

О.В.Краденова,
*Д.А.Круговов,
Е.А.Ларкина,
Е.П. Ткачевская,
*О.Т.Касаикина

*ИХФ им. Н.Н.Семенова РАН

ВЛИЯНИЕ ФЕОФОРБИДА *a* НА ТЕМНОВОЕ И ФОТООКИСЛЕНИЕ ОЛЕФИНОВ

УДК 541.127:541.128:541.182

Рассмотрены особенности поведения феофорбида *a* (Ф) в условиях фотосенсибилизированного и темнового окисления природного олефина лимонена.

Показано, что феофорбид *a* является фотосенсибилизатором окисления лимонена, но не влияет на его темновое окисление и не взаимодействует с пероксидами. Однако Ф расходуется в реакциях с радикалами, образующимися при катализированном распаде H_2O_2 , и образует комплексы с соединениями цинка и кобальта.

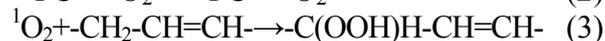
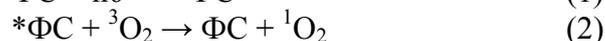
Фотосенсибилизаторы различной структуры находят применение в медицине, косметологии, технике, в осуществлении фоточувствительных биофизических процессов и химических реакций [1, 2]. В качестве фотосенсибилизаторов представляют интерес выделенные из природных источников (крапива, шпинат, микроводоросль *Spirulina platensis*) и модифицированные восстановленные формы порфиринов – хлорофиллы и бактериохлорофиллы.

Целью данной работы было выделение феофорбида *a* (Ф) и изучение его поведения в условиях фотосенсибилизированного и темнового окисления природного олефина лимонена в присутствии добавок пероксида и соединений металлов. Лимонен R(+) (4-изопропенил-1-метил-1-циклогексен) (ЛН) – природный циклоолефин терпенового ряда, содержащий две ненасыщенные связи, входит в состав практически всех эфирных масел. По кинетическим параметрам окисляемости лимонен близок к природным маслам и липидам клеточных мембран [3,4], поэтому ЛН использовали в качестве модельного олефина.

Феофорбид *a* получали на основе

хлорофилла *a*, выделенного из биомассы *Spirulina platensis*, согласно [11]. Чистоту контролировали методами ТСХ и электронной спектроскопии.

Известная схема фотокатализа окисления олефинов в присутствии фотосенсибилизаторов (ФС) имеет следующий вид [5]:



Основным продуктом фотосенсибилизированного окисления является гидропероксид, образующийся по реакции синглетного кислорода (1O_2) с α -С-Н связью олефина. Гидропероксиды относительно легко распадаются на свободные радикалы, которые далее реагируют с липидами, белками и другими компонентами микроокружения. Природным тушителем возбужденных состояний и синглетного кислорода (1O_2) является β -каротин [5,6].

Особенности Ф как фотосенсибилизатора исследовали на примере фотоокисления лимонена (ЛН) в инертном растворителе хлорбензоле. Электронный спектр поглощения Ф имеет несколько характеристических максимумов (рис.1). Облучение осуществляли при помощи лампы ДРШ 1000 с использованием оранжевого светофильтра ОС-11, который обеспечивал облучение Ф в длинноволновой характеристической полосе 668 нм. Фотоокисление лимонена проводили в кварцевой кювете ($l = 1$ см) при комнатной температуре ($[Ф] = 8 \cdot 10^{-7} M$, $[ЛН] = 1,2 M$). Степень окисления лимонена контролировали по изменению содержания гидропероксидов йодометрическим титрованием.

