

## ОКСИХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ АВТООКИСЛЕНИИ РЫБЬЕГО ЖИРА

Веprinцев Т.Л., Наумов В.В.

*Институт биохимической физики РАН, Москва*

Подробная информация об авторах размещена на сайте

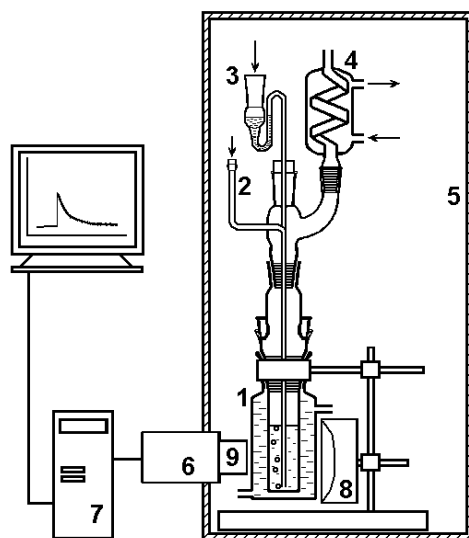
«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

**Проведено исследование оксихемилюминесценции растворов рыбьего жира в хлорбензоле в температурном диапазоне от 30 до 70 °С. Удельная интенсивность свечения изменялась от 56400 до 786000 фотонов/(г·с). Излучение многократно усиливали активаторы хемилюминесценции – 9,10-дибромантрацен и  $\text{Eu}^{3+}$ -1,10-фенантролин-трис(теноил-трифтор-ацетонат).**

В основе множества патологических состояний лежит разрушение липидных структур клеток вследствие свободнорадикального окисления, инициированного активными формами кислорода [7, 8, 13]. Качество пищевых, фармацевтических и технических продуктов, содержащих липиды, также во многом зависит от интенсивности и глубины процессов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов [11, 12, 16]. Поэтому разработка экспресс-метода контроля за интенсивностью этих процессов представляется весьма

актуальной. Особое внимание привлекает удобный и чувствительный хемилюминесцентный метод, используемый в химии для регистрации кинетики окисления углеводородов и тестирования антиоксидантов [6, 10, 14, 18, 22]. Однако по хемилюминесценции липидов и их аналогов литературные данные отрывочны и носят лишь качественный характер.

Целью настоящей работы является количественное исследование кинетики оксихемилюминесценции липидов и выявление ее механизмов.



**Рис.1.** Установка для изучения оксихемилюминесценции в жидкой фазе

### МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ

Объектом исследования выбран рыбий жир (ГУ Р 71.566.48, Тверская фармацевтическая фабрика), легко окисляющийся

вследствие высокой ненасыщенности его липидов и содержащий умеренное количество антиоксидантов [16]. В качестве растворителя использовали хлорбензол

(Acros Organics, 99+%). Регистрацию свечения осуществляли при помощи фотоэлектрического умножителя (ФЭУ) в составе модуля Н7467 фирмы Hamamatsu (Япония), работающего в режиме счета фотонов.

Окисление проводили при температуре  $30 \div 70^\circ\text{C}$  и непрерывном барботировании воздуха на установке, представленной на рис. 1: термостатируемая ячейка-реактор (1), снабженная устройствами для барботаж (2), ввода добавок (3) и обратным холодильником (4) была размещена в светонепроницаемой камере (5) со встроенным модулем Н7467 (6), подключенным к компьютеру (7). Светосбор осуществлялся при помощи параболического зеркала (8) и стеклянного цилиндрического световода (9). Процент светосбора составлял 1.92%, т.е. в фотоумножитель попадало 1.92% полного излучения образца.

