



УДК 547.814:577.161

© 1993 В. В. Чудинова, Е. И. Захарова,
С. М. Алексеев, Р. П. Евстигнеева

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА Е (α -ТОКОФЕРОЛА) С ОКСИГЕНИРОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Исследованы изменения характеристик спектров возбуждения и испускания флуоресценции α -токоферола и его смесей с оксигенированными производными жирных кислот — гидропероксидом линолевой кислоты, гидроксипинолевой кислотой и рицинолевой кислотой — в зависимости от содержания компонентов в растворе ацетонитрила. Предположено образование α -токоферолом эксимера и эксиплекса с кислородсодержащими производными полиненасыщенных жирных кислот. Обсужден характер взаимодействия между компонентами возбужденных структур и их возможная роль в процессе перекисного окисления липидов.

Известно, что α -токоферол, эффективный природный антиоксидант, являясь ловушкой свободных гидроксильных и гидропероксильных радикалов жирных кислот, ингибирует перекисное окисление липидов, а также сохраняет функциональную и структурную целостность мембраны [1]. По тушению флуоресценции α -токоферола в гомогенных растворах линолевой кислотой и ее гидропероксидами мы установили, что α -токоферол способен образовывать с гидропероксидами жирных кислот комплекс в возбужденном состоянии — эксиплекс [2]. Однако механизм взаимодействия α -токоферола с активными радикалами, образующимися в процессе перекисного окисления липидов, а также строение промежуточного комплекса остались неизвестными. Для ответа на эти вопросы мы исследовали зависимость спектров флуоресценции α -токоферола и его смеси с гидропероксидами линолевой кислоты в ацетонитриле от концентрации компонентов. Кроме того, для выяснения особенностей взаимодействия мы обратили внимание на тушение флуоресценции α -токоферола различными оксигенированными производными жирных кислот — гидропероксидом линолевой кислоты, гидроксипинолевой кислотой и рицинолевой кислотой.

Оказалось, что интенсивность флуоресценции α -токоферола ($\lambda_{исп}$ 325 нм) в значительной степени зависит от его концентрации в растворе. Так, при концентрации выше $5 \cdot 10^{-4}$ М наблюдалось концентрационное тушение (рис. 1), характеризующееся снижением интенсивности испускания при 325 нм. При этом происходил сдвиг максимума в спектре возбуждения в сторону больших длин волн (с 300 нм при концентрации α -токоферола $2 \cdot 10^{-4}$ М до 312 нм при $1 \cdot 10^{-3}$ М) (рис. 2).

Такой красный сдвиг спектра поглощения при увеличении концентрации α -токоферола можно объяснить образованием неполярных (гидрофобных) ассоциатов, поскольку известно, что при уменьшении полярности среды максимум спектра поглощения α -токоферола сдвигается в сторону больших длин волн [3]. Эти результаты соответствуют приведенным в литературе данным о склонности молекул α -токоферола к ассоциации. В частности, в липидных мембранных системах даже при соотношении липид — хроман 1000 : 1 около 25% α -токо-

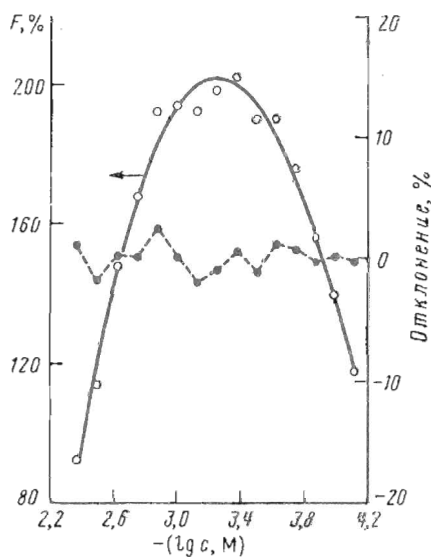


Рис. 1

Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции α -токоферола в зависимости от концентрации флуорофора в ацетонитриле

Рис. 2. Спектры возбуждения (1) и испускания (2) флуоресценции α -токоферола при его концентрации в ацетонитриле $2,4 \cdot 10^{-4}$ (а) и $1 \cdot 10^{-3}$ М (б)

Рис. 3. Спектры возбуждения (сплошные линии) и испускания (штриховые) флуоресценции эксимера α -токоферола при концентрации $2,4 \cdot 10^{-4}$ (1) и $1 \cdot 10^{-3}$ М (2) в ацетонитриле

