



УДК 547.814:577.161

© 1992 г. В. В. Чудинова, Е. Н. Захарова, С. М. Алексеев,
Р. П. Евстигнеева**К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНА Е. ИЗУЧЕНИЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНА Е (α -ТОКОФЕРОЛА)
И ЕГО АНАЛОГОВ С ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ И ИХ
ПРОИЗВОДНЫМИ МЕТОДОМ ФЛУОРИМЕТРИИ***Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

На основании экспериментальных данных по тушению флуоресценции витамина Е (α -токоферола) и его аналогов жирными кислотами и их производными (этиловыми эфирами и гидропероксидами) в различных растворителях сделано предположение о существовании комплекса между α -токоферолом или его аналогами в возбужденном состоянии и жирными кислотами, а также их гидропероксидами. Обсужден возможный механизм образования и природа комплекса, а также его участие в процессе перекисного окисления жирных кислот.

Витамин Е (α -токоферол) — многофункциональный компонент биологических мембран. Одна из важнейших сторон проявления его действия — поддержание структурно-функциональной целостности мембраны при воздействии на нее различных экзо- и эндогенных дестабилизирующих факторов. Кроме того, α -токоферол ингибирует развитие цепи перекисного окисления липидов [1] и связывает свободные жирные кислоты [2], оказывающие хаотропное действие на структуру бислоя и являющиеся субстратами окислительных ферментативных систем. В то же время известно, что α -токоферол стабилизирует первичные продукты окисления липидов, предотвращая их гомолитическое расщепление [3], хотя механизм такой стабилизации до сих пор неясен.

В задачу настоящей работы входило изучение взаимодействия α -токоферола со свободными жирными кислотами и продуктами их первичного окисления. С этой целью была проведена серия экспериментов по исследованию взаимодействия α -токоферола с линолевой кислотой (LnOH) и ее производными — этиллинолеатом (LnOEt), гидропероксидом линолевой кислоты (LnOH-OOH) и гидропероксидом этиллинолеата (LnOEt-OOH) в растворителях с различной полярностью и вязкостью, а именно в ацетонитриле, гексане и пнане. В данной работе использовали сумму изомеров гидропероксидов, образующихся при автоокислении линолевой кислоты. Для изучения взаимодействия был выбран метод регистрации интенсивности флуоресценции α -токоферола при 325 нм, возбужденного светом с длиной волны 300 нм (см. «Экспериментальную часть»).

При добавлении линолевой кислоты или ее производных (этиллинолеата, гидропероксида линолевой кислоты и его этилового эфира) к раствору α -токоферола в ацетонитриле происходило снижение интенсивности флуоресценции последнего, причем зависимость величины отно-

Сокращения: α ТОН — α -токоферол, LnOH — линолевая кислота.

сительного тушения от концентрации исследуемых веществ в координатах Штерна — Фольмера имела прямолинейный характер (рис. 1). Эффект тушения в этом случае был наиболее ярко выражен для гидропероксида линолевой кислоты.

В экспериментах с линолевой кислотой было показано, что величина относительного тушения не зависит от вязкости раствора (гексан, нонан), но на нее сильно влияет полярность среды (гексан, ацетонитрил) (рис. 2). Полученные результаты по увеличению степени тушения флуоресценции при наличии в молекуле гидропероксильной группы (рис. 1) и отсутствие изменений указанной величины при использовании растворов с различной вязкостью (вязкость нонана в 2,3 раза выше вязкости гексана [4]) (рис. 2) позволили сделать предположение о статическом характере тушения флуоресценции α -токоферола жирными кислотами и их производными и, следовательно, о возможности образования ими комплексов в гомогенных растворах.

Известно, что α -токоферол — наиболее эффективный природный антиоксидант, локализованный непосредственно в биологической мембране и ингибирующий процесс перекисного окисления [5]. Перекисное окисление, как известно, — цепной радикальный процесс, инициируемый отрывом атома водорода от метиленовых групп, разделяющих олефиновые связи в молекуле жирной кислоты. На стадии развития цепной реакции образовавшийся алкильный радикал (R^{\cdot}) быстро взаимодействует с молекулой кислорода, образуя пероксильный радикал (ROO^{\cdot}) (уравнение 1), который, в свою очередь, инициирует появление нового алкильного радикала (R^{\cdot}) (уравнение 2).



