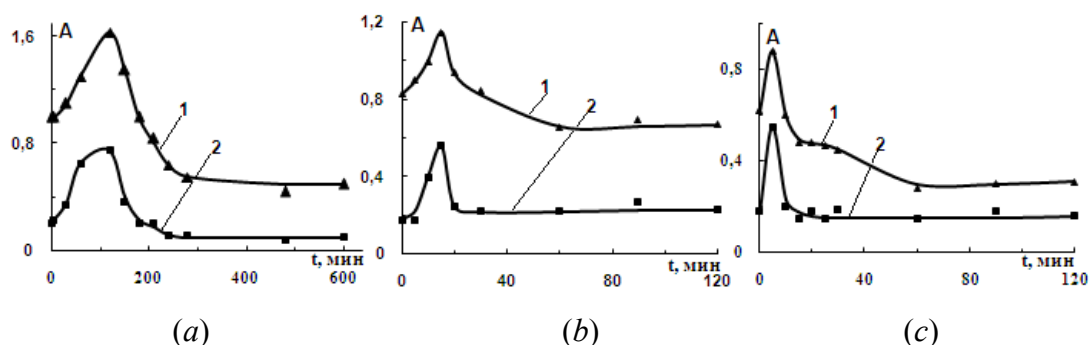


Рис. 3. Зависимость интенсивностей (1) первой и (2) второй полос окисленной пробы при (a) 24, (b) 37, (c) 60°C от времени; концентрация липидного субстрата (a) $4,5 \cdot 10^{-4}$; (b) $3,0 \cdot 10^{-4}$; (c) $1,2 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Для сравнения скоростей процесса образования и распада первичных и вторичных продуктов окисления, в зависимости от температуры, строились зависимости $\lg \tau = f(1/T)$. Результаты измерений приведены на рис. 4.

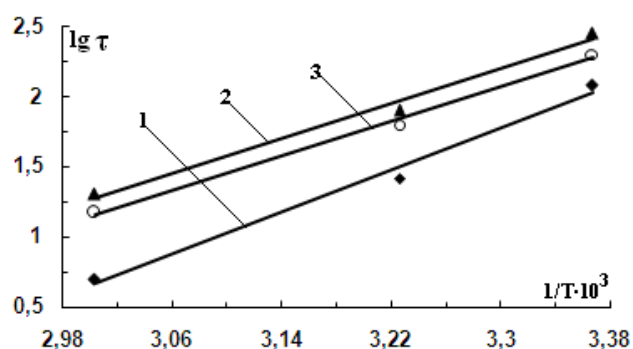


Рис. 4. Зависимость скоростей образования (1) и распада первичных (2) и вторичных (3) продуктов окисления от температуры

В качестве характеристики скорости процесса образования первичных и вторичных продуктов окисления использовалось время (τ), за которое первая и вторая полосы поглощения достигали максимального значения оптической плотности. Для характеристики скоростей процесса распада использо-

валось время (τ_2), за которое первая и вторая полосы поглощения достигали постоянной оптической плотности.

По углу наклона определили энергию активации (E_A). Получены значения энергии активации образования первичных, вторичных продуктов, равные (71 ± 1) кДж/моль и значения энергии активации распада первичных и вторичных продуктов, равные (58 ± 1) кДж/моль.

Снижение E_A при распаде продуктов объясняет экстремальный характер зависимостей $\lambda_{\text{макс}}$ оптической плотности во времени при всех температурах окисления. В настоящем эксперименте получены более низкие значения E_A по сравнению с известными в литературе значениями E_A образования и распада продуктов некаталитического окисления липидных систем, равными 120 кДж/моль.

Для водной фазы наблюдается поглощение в виде широкой полосы в области 550–750 нм с $\lambda_{\text{макс}}$ при 620 нм, соответствующее поглощению КС меди (II) с α -аланином. Из рис. 5 следует, что уже в первые 5–10 мин. интенсивность поглощения этой полосы резко уменьшается, при этом исходная концентрация Cu^{2+} уменьшается \sim на 33–39%. В течение всего последующего процесса окисления устанавливается постоянная интенсивность указанной полосы.