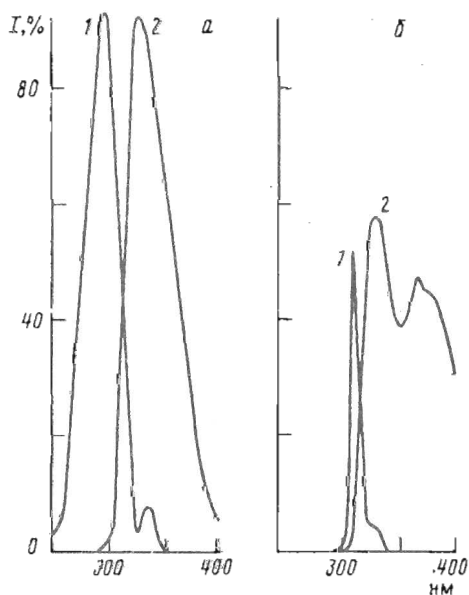


Рис 2

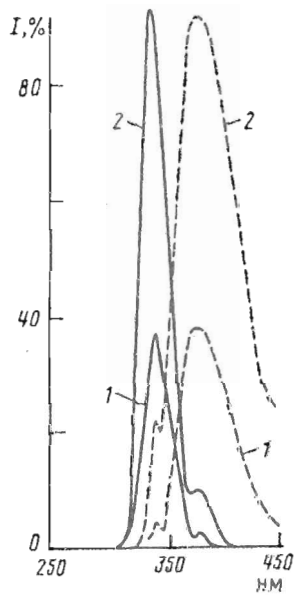
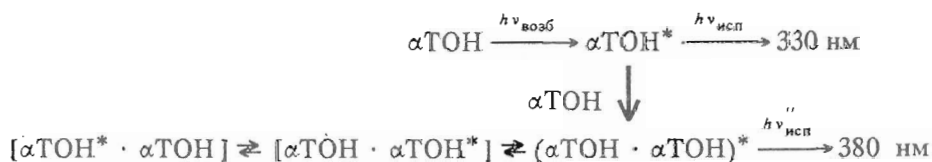


Рис. 3

ферола существует в виде кластеров [4]. Кроме того, во всем диапазоне исследованных концентраций ($5 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ М) α -токоферол образовывал эксимер, обладавший спектральными характеристиками, отличными от характеристик основного (мономерного) состояния, а именно $\lambda_{\text{возб}}$ 345 и $\lambda_{\text{исп}}$ 380 нм, причем интенсивность испускания эксимерной формы возрастала при увеличении концентрации α -токоферола (рис. 3), что соответствует теоретической модели [5].

Известно, что геометрия и электронная структура основного и первого возбужденного состояния молекулы α -токоферола различны [3]. При этом в основном состоянии наибольший вклад в стабилизацию молекулярной структуры вносит сопряжение между неподеленной парой р-электронов атома кислорода фенольного

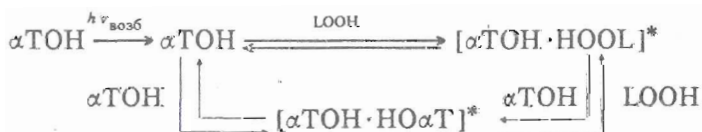
гидроксильной и ароматической системой, в то время как сопряжение гетероциклического атома кислорода с ароматическим ядром мало из-за непланарности молекулы. В первом возбужденном состоянии S_1 молекула хромена становится более планарной и основной вклад в ее стабилизацию вносит уже конъюгация между гетероциклическим и ароматическим ядрами. Поэтому фенольный гидроксил молекулы α -токоферола (α ТОН) в основном состоянии при образовании водородной связи является акцептором водорода, а в первом возбужденном состоянии проявляет ярко выраженные донорные свойства [3]. Можно предположить, что образующийся по приведенной ниже схеме эксимер α -токоферола (α ТОН $\cdot\alpha$ ТОН) * из-за различия донорно-акцепторных свойств возбужденной и невозбужденной компоненты комплекса стабилизирован за счет экситонного резонанса:



Ранее нами было показано, что α -токоферол в ацетонитриле при низкой концентрации ($2 \cdot 10^{-4}$ М) образует комплекс в возбужденном состоянии (эксиплекс) с линолевой кислотой и ее гидропероксидами [2]: при добавлении последних не наблюдалось сдвига максимума поглощения в УФ-спектре α -токоферола, характерного для образования комплекса в основном состоянии. Кроме того, образование эксиплекса согласуется со значительным возрастанием величины относительного тушения флуоресценции α -токоферола жирной кислотой и ее производными при переходе от неполярного (гексан, нонан) к полярному (ацетонитрил) растворителю [2]. Образование такого эксиплекса может быть ключевым моментом в нейтрализации α -токоферолом активных радикальных продуктов, образующихся в процессе перекисного окисления.

