

Электрокаталитические реакции α -липовой кислоты

Г.С. Шаповал¹, О.С. Кругляк¹, Т.И. Мотрониюк²

¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,
Украина, 02094 Киев, ул. Мурманская, 1; факс: (044) 573-25-52

²Национальный технический университет Украины
"Киевский политехнический институт",
Украина, 03056 Киев, просп. Победы, 37; тел.: (044) 241-76-06

При исследовании методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии на медном и платиновом электродах реакций электрокаталитического окисления и электрохимического восстановления α -липовой кислоты установлены особенности ее антиоксидантного действия. По взаимодействию с гидроксильными радикалами и пероксидом водорода α -липовой кислоты определена ее антирадикальная и антиокислительная активность, а по взаимодействию с ионом двухвалентного железа – превентивная антиоксидантная активность. Установлено, что электрокаталитические и электрохимические реакции α -липовой кислоты сопровождаются адсорбцией на медном и платиновом электродах. Показано, что аскорбиновая кислота усиливает антиоксидантное действие α -липовой кислоты.

Каталитические реакции биологически активных органических соединений в организме, как правило, протекают с участием ферментов, которые регулируют их направление и скорость. Интенсификация каталитических реакций под влиянием активных форм кислорода (АФК), таких как пероксид водорода и гидроксильные радикалы, т. е. при возникновении "кислородного стресса", приводит к различным патологиям жизненно важных систем организма. Противостоит этому антиоксидантная система, которая кроме целой армии высокомолекулярных ферментов имеет на вооружении ряд низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов. К ним, в частности, относятся такие аминокислоты, как цистеин, ацетилцистеин, трипептид глутатион и α -липовая кислота [1]. Существование этих соединений в двух формах – восстановленной, содержащей тиольную группу, и окисленной, содержащей дисульфидную группу, играет ключевую роль в защите жизненно важных систем организма при перекисном окислении липидов и перекисной модификации макромолекул белка. Кроме других функций α -липовая кислота выполняет роль наиболее эффективного эндогенного антиоксиданта и радиопротектора, принимает участие в дезактивации значительного количества свободных радикалов, разрушающих митохондрии и мембраны клеток многих систем организма [1]. Универсальные свойства α -липовой кислоты, ее локализация в клеточных мембранах, цитоплазме и внеклеточной жидкости, а также ее способность к совместному действию, в частности с аскорбиновой кислотой и глутатионом при антиоксидантной защите организма, вызывают все возрастающий интерес исследователей к изучению на молекулярном уровне механизма окисли-

тельно-восстановительных реакций с участием этого биологически активного вещества (БАВ) [2–4].

Определенную информацию об этом позволяют получить электрохимические методы [5]. Однако известные работы по электрохимическим исследованиям α -липовой кислоты ограничены реакциями переноса электронов с участием электрода и деполяризатора, в то время как в биосистемах такие реакции протекают с участием кислорода и АФК. Кроме того, известные электрохимические исследования α -липовой кислоты, проведенные в водной среде и в не свойственной биосистемам среде органических растворителей, оставляют много вопросов и поводов для уточнений и дискуссий [2, 6–8].

С нашей точки зрения, более корректно судить о механизме редокс-реакций α -липовой кислоты и ее сравнительной антиоксидантной активности *in vitro* можно в условиях, моделирующих "кислородный стресс" организма, на основании изучения реакций каталитического окисления этого соединения с помощью АФК при образовании последних на поверхности катода в водной среде. Возможность подобного моделирования была установлена и успешно использована ранее [9, 10]. Так, для определения антиоксидантной активности БАВ были предложены три модели [11]: первая – взаимодействие БАВ с гидроксильными радикалами для определения антирадикальной активности, вторая – взаимодействие этих соединений с пероксидом водорода для характеристики их антиокислительной активности, и третья – взаимодействие БАВ с ионами двухвалентного железа, участниками реакции Фентона [12] – для характеристики способности БАВ выступать в качестве превентивных антиоксидантов.