Классическая теория антиоксидантного действия α -токоферола предполагает его взаимодействие с гидропероксильным радикалом (ROO^{\cdot}), ингибирующее развитие цепной реакции (уравнение 3). При этом молекула α -токоферола способна отдавать атом водорода фенольной группы хроманового ядра сильному акцептору. В результате образуется гидропероксид жирной кислоты и α -токофероксильный радикал (αTO^{\cdot}), который достаточно резонансно-стабилизирован и поэтому не инициирует цепную реакцию [1].



Полученные нами экспериментальные результаты по тушению флуоресценции α -токоферола жирными кислотами и их производными позволяют предположить, что при взаимодействии молекул возбужденного α -токоферола и жирной кислоты или ее гидропероксида образуется нефлуоресцирующий комплекс — эксиплекс. В пользу этой гипотезы свидетельствует значительное возрастание величины относительного тушения флуоресценции α -токоферола при переходе от неполярного (гексан, нонан) к полярному (ацетонитрил) растворителю (рис. 2) [6]. Однако подобный комплекс существует только в возбужденном состоянии, поскольку как в УФ-спектре, так и в спектре возбуждения α -токоферола при добавлении линолевой кислоты и ее производных не наблюдалось сдвига максимума поглощения, характерного для образования комплекса в основном состоянии (рис. 3) [7].

Рассматривая вероятные механизмы образования такого возбужденного комплекса между молекулами α -токоферола и гидропероксида жирной кислоты, можно предположить, что возбужденная форма α -токоферола легко трансформируется в радикальное состояние [6], переход

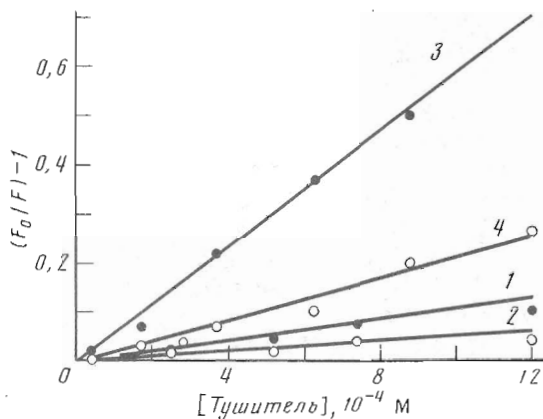


Рис. 1. Концентрационные зависимости тушения флуоресценции α -токоферола линолевой кислотой (1), этиллинолеатом (2), гидропероксидом линолевой кислоты (3) и гидропероксидом этиллинолеата (4) в ацетонитриле

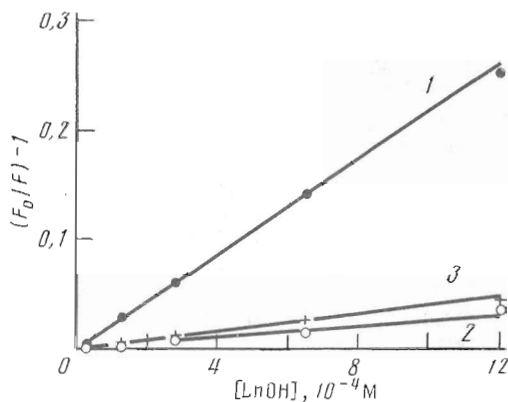
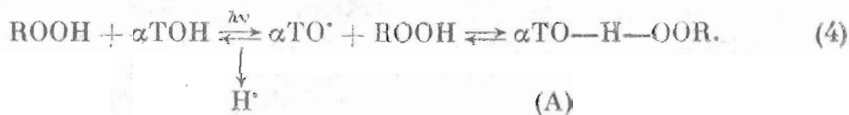


Рис. 2. Тушение флуоресценции α -токоферола линолевой кислотой в ацетонитриле (1), гексане (2) и пнане (3)

в которое, по-видимому, облегчен незначительной разницей их энергетических уровней. В свою очередь, возбужденная радикальная форма α -токоферола способна образовывать с гидропероксидами жирной кислоты переходный стабилизированный комплекс (соединение А в уравнении 4), в котором атом водорода распределен между донорной и акцепторной составляющими (уравнение 4). Образованием такого донорно-акцепторного комплекса и перераспределением в нем энергии можно объяснить наблюдаемое в эксперименте явление тушения флуоресценции α -токоферола гидропероксидами жирной кислоты.