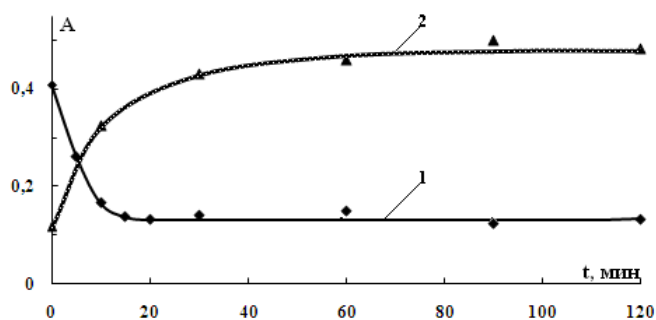


Рис. 5. Изменения интенсивности полос при 620 (1) и 670 (2) нм во времени

Экстракты органической фазы имеют широкую полосу поглощения в области 600–800 нм с $\lambda_{\text{макс}}$ при 670 нм. В соответствии с литературными данными эта полоса может быть отнесена к поглощению соединений меди (I). В процессе окисления интенсивность полосы с $\lambda_{\text{макс}}$ при 670 нм возрастает в те-

чение 10–30 мин. ~ в 2–2,5 раза и затем устанавливается постоянная концентрация соединений катионов меди (рис. 5).

По данным атомно-абсорбционной спектроскопии в процессе окисления концентрация меди в водной фазе уменьшается, а в органической, напротив, увеличивается (табл. 2).

Таблица 2

Изменение содержания меди в пробе в процессе окисления компонентов модельной системы

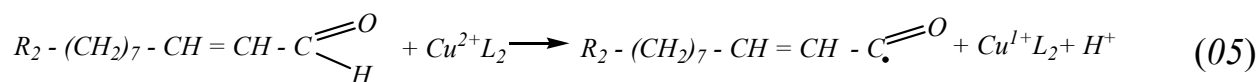
Время окисления, мин.	Концентрация меди в фазах пробы:			
	водная		органическая	
	мг/л	%	мг/л	%
0	99,72±0,16	78,5	27,28±1,15	21,5
10	92,26±0,15	72,6	34,74±1,50	27,4
30	87,66±0,02	69,0	39,34±1,15	31,0
150	86,40±0,15	68,0	40,60±1,50	32,0

С течением времени устанавливается постоянная концентрация меди в органической и водной фазах, что подтверждает результаты описанного выше эксперимента.

Таким образом, с учетом идентификации комплексов катионов меди (I) в органической фазе, предложен механизм их образования по реакциям (03) и (3.3) и превращение по реакции (04) и (3.4):



С учетом совпадения по времени кинетики образования первичных и вторичных продуктов окисления можно предположить участие КС меди (I) и (II) не только в распаде первичных гидропероксидов, но и в окислении вторичных продуктов, например α,β -ненасыщенных карбонильных соединений (реакция 05):



Метод ингибиторов является базовым при исследовании цепных процессов. По эффекту торможения в присутствии сильного ингибитора фиксируют наличие цепного процесса. Классическая схема ингибированного окисления углеводов приведена ниже.



$$W_{O_2} = k_2 [RH]^{W_i} / f k_7 [InH] \quad (2)$$

где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, k_7 – константа скорости обрыва цепей на ингибиторе, л·моль⁻¹·с⁻¹, $[InH]$ – концентрация ингибитора, моль/л;

Результаты настоящего исследования позволяют уточнить классическую схему окисления углеводородов на стадиях механизма обрыва цепей с помощью антиоксидантов.

На рис. 6 показаны КК окисления компонентов модельной системы, катализируемой КС меди (II) с α -аланином в присутствии ионола.

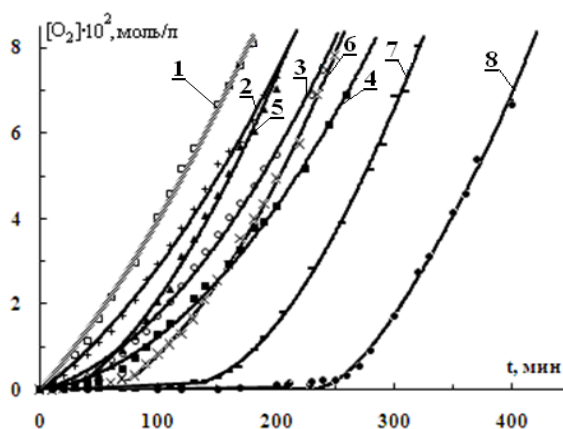


Рис. 6. Кинетические кривые окисления компонентов модельной системы в присутствии ионола: (1) контроль, (2) $5 \cdot 10^{-5}$, (3) $8 \cdot 10^{-5}$, (4) $1 \cdot 10^{-4}$, (5) $2 \cdot 10^{-4}$, (6) $4 \cdot 10^{-4}$, (7) $6 \cdot 10^{-4}$, (8) $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л

КК модельной системы в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л ионола с хорошей дисперсией описываются параболами. Остальные КК аппроксимированы двумя функциями: прямой на начальных участках и параболами на остальных участках. Количественные параметры кинетики окисления модельной системы в присутствии ионола представлены в табл. 3.