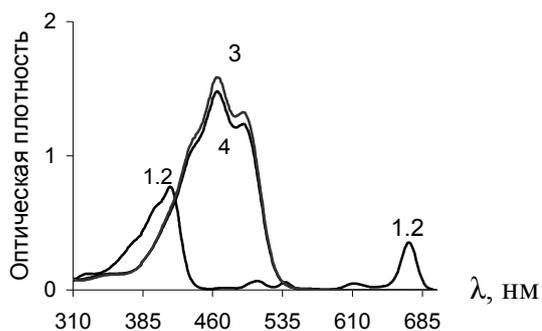


Рис. 1а. Спектры феофорбида *a* ($[\Phi] = 8 \cdot 10^{-7} \text{M}$) (1,2) и β -каротина ($[\beta\text{-K}] = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{M}$) (3,4) в растворе хлорбензол – лимонен ($[\text{LH}] = 1.24 \text{M}$) до (1,3) и после облучения в течение 18 мин (2,4).

В таблице 1 приведены данные по влиянию облучения на содержание гидропероксидов (LOOH) в растворах лимонена в хлорбензоле. Исходный раствор LH содержал $1,7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ LOOH. Облучение в присутствии Φ приводит к увеличению концентрации LOOH. Это означает, что имеет место фотоокисление LH, катализируемое Φ . Фактор катализа, определяемый как отношение $\Delta\text{LOOH}/(\Delta t \cdot [\Phi]) = 3,5 \text{ c}^{-1}$, свидетельствует о достаточно высокой эффективности Φ как катализатора.

Добавки тушителя β -каротина, как и следовало ожидать, уменьшают количество образовавшегося LOOH. Полосы поглощения Φ и β -каротина не совпадают (рис.1), что позволяет наблюдать за расходом каждого компонента смеси. Оказалось, что Φ не расходуется при

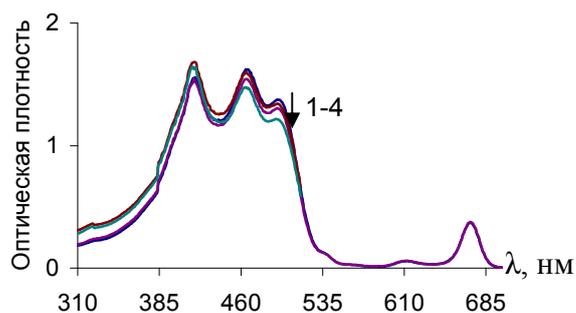


Рис. 1б. Изменение оптических спектров системы феофорбид *a*- β -каротин в растворе хлорбензол-лимонен ($[\text{LH}] = 1.24 \text{M}$) до (1) и после облучения лампой в течение 3(2)+5(3)+10(4) мин; $[\beta\text{-K}] = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\Phi] = 8 \cdot 10^{-7} \text{M}$.

облучении растворов LH, как взятый отдельно, так и в смеси с β -каротином, т.е. Φ проявляет качества истинного фотосенсибилизатора. Из рис.1 а, б видно, что β -каротин расходуется при облучении растворов LH, причем в присутствии Φ расхождение более интенсивное. По-видимому, фотокаталитическое действие Φ не ограничивается реакциями 1-3, а включает также стадию образования радикалов в исследуемой системе. Этим обстоятельством можно объяснить наблюдаемое расхождение β -каротина, который известен как эффективный акцептор радикалов разных типов [7]. Радикалы могут генерироваться при фотораспаде LOOH в ароматическом растворителе. Как видно из таблицы, при облучении в присутствии β -каротина содержание LOOH уменьшается.

Таблица 1. Влияние облучения на содержание гидропероксидов в растворе LH в хлорбензоле в присутствии Φ и β -каротина, $[\text{LH}] = 1,2 \text{ M}$ (время облучения 18 мин).