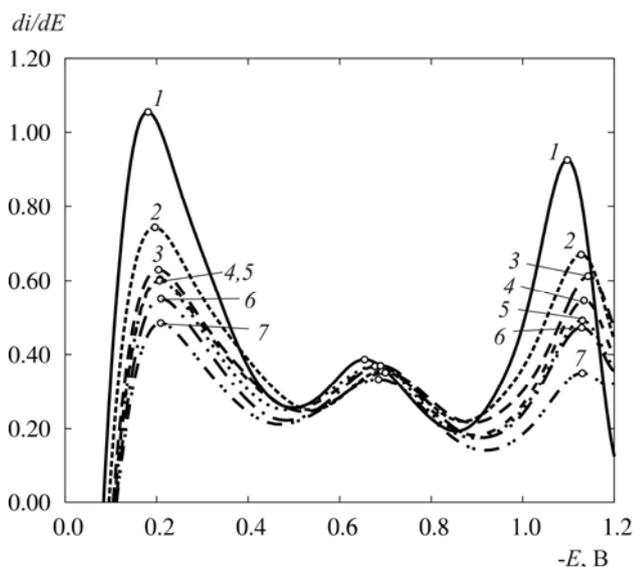


Рис. 1. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления кислорода на медном катоде на фоне 0,1 М раствора NaCl в воде (1) и при различных концентрациях α -липовой кислоты: 2 – 0,098; 3 – 0,19; 4 – 0,37; 5 – 0,54; 6 – 0,69; 7 – $0,83 \cdot 10^{-3}$ М/дм³

Разработанный метод определения антирадикальной и антиокислительной активности состоит в электрохимическом восстановлении кислорода в специальном импульсном режиме, который позволяет одновременно генерировать гидроксильные радикалы, пероксид водорода и изучать процесс их взаимодействия с антиоксидантами на поверхности электрода. При этом, чтобы удостовериться в том, что каталитический процесс взаимодействия кислорода и АФК с α -липовой кислотой протекает непосредственно на поверхности электрода, необходимо исследовать адсорбцию на этой поверхности участников процесса.

Материалы и методы исследования

Методика получения вольтамперных кривых, на которых удается выделить волны восстановления молекулярного кислорода и гидроксильных радикалов, образующихся в процессе одноэлектронного восстановления пероксида водорода, описана в работах [9–11].

Она состоит в следующем: в специальном импульсном режиме снимают дифференциальные вольтамперные кривые кислорода в 0,1 М водном растворе NaCl (модель физиологического раствора) на медном катоде. В результате наблюдают, появление трех пиков волн (рис. 1), которые характеризуют реакции (1–4), аналогичные протекающим в биосистемах в процессе дыхания, обмена веществ, а также кислородного стресса [11]:

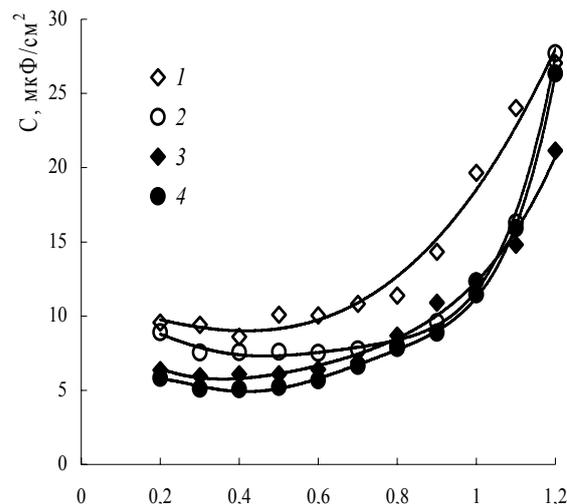
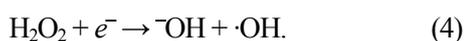
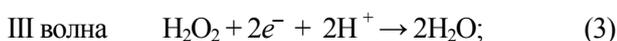


Рис. 2. Дифференциальная емкость медного катода в фоновом растворе NaCl, продутом аргоном (1); то же при концентрации α -липовой кислоты: $0,098 \cdot 10^{-3}$ М/дм³ (2); в фоновом растворе NaCl в присутствии кислорода (3); в том же растворе при концентрации α -липовой кислоты $0,19 \cdot 10^{-3}$ М/дм³ (4)

О механизме каталитического окисления α -липовой кислоты с помощью АФК можно судить по изменениям в ее присутствии морфологии и количественных показателей вольтамперной кривой восстановления кислорода (рис. 1), о восстановительных процессах – по электрохимическому восстановлению окисленной формы α -липовой кислоты на платиновом катоде.

Дифференциальные вольтамперные кривые получали с помощью сопряженного с компьютером полярографа ПУ-1. Потенциал медного и платинового рабочего электрода задавали относительно хлорсеребряного электрода сравнения, вспомогательным электродом служила платиновая спираль.

Адсорбцию исследуемых соединений на медном и платиновом катодах, которые представляли собой торец соответствующей проволоки, изучали методом спектроскопии электрического импеданса [13] с помощью универсальной системы ACM Instruments Auto и по той же трех-электродной схеме, по которой получали вольтамперные кривые. Вспомогательным электродом служила платиновая пластина. Потенциал задавали относительно насыщенного хлорсеребряного электрода сравнения.