Из данных табл. 3 и рис. 6 следует, что характер КК меняется при концентрации ионола $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. При концентрации добавок ионола выше

$1 \cdot 10^{-4}$ моль/л КК имеют периоды полного торможения, периоды аутоускорения и выходы на максимальную скорость. Такой характер КК, согласно методу ингибиторов, соответствует участию сильного ингибитора только в реакциях обрыва цепей и выходу из периода индукции после полного израсходования ингибитора.

Таблица 3

Количественные параметры кинетики окисления компонентов
модельной системы в присутствии ионола

$C \cdot 10^4$ ионола, моль/л	InH:Cu ²⁺	$W_{нач} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$W_{макс} \cdot 10^6$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$a \cdot 10^8$ моль·л ⁻¹ ·с ⁻²	Уравнение параболы $f(x)$
контроль	-	2,7±0,2	8,2±0,1	3,0±0,6	$7 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 3 \cdot 10^{-2} \cdot x$
0,5	1:40	1,3±0,4	7,3±0,2	3,0±0,8	$7 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-2} \cdot x$
0,8	1:25	0,8±0,2	6,3±0,4	3,6±0,2	$1 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 5 \cdot 10^{-3} \cdot x$
1	1:20	0,7±0,2	5,0±0,4	3,4±0,1	$9 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 2 \cdot 10^{-3} \cdot x$
2	1:10	0,6±0,1	8,2±0,2	3,8±0,1	$1 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 1 \cdot 10^{-2} \cdot x - 0,5$
4	1:5	0,5±0,1	8,1±0,8	7,6±0,2	$2 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 - 1 \cdot 10^{-2} \cdot x + 0,1$
6	1:3,3	0,3±0,4	8,1±0,4	7,6±0,4	$2 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 - 3 \cdot 10^{-2} \cdot x + 1,7$
8	1:2,5	0,3±0,1	8,2±0,3	7,6±0,4	$2 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 - 8 \cdot 10^{-2} + 8,0$

Для уточнения механизма действия ионола построены зависимости периода индукции (рис. 7а) и начальных скоростей окисления (рис. 7б) от концентрации ингибитора.

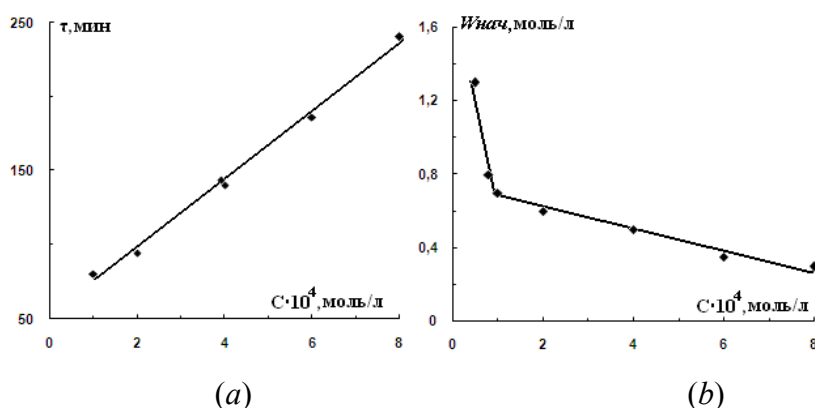


Рис.7. График зависимости (а) периода индукции τ и (б) начальной скорости $W_{нач}$ от концентрации ионола при окислении модельной системы

Из рис. 7а виден линейный характер зависимости, свидетельствующий об участии ингибитора только в реакциях обрыва цепей. На рис. 7б показан сложный характер этой зависимости, а именно, наличие точки перегиба двух прямых, соответствующей концентрации ионола, равной $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Таким

образом, с помощью трех подходов по кинетическим кривым окисления модельной системы в присутствии ионола установлен интервал концентраций, при которых последний действует как сильный ингибитор. Изменение механизма происходит при концентрации ионола $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что соответствует соотношению 1 : 20.