Добавки к системе	$[\text{LOOH}], \text{M}$	$\Delta[\text{LOOH}], \text{M}$
Без добавки, без облучения	$1.7 \cdot 10^{-2}$	0
Феофорбид <i>a</i>	$2.1 \cdot 10^{-2}$	$+3 \cdot 10^{-3}$
Феофорбид <i>a</i> и β -каротин	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$+2 \cdot 10^{-3}$
β -каротин	$1.6 \cdot 10^{-2}$	$-1 \cdot 10^{-3}$

Важным фактором, определяющим возможность применения фотосенсибилизаторов как в химических синтезах, так и в фотодинамической терапии, является их инертность в темновых процессах. Для азотсодержащих соединений, например, содержащих аминогруппы, известны

реакции с пероксильными и другими радикалами, а также реакции с пероксидами с образованием катион-радикалов и других активных частиц [8,9]. Поэтому было исследовано влияние Φ на темновое окисление лимонена и поведение Φ по отношению к H_2O_2 и радикалам,

образующимся при распаде H_2O_2 под действием соединений металлов.

Окисление лимонена в растворе хлорбензола проводили молекулярным кислородом в термостатируемой ($60^\circ C$) стеклянной ячейке. Степень окисления контролировали по количеству поглощенного

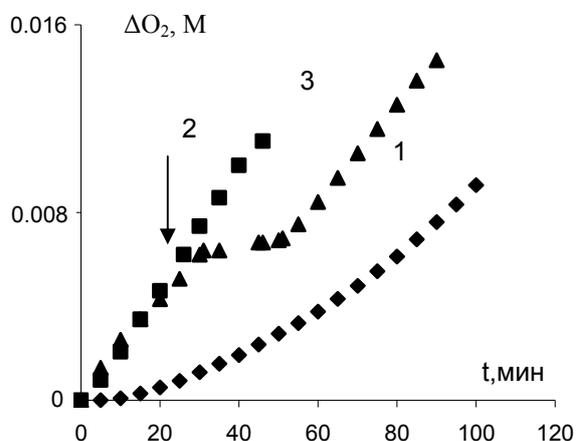


Рис. 2а. Кинетические кривые поглощения O_2 при окислении лимонена ($[LH] = 1M$, $60^\circ C$): 1 – в процессе автоокисления; 2 – в присутствии $1 \cdot 10^{-2} M$ $Cu(асас)_2$; 3- при введении добавок ингибитора (обозначено стрелкой) [α -токоферол] = $5 \cdot 10^{-4} M$.

На рис. 2а представлены типичные кинетические кривые поглощения кислорода при окислении ЛН: в автоокислении (кривая 1) и в режиме катализированного $Cu(асас)_2$ окисления (2), когда скорость инициирования радикалов увеличивается за счет катализированного распада $LOOH$. При введении ингибитора (α -токоферол) в окисляющийся лимонен процесс поглощения кислорода прекращается, и наблюдаются периоды индукции равные $\tau = 2[LnH]/w_i$ (см. кривую 3, рис.2 а).

Из рис.2б видно, что добавка $1mM$ Φ практически не влияет на кинетику поглощения O_2 при окислении лимонена. Это означает, что Φ не изменяет скорости обрыва цепей (не ингибирует окисление) и не влияет на скорость образования радикалов при распаде гидропероксида (w_i). Факт, что феофорбид *a* не влияет на скорость процесса темного окисления лимонена, указывает на «закрытость» атомов азота в этом соединении и его инертность по отношению к пероксильным радикалам и гидропероксидам лимонена.

кислорода, которое в случае окисления лимонена практически совпадает с количеством образовавшегося гидропероксида [3,4]. Для измерения поглощенного кислорода использовали газометрическую установку типа Варбург.