Для выяснения механизма взаимодействия α -токоферола и активных радикалов в процессе перекисного окисления липидов исследована зависимость интенсивности флуоресценции α -токоферола (α ТОН) от его концентрации в присутствии различных количеств гидропероксида линолевой кислоты (ЛООН) (рис. 4). Как и следовало ожидать, во всем диапазоне исследованных концентраций α -токоферола ($5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$ М) наблюдалось тушение его флуоресценции гидропероксидом линолевой кислоты, причем с увеличением относительного количества последней в исследуемой смеси (α ТОН — ЛООН 1:0, 1:0,5, 1:1, 1:2) происходило снижение минимальной концентрации самотушения α -токоферола. Кроме того, при добавлении тушителя (при любой исследованной концентрации) интенсивность флуоресценции мономерного состояния ($\lambda_{\text{исп}} 325$ нм) α -токоферола снижалась, а интенсивность испускания эксимера ($\lambda_{\text{исп}} 380$ нм) возрастала (рис. 5).

Можно предположить, что при облучении УФ-светом образование эксиплекса $[\alpha\text{ТОН} \cdot \text{НООЛ}]^*$ между окисгенированной жирной кислотой и α -токоферолом стабилизирует возбужденное состояние хромена и облегчает его ассоциацию в эксимер $[\alpha\text{ТОН} \cdot \text{НО}\alpha\text{T}]^*$, что согласуется с увеличением интенсивности флуоресценции последнего и со снижением минимальной концентрации самотушения мономерной формы.



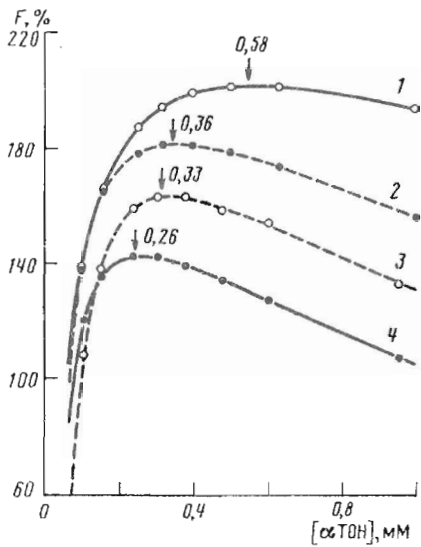


Рис. 4

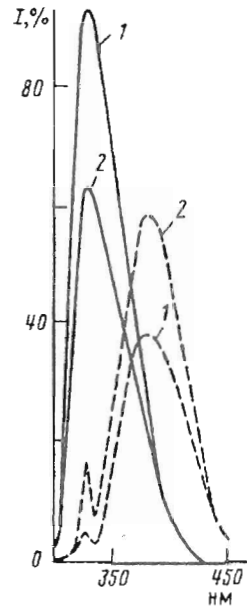


Рис. 5

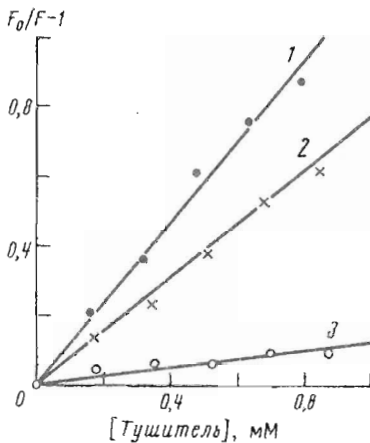


Рис. 6

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции α -токоферола и его смесей с гидропероксидом линолевой кислоты от концентрации компонентов смеси в ацетонитриле. Соотношение α -токоферол — гидропероксид линолевой кислоты: 1 : 0 (1), 1 : 0,5 (2); 1 : 1 (3), 1 : 2 (4). Цифра над стрелкой указывает значение концентрации α -токоферола (мМ), соответствующее максимуму флуоресценции

Рис. 5. Спектры флуоресценции α -токоферола (сплошные линии) ($2,4 \cdot 10^{-4}$ М) и его эксимера (штриховые) в отсутствие (1) и в присутствии (2) гидропероксида линолевой кислоты в концентрации $6 \cdot 10^{-4}$ М