Максимальные скорости окисления ($W_{\text{макс}}$) (табл. 3) в этих условиях также ниже контрольных и снижаются пропорционально концентрации ионола. Ускорение практически не зависит от присутствия ионола и соответствует величине ускорения в контрольной пробе. Совместно эти факторы могут быть объяснены снижением эффективности катализатора под влиянием ионола. Например, тем, что $\text{Cu}^{2+}L_2$ восстанавливается в $\text{Cu}^{1+}L_2$, а последний продукт является менее эффективным катализатором и не участвует в разветвлении цепей. Тогда снижение $W_{\text{макс}}$ окисления может быть обусловлено участием продуктов окисления ионола в реакциях обрыва цепей.

Также представлены результаты исследования модельной системы в присутствии α -токоферола, как наиболее изученного и эффективного из биоантиоксидантов. Исследованы добавки α -токоферола в концентрации $(0,001-6) \cdot 10^{-4}$ моль/л.

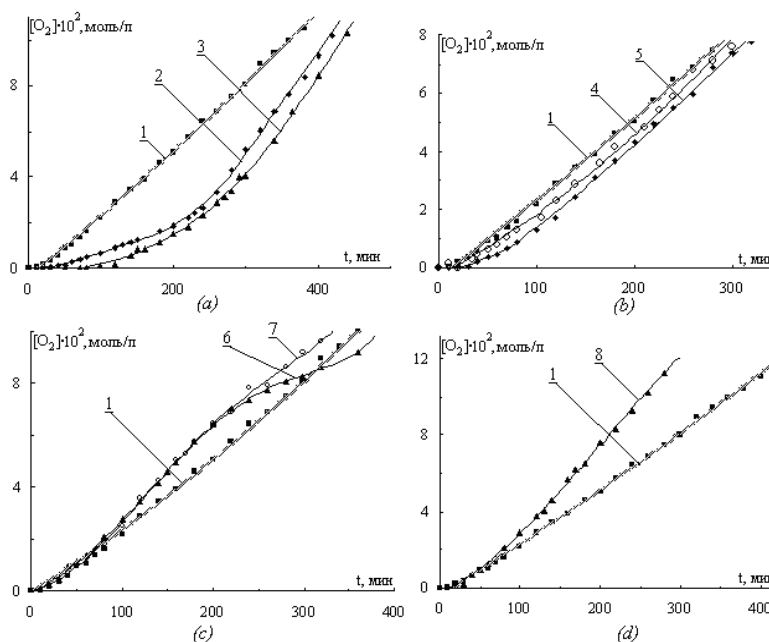


Рис. 8. Кинетические кривые окисления модельной системы в присутствии α -токоферола: (1) контроль; (2) $2 \cdot 10^{-4}$; (3) $6 \cdot 10^{-4}$; (4) $5 \cdot 10^{-5}$; (5) $1 \cdot 10^{-4}$; (6) $4 \cdot 10^{-5}$; (7) $7 \cdot 10^{-7}$; (8) $1,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л

В зависимости от соотношения концентраций α -токоферола и катионов меди (II), в составе комплексов, меняется характер КК. Качественно можно выделить четыре типа кинетических кривых (рис. 8).

При небольшом избытке катализатора (рис. 8a), вероятно, α -токоферол эффективно обрывает цепи по реакции (7), а радикалы ингибитора участвуют в продолжении цепей по реакции (10). Конкуренция этих реакций приводит к наличию периода индукции, удлинению периода ускорения и выходу на максимальную скорость, превышающую контрольную.

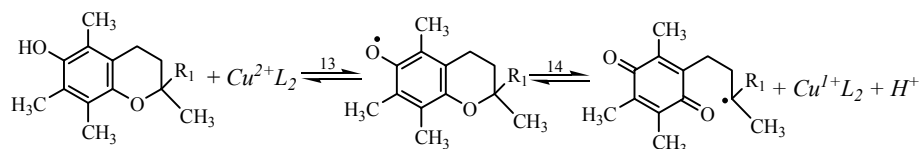
Увеличение избытка катализатора (рис. 8b) приводит к преобладанию реакций зарождения над обрывом цепей, в том числе, благодаря участию α -токоферола с КС меди (II):



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

При большом избытке катализатора (рис. 8c) процесс начинается с высокой скоростью, близкой к максимальной, достигается максимальная скорость, а далее следует замедление процесса, усиливающееся во времени. В присутствии микродобавок α -токоферола (рис. 8d) увеличивается ускорение и конечная скорость процесса по сравнению с контрольной пробой.