В ряде опытов использовали активаторы хемилюминесценции – 9,10-дибромантрацен и  $\text{Eu}^{3+}$ -1,10-фенантролин-

трис(теноил-трифторацетонат) (хелат европия) [2].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 2-3 приведена кинетика хемилюминесценции растворов рыбьего жира в хлорбензоле при различных температурах и концентрациях. Можно видеть, что все кривые сходны по форме – интенсивность хемилюминесценции снижается по мере увеличения времени инкубации и приближается к определенному квазистационарному уровню, зависящему от исходной концентрации рыбьего жира и температуры опыта. Кривые, полученные при более высоких концентрациях при одной и той же температуре, расположены выше кривых, соответствующих меньшим концентрациям (рис. 3). Увеличение концентрации рыбьего жира приводит к пропорциональному возрастанию интенсивности хемилюминесценции (рис. 3). Это указывает на одноподобный характер кинетики в исследованном диапазоне концентраций.

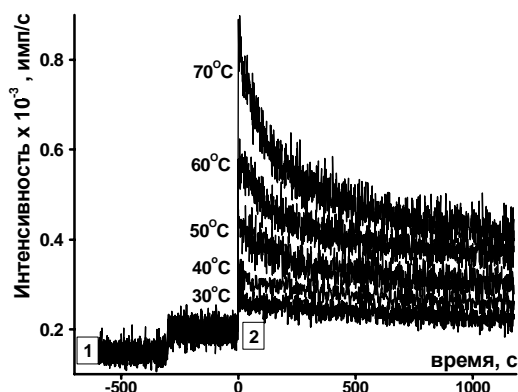


Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесценции при окислении раствора (112.5 г/л) рыбьего жира в хлорбензоле. 1 – шум ФЭУ, 2 – хлорбензол

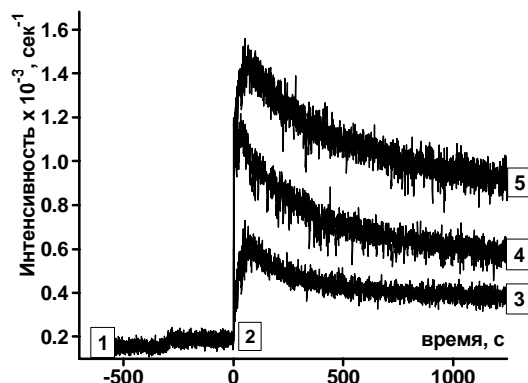


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесценции растворов рыбьего жира в хлорбензоле при температуре  $60^\circ\text{C}$ . 1 – шум ФЭУ. Концентрации: 2 – 0; 3 – 112.5; 4 – 225.0; 5 – 337.5 г/л

Анализ литературных данных показывает, что в углеводородных системах возможны 2 механизма оксихемилюминесценции:

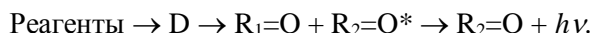
1) *свободнорадикальный*, когда при взаимодействии пероксидных радикалов

( $\text{ROO}^\bullet$ ) образуется продукт в возбужденном электронном состоянии ( $*$ ), быстро переходящий в основное состояние с испусканием кванта света [1, 5, 9, 18, 20, 22]



## ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

2) *молекулярный*, когда квант света излучается при распаде промежуточного продукта окисления – диоксетана (D) [3, 4, 17, 19],



В первом случае интенсивность свечения, пропорциональная квадрату концентрации свободных пероксидных радикалов, должна снижаться при введении в систему антиоксидантов, реагирующих с этими радикалами и снижающих их концентрацию.

Известно, что липиды природного происхождения обычно содержат природные антиоксиданты, являющиеся ловушками свободных радикалов [7, 8, 16]. Следовательно, в их присутствии концентрации свободных радикалов незначительны. Поэтому можно отдать предпочтение второму механизму хемилюминесценции. Для доказательства этого на разных стадиях инкубации в исследуемый раствор добав-

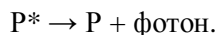
ляли высокоэффективный антиоксидант токоферол в концентрациях  $(2.5 \div 36) \cdot 10^{-5}$  моль/л, способных полностью подавлять свободнорадикальную хемилюминесценцию, возбуждаемую по первому механизму [7, 15, 20]. При этом интенсивность свечения оставалась без изменений, что подтверждает предположение о молекулярном механизме хемилюминесценции.