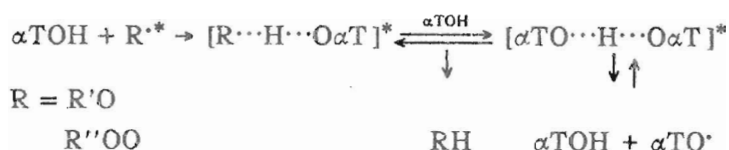
Рис. 6. Зависимость относительного тушения флуоресценции α -токоферола ($2,4 \cdot 10^{-4}$ М) от концентрации гидроксипинолевой кислоты (1), гидропероксида линолевой кислоты (2), рицинолевой кислоты (3)

Чтобы определить особенности взаимодействия между компонентами в образующемся эксиплексе, исследовано тушение флуоресценции α -токоферола в ацетонитриле окисгенированными производными жирных кислот различной структуры — гидропероксидом линолевой кислоты (LOOH), гидроксипинолевой кислотой (LOH) и рицинолевой кислотой (Ric). При добавлении тушителей интенсивность флуоресценции α -токоферола снижалась, а интенсивность испускания эксимера возрастала, причем эффект убывал в ряду LOH > LOOH > Ric (рис. 6).

Полученные данные позволяют предположить, что важную роль в эффективности образования эксиплекса играет степень поляризованности связи пероксильного и алкоксильного радикалов с атомом водорода. Очевидно, что сродство к атому водорода определяется и конъюгацией свободной пары р-электронов атома кислорода с сопряженной диеновой системой. При этом взаимодействие максимально в случае гидроксипинолевой кислоты, несколько меньше у гидро-

пероксида линолевой кислоты из-за отталкивания двух соседних пар р-электронов кислородных атомов и практически отсутствует у рицинолевой кислоты, где двойная связь отделена от гидроксильной группы двумя атомами углерода. Эти результаты подтверждают гипотезу об образовании эксиплекса между α -токоферолом и гидропероксидом жирной кислоты за счет участия полярной группы и диеновой сопряженной системы оксигенированной жирной кислоты.

Можно предположить, что процессы образования эксимера α -токоферола и его эксиплекса с гидропероксидами жирных кислот играют важную роль в механизме антиоксидантного и мембранопротекторного действия витамина Е. При взаимодействии α -токоферола в основном состоянии с высокоэнергетическими липидными радикалами образуется возбужденный донорно-акцепторный комплекс (эксиплекс), внутри которого происходит перераспределение энергии и изменение геометрии молекулы α -токоферола, сопровождающееся увеличением донорных свойств его гидроксильной группы [3]. В результате атом водорода переходит на активный радикал с образованием стабильного продукта. Образующийся при этом эксимер α -токоферола — следующая стадия в цепи последовательного снижения энергии окисляющейся системы — распадается с образованием α -токоферола и стабильного α -токофероксильного радикала:



Таким образом, при перекисном окислении липидов и в других биологических процессах с участием высокоэнергетических компонентов ингибирующая и стабилизирующая роль α -токоферола сводится к способности образовывать специфические молекулярные структуры, в которых происходит последовательное снижение энергии за счет излучательных и безызлучательных переходов. Результатом этого процесса является образование стабильных низкоэнергетических продуктов.

Экспериментальная часть

Спектры флуоресценции были записаны на спектрофлуориметре Shimadzu RF-540, ширина щели монохроматоров возбуждения и эмиссии 5 нм, толщина прямоугольной кюветы 1 см. Для проведения флуориметрических исследований применяли очищенные, дегазированные, сухие растворители и рицинолевую кислоту с содержанием основного вещества 97—98% (по данным ГЖХ).

Препаративную ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженном рефрактометрическим детектором и нормально-фазовой колонкой Силасорб 300 (10 × 250 мм, 5 мкм).

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Чехо-Словакия) в системе гексан — эфир — уксусная кислота (8 : 7 : 0,1), оксигенированные производные жирных кислот проявляли специфическим ванилиновым проявителем.

α -Токоферол был синтезирован по методу [6].

Суммарные гидропероксиды линолевой кислоты (9-гидроперокси-10,12- и 12-гидроперокси-9,11-октадекадиеновые кислоты) выделяли из смеси продуктов жидкофазного автоокисления линолевой кислоты (50° С, в темноте, при постоянной скорости барботирования воздуха) [6, 7]. Продукт очищали методом нормально-фазовой ВЭЖХ, элюируя системой гексан — этилацетат — уксусная кислота (75 : 25 : 0,3) со скоростью 5 мл/мин. Гидропероксиды обнаруживали ТСХ (R_f 0,45) при проявлении раствором иодида калия (коричневое окрашивание) либо

ванилиновым проявителем (сине-черное окрашивание). УФ-спектр: λ_{max} (ϵ) 234 нм (24 000).