Очевидно, что в этих условиях, преобладают процессы окисления α -токоферола по реакциям (11) и (13), образование токоферилрадикала по реакции (13) и токоферилхинон-радикала по реакции (14):



Токоферилхинон-радикал может обрывать цепи, а также участвовать в окислительно-восстановительных превращениях по реакциям (13 \leftrightarrow 14).

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

Сравнение эффективности торможения при одинаковых концентрациях ионола и α -токоферола показывает, что несмотря на более низкое значение константы обрыва цепей (k_7) в углеводородах (\sim в 100 раз) у ионола, под его влиянием, периоды полного торможения и, следовательно, его эффективность всегда выше. Все эти факты позволяют констатировать другой механизм действия α -токоферола в гетерогенной среде, зависящий от соотношения концентраций микроэлементов и биоантиоксиданта.

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 -токоферола и даже промотирование процесса по сравнению с ионолом, вероятно, обусловлено, прежде всего, его участием в реакциях продолжения цепей (реакция 10). Поскольку аутоускорение связано с квадратичным механизмом разветвления, а в присутствии α -токоферола оно значительно замедляется, то, возможно, это также связано с участием ингибитора в бимолекулярном распаде гидропероксидов (реакция 11).

Представленные результаты с очевидностью свидетельствуют о разных механизмах влияния α -токоферола на процесс окисления модельной системы в зависимости от его концентрации. В терминах состава биомембран этот механизм определяется соотношением концентраций КС и биоантиоксидантов.

ВЫВОДЫ

1. Предложена водно-липидная система для моделирования процессов свободнорадикального каталитического окисления липидов биомембран и тестирования антиоксидантов. В состав системы входит смесь эфиров высших ненасыщенных жирных кислот (липидов) и воды в соотношении 1:3 (v/v), с добавками $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л цетилтриметиламмония бромида в

- качестве эмульгатора и комплексов $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л меди (II) 2-5-кратным избытком α -аланина в качестве катализатора при оптимальном для комплексообразования pH (8-10).
- По результатам исследования дисперсных свойств модельной системы обнаружено 2 типа частиц со средним диаметром $(8,8 \pm 1) \cdot 10^{-9}$ м и эквивалентным радиусом $(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$ м. Предложены две схемы структуры дисперсных частиц в виде мицелл и липосом. Сделаны предположения о локализации компонентов в процессе окисления.
 - В процессе окисления липидов модельной системы обнаружены различия кинетической активности координационных соединений меди (II) с α -аминокислотами в зависимости от структуры последних. Показана высокая каталитическая активность комплексов меди (II) с α -аланином и высокая ингибирующая активность комплексов меди (II) с фенилаланином. Установлено увеличение кинетической активности комплексов меди (II) с α -аминокислотами в ряду:
фенилаланин < лейцин < гистидин < серин < треонин < лизин < валин < аланин;
Последовательность аминокислот в ряду объясняется электронными и структурными факторами.
 - По кинетическим кривым окисления, спектроскопическим исследованиям изменений концентраций продуктов окисления и меди (I и II) в липидной и водной фазах во времени предложен механизм каталитического окисления компонентов в модельной системе. Показано участие комплексов меди (I и II) в реакциях зарождения и продолжения цепей, возможное участие в окислении вторичных продуктов и каталитическом окислении 2,6-дитретбутил-4-метилфенола (ионола).
 - Методом ингибиторов доказан радикально-цепной механизм окисления липидных компонентов в модельной системе. Показано, что в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и выше, ионол участвует как сильный ингибитор только в реакциях обрыва цепей. Определена скорость инициирования и рассчитана длина цепей, равная 95 ± 5 .