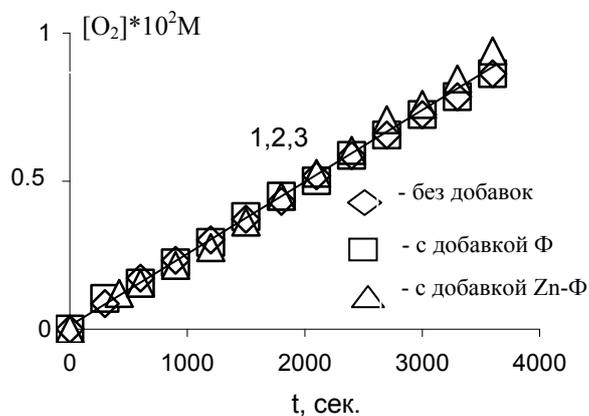


Рис. 2б. Кинетические кривые поглощения O_2 при окислении лимонена 1 – без добавок, 2 – в присутствии феофорбида *a*, $[\Phi] = 1 \cdot 10^{-3} M$ и 3- с добавкой цинкового комплекса феофорбида *a*, $[Zn\Phi] = 1 \cdot 10^{-3} M$, $[LH] = 1M$, $[LOOH] = 4 \cdot 10^{-2} M$, хлорбензол, $60^\circ C$.

Реакцию Φ и H_2O_2 проводили непосредственно в кювете спектрофотометров Ultrospec 1100 pro и SPECORD UV-VIS. К раствору Φ в этаноле добавляли микрошприцом H_2O_2 (пергидроль, содержащий 30% H_2O_2). При этом никаких изменений в спектре поглощения не наблюдалось. Однако при совместном присутствии H_2O_2 и соединений переходных металлов кобальта и железа регистрировали уменьшение оптической плотности растворов Φ в главных максимумах. Эти данные указывают на отсутствие непосредственного взаимодействия Φ с H_2O_2 и расходование Φ в реакциях с радикалами, образующимися при катализированном распаде H_2O_2 . Если добавка ацетилацетоната железа к раствору Φ (без H_2O_2) не приводила к заметным изменениям спектров поглощения Φ (рис. 3), то при введении $Co(асас)_2$ (рис. 4, кривая 1), наблюдали заметные изменения: уменьшение оптической плотности и изменение формы характеристической полосы 411 нм, а также изменение

соотношения оптических плотностей остальных максимумов (рис.4 ср. кр. 0 и 1). При добавлении H_2O_2 наблюдали падение оптической плотности в характеристических максимумах, свидетельствующее о реакции Φ и комплекса $\text{Co}-\Phi$ с радикалами, образующимися при распаде H_2O_2 , катализированном соединениями Co .

На рис. 5 показано, что при добавлении к раствору Φ ацетата цинка наблюдаются более быстрые, чем в случае $\text{Co}(\text{acac})_2$, изменения в спектрах поглощения, свидетельствующие об образовании цинкового комплекса Φ . Примечательно,

что в присутствии $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]$ характер изменения спектров (рис. 5) практически не меняется. Это означает, что и Φ , и его комплекс с цинком, и $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ инертны по отношению к H_2O_2 . Цинковый комплекс Φ ($\text{Zn}\Phi$) был получен и выделен в индивидуальном виде по реакции Φ с избытком ацетата цинка в растворе хлороформа. Оказалось, что добавление $\text{Zn}\Phi$ в окисляющийся лимонен не влияет на скорость поглощения кислорода (рис.2 б, кр. 3), т.е. $\text{Zn}\Phi$ так же, как и Φ , не реагирует с пероксильными радикалами и гидропероксидом лимонена.