Учитывая, что квантовый выход фотоумножителя составляет 10%, была вычислена удельная интенсивность хемилюминесценции рыбьего жира (количество фотонов, излучаемое в единицу времени единицей массы жира) в исследованном температурном диапазоне (таблица 1).

**Таблица 1.** Удельная интенсивность хемилюминесценции раствора рыбьего жира в хлорбензоле

Температура, °C	Удельная интенсивность $\times 10^{-3}$ , фотон/(г·с), среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	
	максимальная (начало опыта)	минимальная (после 20 мин. инкубации)
30	$91.4 \pm 0.006$	$56.4 \pm 0.050$
40	$112 \pm 11.4$	$59.3 \pm 6.03$
50	$204 \pm 22.9$	$98.4 \pm 2.78$
60	$518 \pm 9.21$	$219 \pm 11.6$
70	$786 \pm 14.0$	$223 \pm 11.8$

Излучение фотона происходит при переходе молекулы продукта окисления из электронно-возбуждённого состояния ( $\text{P}^*$ ) в основное (P) по реакции



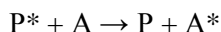
При этом должно выполняться соотношение

$$\Delta E^* = E^* - E^0 \geq h\nu,$$

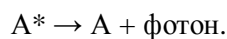
где  $E^0$  и  $E^*$  – энергии основного и возбуждённого состояний,  $h\nu$  – энергия фотона.

Оценка энергии возбуждённых состояний возможна благодаря использова-

нию активаторов хемилюминесценции (A) – химически инертных веществ, способных участвовать в переносе электронной энергии по реакции



с последующим излучением фотона [1, 2, 4, 22]



Нами были использованы два активатора – 9, 10-дибромантрацен (ДБА) и хелат европия (ХЕ), энергии возбужденных состояний которых ( $\Delta E^*$ ) равны 297 и 243 кДж/моль соответственно [1, 2, 4]. Концентрацию хелата европия варьировали в диапазоне от  $9.76 \cdot 10^{-5}$  до  $36.4 \cdot 10^{-5}$  моль/л, что соответствовало усилению хемилюминесценции в  $7 \div 23$  раза. Диапазон концентраций ДБА составлял  $2.27 \div 25$

ммоль/л. Это соответствовало усилению хемилюминесценции в  $1.27 \div 4.4$  раза. Эффективный перенос энергии с электронно-возбужденных молекул продуктов окисления ( $P^*$ ) на молекулы активаторов говорит о том, что энергетические уровни возбужденных состояний продуктов окисления липидов рыбьего жира расположены выше уровней активаторов, т.е.

$$\Delta E^*_{P^*} \geq \Delta E^*_{\text{ДБА}} = 297 \text{ кДж/моль} > \Delta E^*_{\text{ХЕ}} = 243 \text{ кДж/моль.}$$

Возможность многократного усиления хемилюминесценции активаторами показывает, что их квантовый выход люминесценции и время жизни возбужденных состояний много больше, чем у продуктов окисления  $P^*$ , имеющих предположительно кетонную природу [1].

Значения интенсивности хемилюминесценции, полученные при одной и той же глубине (по времени) процесса инкубации, но при разных температурах, были использованы для построения графиков температурных зависимостей в координатах  $\ln I_t \div 1/T$ , где  $I_t$  – интенсивность хемилюминесценции в момент времени  $t$ ,  $T$  – абсолютная температура. Таким образом были получены температурные зависимости хемилюминесценции, соответствующие моментам времени инкубации 60, 120, 180, 300, 480, 780 и 1200 с. Коэффициенты корреляции превышали 0.97 и являлись значимыми для уровня  $P = 0.0001$  согласно  $t$ -критерию Стьюдента. Линейные коэффициенты наклона полученных прямых были использованы для вычисления энергии активации, значение которой ( $\pm$  стандартное отклонение) составило  $43.8 \pm 2.5$  кДж/моль. Эта величина близка к значению 41.9 кДж/моль полученному для линоленовой кислоты в работе [21].