6. По кинетическим параметрам установлен сложный механизм действия важнейшего биоантиоксиданта α -токоферола и изменение механизма в зависимости от его концентрации. Показано, что во всем интервале исследуемых концентраций (10^{-4} - 10^{-7}) моль/л, α -токоферол менее эффективно ингибирует окисление липидов, по сравнению с ионолом. Установлены 4 различных типа кинетических кривых окисления компонентов модельной системы в зависимости от концентраций α -токоферола, соответствующих торможению, отсутствию эффекта торможения, S-образному характеру кинетических кривых и ускорению окисления. Характер кинетических кривых объяснен участием α -токоферола в конкурирующих реакциях обрыва, продолжения цепей, его окисления до токоферилхинона, участия последнего в разветвлении цепей.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

в изданиях, рекомендованных ВАК

- 1) Крайник В.В. Моделирование процессов окисления липидов биомембран / В.В. Крайник, Л.А. Журавлева, В.Н. Ушкалова // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2008. – № 5. – С. 31–38.
- 2) Крайник В.В. Спектроскопическое исследование процессов окисления в присутствии комплексов меди / В.В. Крайник, В.Н. Ушкалова, В.Г. Катанаева // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – № 6. – С. 101–105.
- 3) Крайник В.В. Исследование механизма каталитического окисления водно-липидного субстрата / В.В. Крайник, В.Н. Ушкалова // Журнал физической химии. – 2010. – Т. 84. – № 5. – С. 998–1000.

в других изданиях

- 4) Крайник В.В. Антиоксидантная активность координационных соединений меди и α -аминокислот / В.В. Крайник, Г.А. Наурусова // Ломоносов–2007: Материалы XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам. М.: изд-во МГУ, – 2007 –С. 457.
- 5) Крайник В.В. Разработка методов биоадекватного тестирования средств антиоксидантотерапии / В.В. Крайник, Л.А. Журавлева, В.Н. Ушкалова // Химия и медицина: Тезисы докладов VI Всероссийского научного семинара с Молодежной научной школой. – Уфа: Гилем, –2007. – С. 63–64.

- 6) Крайник В.В. Кинетика каталитического окисления водно-липидных систем / В.В. Крайник, Л.А. Журавлева, Г.А. Усманова, В.Н. Ушкалова // Успехи современного естествознания. Тезисы докладов III научной международной конференции «Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 5. – С. 115–116.
- 7) Крайник В.В. Тестирование антиоксидантов в водно-эмульсионной среде / В.В. Крайник, Г.А. Усманова // Ломоносов–2008: Материалы XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам. М.: изд-во МГУ, – 2008. – С. 628.
- 8) Журавлева Л.А. Кинетические подходы к проблеме тестирования антиоксидантов. С. 2 Водно-липидная модель / Л.А. Журавлева, В.В. Крайник, В.Н. Ушкалова // Современные проблемы науки и образования. М.: Академия естествознания. – 2008. – №3. – С. 154–162.
- 9) Крайник В.В. Кинетика окисления этилолеата в присутствии координационных соединений меди с аминокислотами // Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты: Всероссийская конференция молодых ученых и III школа им. академика Н.М. Эммануэля: Доклады и тезисы. М.: РУДН, – 2008. – С. 200–201.
- 10) Журавлева Л.А. Поиск средств антиоксидантотерапии кинетическими методами / Л.А. Журавлева, В.В. Крайник, Г.А. Усманова, В.Н. Ушкалова // European academy of natural history. – №4. – 2008. – С. 58–60.
- 11) Журавлева Л.А. Оценка антиоксидантной активности некоторых лекарственных препаратов кинетическим методом. / Л.А. Журавлева, В.В. Крайник // Наука и инновации XXI века: Материалы IX Открытой окружной конференции молодых ученых. Изд-во СурГУ, – 2009. – С. 101–104.
- 12) Журавлева Л.А. Разработка и оценка эффективности кинетического способа тестирования водорастворимых антиоксидантов / Л.А. Журавлева, В.В. Крайник // 1^{ая} Международная научно-практическая конференция «Наука и бизнес: пути развития» Science and business: development ways. Тезисы докладов. Тамбов: ТАМБОВПРИНТ, – 2009. – С. 191–196.
- 13) Крайник В.В. Спектроскопическое исследование каталитического окисления водно-липидного субстрата / В.В. Крайник, В.Н. Ушкалова // Всероссийская научная конференция «Химическая кинетика окислительных процессов. Окисление и антиокислительная стабилизация». XII Всероссийская научная конференция по химии органических и элементоорганических пероксидов «Пероксиды-2009». Тезисы докладов. Уфа: изд-во БГУ, – 2009. – С. 96–98.