Можно предположить, что переходная форма (А) образуется и в процессе перекисного окисления липидов за счет взаимодействия молекулы α -токоферола с высокоэнергетическим гидропероксильным радикалом (уравнение 5). При этом перераспределение энергии внутри этого

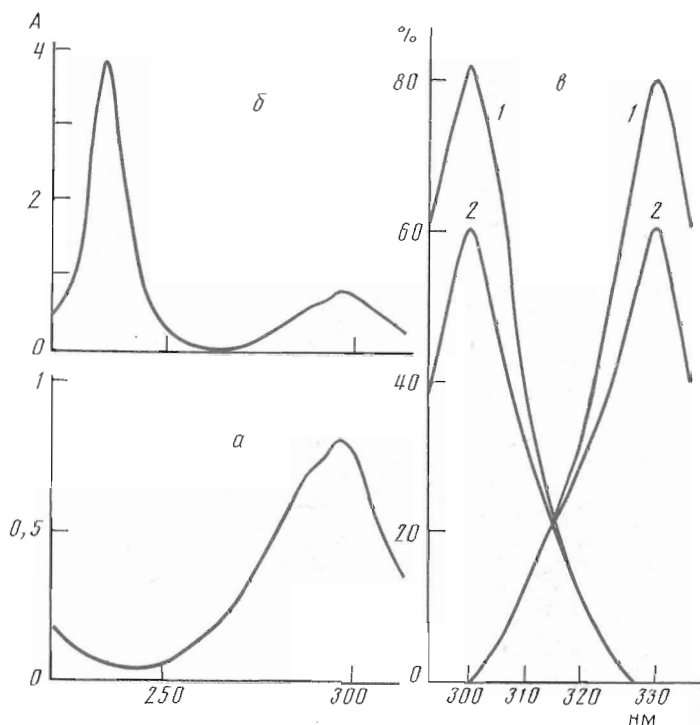
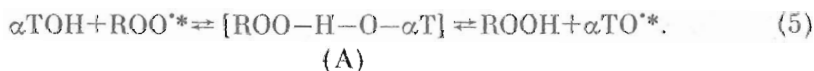


Рис. 3. Спектр поглощения в ацетонитриле α -токоферола (а), смеси α -токоферол-гидропероксид линолевой кислоты (б) и спектра возбуждения и испускания флуоресценции α -токоферола в отсутствие (1) и в присутствии гидропероксида линолевой кислоты (2). $[\alpha\text{ТОН}] 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{LnOH-OON}] 6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

комплекса, вероятно, способствует нейтрализации реакционноспособных свободнорадикальных частиц.



Как было показано выше (см. рис. 1), α -токоферол образует комплекс не только с гидропероксидами, но и со свободными жирными кислотами. При этом эффективность взаимодействия α -токоферола и жирной кислоты резко возрастает с увеличением степени ненасыщенности тушителя (стеариновая < олеиновая < линолевая < арахидоновая < докозагексаеновая кислоты) (рис. 4), что согласуется с результатами работы [2], свидетельствующими о том, что в данном случае значительный вклад в стабилизацию ассоциированной формы вносит образование π -комплекса между хроманоксильным радикалом и олефиновыми связями, с увеличением числа которых значения констант комплексообразования возрастают в экспоненциальной зависимости (рис. 4). Однако эффективность взаимодействия α -токоферола с докозагексаеновой кислотой ($K = 258 \text{ M}^{-1}$ в ацетонитриле) в 2,5 раза, а с линолевой кислотой ($K 119 \text{ M}^{-1}$) в 5 раз ниже эффективности взаимодействия между α -токоферолом и гидропероксидом линолевой кислоты в тех же условиях ($K 667 \text{ M}^{-1}$), что позволяет сделать вывод о высокой селективности взаимодействия гидропероксильной группы с хроманом.