По результатам работы можно заключить, что источником хемилюминесценции липидов, содержащих антиоксиданты, являются промежуточные продукты окисления молекулярной природы. Полученные количественные характеристики

могут быть использованы для разработки методов мониторинга перекисного окисления липидов и детализации механизмов оксихемилюминесценции, что будет являться предметом дальнейших исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Беляков В.А., Васильев Р.Ф. // В сб. Молекулярная фотоника. Л.: Наука. Ленингр. отд. 1970. С. 70
2. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1973. Т.37. №4. С. 747.
3. Беляков В.А., Филиппова Т.В., Заседателев С.Ю., Блумберг Э.А. Хемилюминесценция при окислении непредельных углеводов // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1979. С. 1485–1489.
4. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1983. №12. С. 2709–2717.
5. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Иванова Н.М., Минаев Б.Ф., Осяева О.В., Федорова Г.Ф. // Изв. АН СССР. Сер. физ. 1987. Т. 51. №3. С. 2709.
6. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Кинетика и катализ. 2004. Т. 45. № 3. С. 355.
7. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. // Успехи химии. 1985. Т. 54. С. 1540.
8. Бурлакова Е.Б. // Рос. хим. ж. 2007. Т.51. № 1. С. 3.
9. Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Кинетика и катализ. 2004. Т. 45. С. 695.
10. Васильев Р.Ф., Наумов В.В., Трофимов А.В., Федорова Г.Ф. // Методы

## ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

- оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения. (Под ред. Е.Б. Бурлаковой) М.: Изд-во РУДН. 2005. С. 39.
11. Заиков Г.Е. // СОЖ, 2000, №12, с. 48–55.
  12. Заиков Г.Е. // СОЖ, 2001, №9, с. 50–56.
  13. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. - М. : МАИК "Наука / Интерпериодика", 2001. 343 С.
  14. Наумов В.В., Храпова Н.Г. // Кинетика и катализ. 1984. Т. 25. № 3. С. 563.
  15. Наумов В.В., Васильев Р.Ф. // Кинетика и катализ. 2003. Т. 44. № 1. С. 111.
  16. Ржавская Ф.М. Жиры рыб и морских млекопитающих. М.: Пищевая промышленность. 1976. 471 С.
  17. Шарипов Г.Л., Казаков В.П., Толстиков Г.А. Химия и хемилюминесценция 1,2-диоксетанов. М.: Наука. 1990. 288 С.
  18. Шляпинтох В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М. Захаров И.П., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука. 1966. 300 С.
  19. Adam W., Trofimov A.V.// The Chemistry of Peroxides, Ed. by Z. Rappoport. Chichester, UK: John Wiley & Sons. 2006. V.2. P. 1171.
  20. Denisov E.T., Afanas'ev I.B. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. CRC: Har/Cdr edition. 2005. 1024 P.
  21. Slawson V., Adamson A.W. // Lipids. 1976. V. 11. N. 6. P. 472.
  22. Vassil'ev R.F. // Progress in reaction kinetics. V. 4. Ed. by G. Porter. Oxford-London-Edinburge-NY: Pregamon Press. 1967. P. 305.

### FISH OIL AUTOXIDATION OXICHEMILUMINESCENCE

Veprintsev T.L., Naumov V.V.

*Institute of biochemical physics of Russian academy of sciences, Moscow*

The chemiluminescence of fish oil solutions in chlorobenzene has been investigated in the temperature range from 30 to 70°C. Specific light intensity ranged from 56400 to 786000 quants/(g·s). The radiation was multifoldly enhanced by chemiluminescence activators – 9,10-dibromoanthracene and Eu<sup>3+</sup>-1,10-phenanthroline-tris(thenoyltrifluoroacetate).