Гидроксилинолевая кислота. К раствору 16 мг ($5,12 \cdot 10^{-5}$ моль) гидропероксида линолевой кислоты в 5 мл смеси метанол — вода (5 : 1) при перемешивании прибавляли 2 мг ($5 \cdot 10^{-5}$ моль) гидроксида натрия (рН 9) и 9,5 мг ($2,5 \cdot 10^{-4}$ моль) боргидрида натрия. Смесь перемешивали 10 мин при температуре 18—20° С. Избыток боргидрида натрия нейтрализовали 5 мл 0,05 М раствора HCl (рН 2—3), продукт экстрагировали эфиром (3×15 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, растворитель упаривали. Получали 14,3 мг (94,3%) гидроксилинолевой кислоты в виде масла желтоватого оттенка. Продукт восстановления проявляли ТСХ (R_f 0,40) ванилиновым проявителем (серо-голубое окрашивание). УФ-спектр: λ_{max} (ϵ) 234 нм (26 000). ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3300, 2900, 1750, 1680, 1470, 1375, 1180, 1040.

Исследование зависимости интенсивности флуоресценции α -токоферола и его смеси с гидропероксидом линолевой кислоты от концентрации компонентов в растворе проводили, последовательно разбавляя раствор $1 \cdot 10^{-3}$ М α -токоферола и смеси α -токоферол — гидропероксид линолевой кислоты (1 : 0,5; 1 : 1; 1 : 2) до конечной концентрации α -токоферола $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Исследование тушения флуоресценции α -токоферола в ацетонитриле в концентрации $2,4 \cdot 10^{-4}$ М проводили, прибавляя к раствору флуорофора возрастающие количества исследуемых веществ, так что содержание тушителей в растворе составляло от $1 \cdot 10^{-4}$ от $2 \cdot 10^{-3}$ М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sies H., Murphy E. M. // J. Photochem and Photobiol. B: Biol. 1991. V. 8. № 2. P. 211—224.
2. Чудинова В. В., Захарова Е. И., Алексеев С. М., Евстигнеева Р. П. // Докл. АН СССР. 1992. Т. 322. № 4. С. 773—775.
3. Sow M., Durocher G. // J. Photochem. and Photobiol. A: Chem. 1990. V. 54. № 3. P. 349—365.
4. Serbinova E., Kagan V., Han D., Packer L. // Free Radic. Biol. and Medic. 1991. V. 10. № 3. P. 263—275.
5. Бардтрон Дж., Коил Дж. Возбужденные состояния в органической химии. М.: Мир, 1978. С. 130—167.
6. Захарова Е. И., Шуаинов К. А.-В., Чудинова В. В., Алексеев С. М., Евстигнеева Р. П. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1268—1273.
7. Porter N. A. // Acc. Chem. Res. 1986. V. 19. № 2. P. 262—268.

Поступила в редакцию
21.VII.1992

После доработки
22.XI.1992

V. V. Chudinova, E. I. Zakharova, S. M. Alekseev,
R. P. Evstigneeva

INTERACTION OF VITAMIN E (α -TOCOPHEROL) WITH OXYGENATED DERIVATIVES OF FATTY ACIDS

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

Fluorescence spectra of α -tocopherol and its mixtures with oxygenated derivatives of fatty acids — linoleic acid hydroperoxide, hydroxylinoleic and ricinoleic acids — were investigated in terms of the excitation and emission dependence on the concentration of components in acetonitrile solution. In accordance with our results, formation of the α -tocopherol eximer and exiplex with the oxygen-containing derivatives of polyunsaturated fatty acids was suggested. The character of the interaction between components of the excited complexes and their possible role in peroxidation of lipids are discussed.

Технический редактор *Н. Н. Беляева*

Сдано в набор 19.01.93 Подписано к печати 22.02.93 Формат бумаги 70×100 ¹/₁₆
Офсетная печать Усл. печ. л. 10,4 Усл. кр.-отг. 6,1 тыс. Уч.-изд. л. 13,0 Бум. л. 4,0
Тираж 578 экз. Зак. 3853 Цена 19 р. 40 к.

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10, корп. 32, ком. 306
Телефон: 330-60-38
Московская типография № 2 ВО «Наука», 121099, Москва Г-99, Шубинский пер., 6