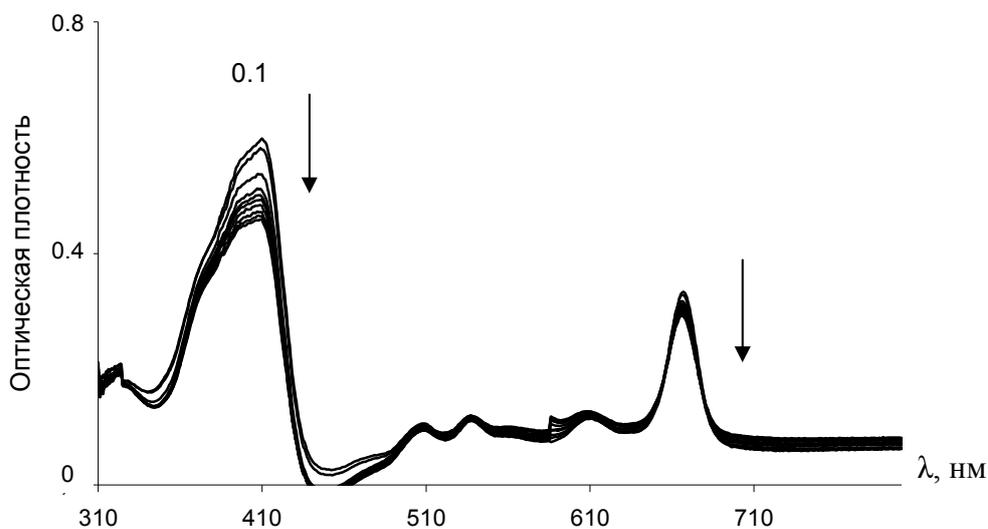


Рис. 3. Спектры поглощения раствора $8 \cdot 10^{-7} \text{M}$ $[\Phi]$ и $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ в этаноле, сразу после смешения (0), через сутки (1); далее после добавления $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]$ к раствору (1) спектры снимали с интервалом 3 мин; 22°C .

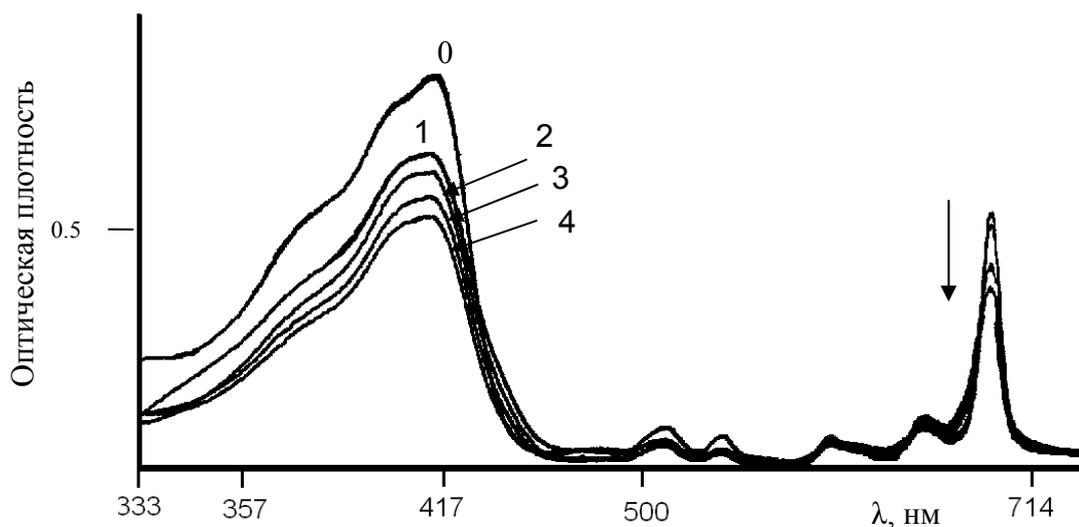


Рис. 4. Спектры поглощения раствора $8 \cdot 10^{-7} \text{M}$ $[\Phi]$ и $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ $[\text{Co}(\text{acac})_2]$ в этаноле, сразу после смешения (0), через сутки (1); далее после добавления $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]$ к раствору (1), через 0,5 (2); 10 (3) и 30 (4) минут; 22°C