В литературе имеются данные, что витамин Е оказывает значитель-

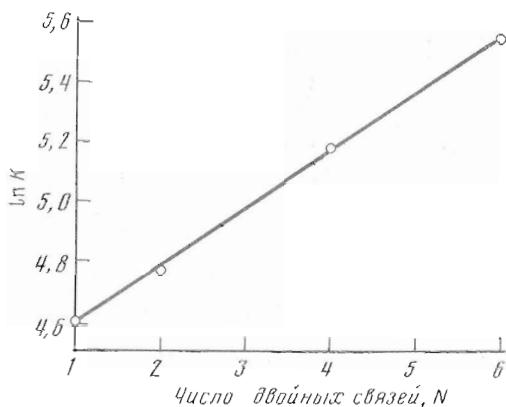


Рис. 4. Зависимость логарифма константы ассоциации комплекса α -токоферол – жирная кислота от степени ненасыщенности последней

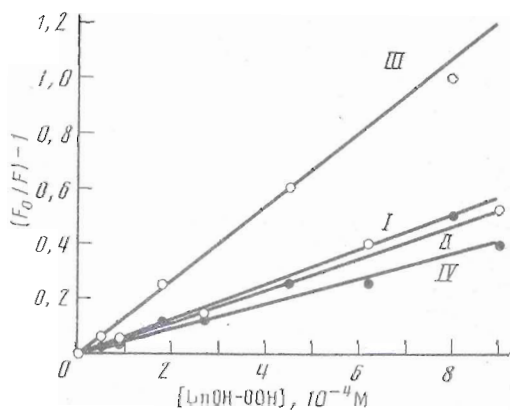
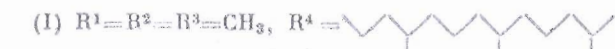
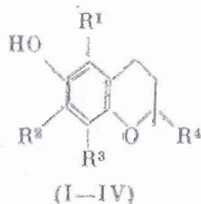


Рис. 5. Зависимость величины относительного тушения флуоресценции аналогов α -токоферола (I)–(IV) от концентрации гидропероксида линолевой кислоты в ацетонитриле

ное мембрано-стабилизирующее действие, в котором важную роль играет изопреноидная часть молекулы [8]. Результаты нашего эксперимента по тушению флуоресценции аналогов α -токоферола (I–IV) гидропероксидом линолевой кислоты (схема) показали, что в гомогенном растворе в отличие от биомембраны длина и разветвленность боковой цепи, а также наличие заместителей в хромановом ядре существенно не влияют на устойчивость комплекса (рис. 5).



Так, относительное тушение флуоресценции α -токоферола (I) и хромана C_1 (II) было практически одинаково (в пределах ошибки опыта). Отсутствие метильных групп в хромановом ядре молекулы токола (III),

где F_0 и F — флуоресценция до и после добавления тушителя, $[Q]$ — концентрация последнего.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Porter N. A. // *Accounts Chem. Res.* 1986. V. 19. № 2. P. 262–268.
2. Erin A. N., Skripin V. V., Kagan V. E. // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. V. 815. № 1. P. 209–214.
3. Frankel E. N., Gardner H. W. // *Lipids.* 1989. V. 24. № 7. P. 603–608.
4. Гордон А., Форд Р. *Спутник химика.* М.: Мир, 1976. С. 19–21.
5. Burton G. W., Ingold K. U. // *Accounts Chem. Res.* 1986. V. 19. № 2. P. 194–201.
6. Барлтроп Дж., Койл Дж. *Возбужденные состояния в органической химии.* М.: Мир, 1978. 446 с.
7. Лакович Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии.* М.: Мир, 1986. С. 270.
8. Ерин А. Н., Каган В. Е., Давыташвили Н. Г. // *Биохимия.* 1987. Т. 52. № 7. С. 1180–1185.
9. Захарова Е. И., Шуаинов К. А.-В., Чудинова В. В., Алексеев С. М., Евстигнеева Р. П. // *Биоорганич. химия.* 1989. Т. 15. № 9. С. 1268–1273.

Поступила в редакцию
4.XII.1991

После доработки
13.V.1992

V. V. CHUDINOVA, E. I. ZAKHAROVA, S. M. ALEKSEEV, R. P. EVSTIGNEEVA

MECHANISM OF THE VITAMIN E ACTIVITY. STUDY OF THE INTERACTION OF VITAMIN E (α -TOCOPHEROL) AND ITS ANALOGUES WITH FATTY ACIDS AND THEIR DERIVATIVES BY THE FLUORESCENCE METHOD

M. V. Lomonosov Moscow Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Formation of a complex between α -tocopherol or its analogues in the excited state and fatty acids or their hydroperoxides has been suggested basing on the fluorescence quenching experimental data. The possible mechanism of the complex formation, its nature and role in the fatty acid peroxidation is discussed.