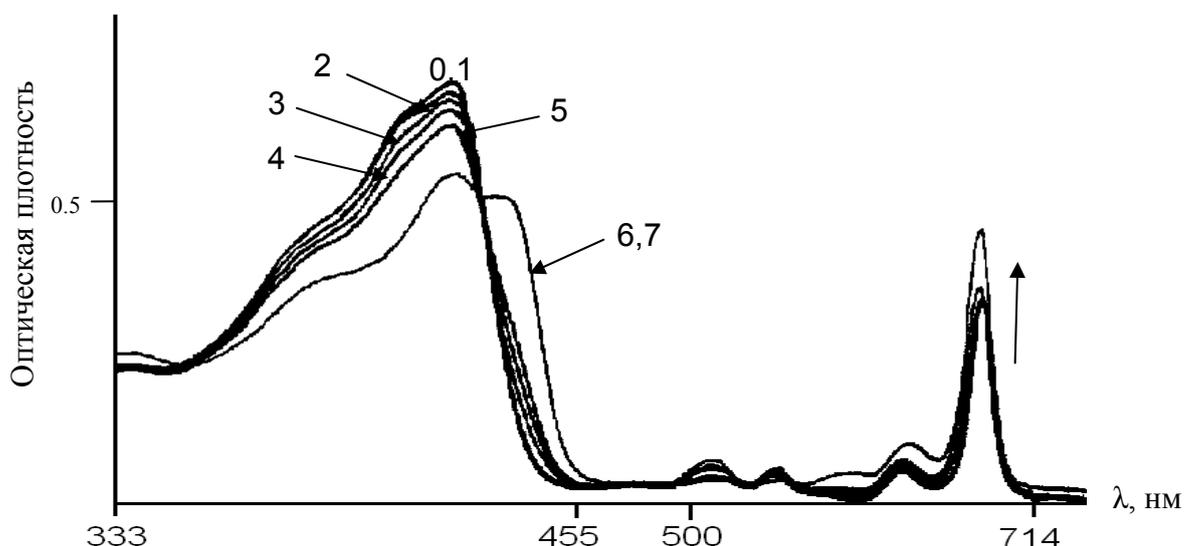


Рис. 5. Изменение в спектрах этанольного раствора $8 \cdot 10^{-7} \text{M}$ [Ф] (0) при добавлении $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ $[\text{Zn}(\text{As})_2]$ сразу (1) и через 3 (2), 5 (3), 45 (4) и 70 (5) минут, 6- через 1 сутки после смешения, 7- после добавления $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ $[\text{H}_2\text{O}_2]$ к раствору (6); 22°C .

Таким образом, можно считать установленным, что феофорбид *a* и его комплекс с цинком не окисляются при непосредственном взаимодействии с пероксильными радикалами и пероксидами. Однако Ф реагирует со свободными радикалами, образующимися при распаде H_2O_2 , катализированном переходными металлами. Из характера изменения электронных спектров можно предположить, что радикалы присоединяются к двойным связям и разрушают хромофорную систему тетрапиррола.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы R+ Лимонен (Fluka), β -каротин (Fluka Chemica-Biochemica) использовали без дополнительной очистки. Окисление лимонена проводили при 60°C в растворе хлорбензола. Хлорбензол очищали стандартными методами [10]. Скорость поглощения кислорода измеряли на газометрической установке при $\text{P}_{\text{O}_2} = 0.1 \text{ МПа}$ с объемом реакционной смеси 4 мл. Концентрацию пероксидов определяли иодометрически.

Для проведения реакций фотосенсибилизированного окисления использовали прибор ДРШ – 1000, снабженный ртутно-кварцевой лампой с диапазоном пропускания 220-800 нм, со

светофильтром оранжевым ОС – 11, диапазон пропускания 600-750 нм.

УФ спектры регистрировали на спектрофотометрах Ultrospec 1100 pro и SPECORD UV-VIS.

Для получения феофорбида *a* из биомассы микроводоросли *Spirulina platensis* 50 г лиофилизованной биомассы суспендировали в 400 мл ацетона и для разрушения клеточных стенок обрабатывали жидким азотом в течение 1 ч. Смесь размораживали и кипятили при интенсивном перемешивании 2.5 ч в атмосфере аргона. Осадок отфильтровывали и промывали ацетоном до полного исчезновения окраски растворителя ($\approx 700 \text{ мл}$). В объединенные растворы прибавляли 100 мл воды и однократно экстрагировали хлорофилл *a* 500 мл петролейного эфира. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 37.5 мл ацетона и добавляли 62.5 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь перемешивали в токе аргона 1.5 ч в темноте при комнатной температуре и далее экстрагировали каротиноиды петролейным эфиром ($3 \times 90 \text{ мл}$). Водную фазу разбавляли 150 мл воды и извлекали феофорбид *a* хлороформом ($2 \times 62.5 \text{ мл}$). Водную фракцию нейтрализовали 10%

раствором NaOH и экстрагировали остатки феофорбида *a* 25 мл хлороформа. Объединенные экстракты промывали водой, раствором NaHCO₃ и повторно водой, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали до 15 мл. Продукт переосаждали 40 мл петролейного эфира. Осадок отфильтровывали и очищали с помощью флеш-хроматографии на силикагеле в системе изопропанол/хлороформ 1:12. Феофорбид *a* перекристаллизовывали из смеси метанол/дихлорметан. Получали 122 мг. Электронный спектр ($\lambda_{\text{макс}}$, нм): 408.20, 507.10, 537.30, 609.00, 668.00 нм (в этаноле) и 413.10, 507.40, 538.00, 611.40, 668.40 нм (в хлорбензоле), $R_f = 0.4$ (хлороформ/метанол 15:1).

Для получения Zn-комплекса

феофорбида 20 мг феофорбида *a* растворяли в 10 мл хлороформа, приливали 5 мл насыщенного раствора ацетата цинка в метаноле. Перемешивали 30 мин. Образование Zn-комплекса контролировали методами электронной спектроскопии и ТСХ в системе хлороформ/метанол 15:1. Реакционную смесь промывали водой (5×50 мл), осушали над Na₂SO₄, отфильтровывали и отгоняли растворитель в вакууме. Далее проводили переосаждение из смеси петролейный эфир/хлороформ. Осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход цинкового комплекса феофорбида *a* составил 75% (16.8 мг).

Электронный спектр ($\lambda_{\text{макс}}$, нм): 418.00, 568.00, 613.00, 662.60 (хлороформ), $R_f = 0.46$ (хлороформ/метанол 15:1).

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 04-03-32569, НШ-5236.2006.3, I-ОХНМ, грантом президента Российской Федерации № МК-3124.2006.3.

ЛИТЕРАТУРА:

1. А.Ф. Миронов. //Соросовский образовательный журнал.– 1996. – №8. – С. 32-40.
2. А.Ф. Миронов. //Итоги науки и техники. Современные проблемы лазерной физики. – 1990. – Т.3. – С. 5-61.
3. Г.М. Кузнецова, Т.В.Лобанова, И.Ф.Русина, О.Т.Касаикина. //Изв. РАН, Сер.хим. – 1996 – №7. – С.1676-1681.
4. Л.М.Писаренко, В.Г.Кондратович, О.Т. Касаикина. //Изв. РАН, Сер. хим. – 2004. – №10. – С. 2110-2123.
5. E.N. Frankel. Lipid oxidation. /The Oily Press, Dundee (Scotland) – 1998. – 303 p.
6. C.S.Foot. //W.A.Pryor, Ed. v.2. N. Y: Academic Press. – 1976. – P.85.
7. О.Т.Касаикина, V.V.Vedutenko, A.M.Kashkay, V.D.Kortenska, M.I.Boneva, N.V.Yanishlieva. //Oxid. Comm. – 2002. – Vol. 25, № 2. – P.232-243.
8. Н.М.Эмануэль, Е.Т.Денисов, З.К.Майзус. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе. – М.: Наука, 1965 – 375 с.
9. Emanuel, D. Gal: Modelling of Oxidation Processes, Prototype: The Oxidation of Ethylbenzene. – Budapest: Akademiai Kiado, 1986. – 107 p.
10. А.А.Вайсберг, Д.Проскауэр, Дж.Риддик, Э.Тупс. Органические растворители. – М.: Изд-во. иностр. лит., 1958. – С.154.
11. A.S.Brandis, A.N.Kozyrev, A.F.Mironov. //Tetrahedron. – 1992.– Vol. 48. – P. 6491-6499.