В работе использована α -липовая кислота фирмы “Sigma”.

Раствор α -липовой кислоты в 0,1 М водном растворе NaCl готовили непосредственно перед измерениями. Фоновый электролит – 0,1 М NaCl – готовили из дважды перекристаллизованного NaCl квалификации “х. ч.” в бидистиллированной воде. Концентрация кислорода в исследуемом растворе соответствовала равновесной при атмосферном давлении и температуре 20 °С.

Результаты исследований и их обсуждение

Из полученных в обескислороженном растворе 0,1 М NaCl кривых (рис. 2) зависимости емкости двойного электрического слоя (ДЭС) от потенциала медного электрода (кривая 1) в присутствии α -липовой кислоты следует, что емкость ДЭС снижается во всем исследуемом интервале потенциалов (кривая 2). Это свидетельствует об адсорбции α -липовой кислоты в этом интервале потенциалов. Аналогичное снижение емкости ДЭС медного катода в указанных условиях наблюдается под влиянием растворенного молекулярного кислорода (кривая 3), который не только адсорбируется, но и восстанавливается в том же интервале потенциалов.

Полученные зависимости степени заполнения поверхности электрода α -липовой кислотой от концентрации последней соответствуют изотерме Ленгмюра, которая характерна для адсорбции органических соединений без учета их межмолекулярных взаимодействий [14].

Судя по изотермам адсорбции (рис. 3), степень заполнения электрода α -липовой кислотой Θ не превышает 0,85, что не препятствует адсорбции молекулярного кислорода. Как видно из рис. 2 (кривая 4), емкость ДЭС при совместном присутствии кислорода и α -липовой кислоты в фоновом растворе ниже, чем в присутствии каждого из этих веществ в отдельности, что свидетельствует об их совместной адсорбции.

О взаимодействии АФК и кислорода с α -липовой кислотой дают основание судить следующие данные. Добавка этой кислоты в водный раствор NaCl, содержащий кислород, приводит к пропорциональному ее концентрации снижению предельного тока волны гидроксильных радикалов при $E = -0,2$ В, пероксида водорода при $E = -1,1$ В, а также катодному сдвигу ее потенциала (рис. 1). При этом пик восстановления самого молекулярного кислорода незначительно снижается, а его потенциал также незначительно сдвигается в катодную область. Эти данные свидетельствуют о

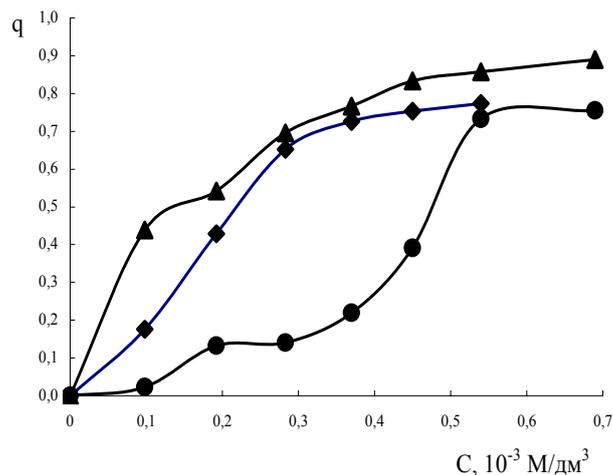


Рис. 3. Изотермы адсорбции α -липовой кислоты на медном катоде при потенциалах: \blacklozenge – $-0,2$ В; \bullet – $-0,6$ В; \blacktriangle – $-1,1$ В в присутствии кислорода

том, что механизм антиоксидантной активности α -липовой кислоты включает антирадикальную и антиокислительную составляющие. Несущественное взаимодействие с молекулярным кислородом говорит о достаточной устойчивости к нему окисленной формы α -липовой кислоты, что служит веским основанием для преимущественного применения именно этой формы в фармакологии [15].

Сопоставлением влияния α -липовой кислоты на волны гидроксильных радикалов и пероксида водорода с изученным ранее [9–11] аналогичным влиянием окисленной формы глутатиона установлено (рис. 4), что действие последнего на указанные волны подобно, однако, начиная с концентрации $0,3 \cdot 10^{-3}$ М/дм³ проявляется значительно сильнее. Это согласуется с литературными данными оценки антиоксидантной активности указанных соединений в биосистемах [1, 15, 16].

Следует отметить, что основная функциональная

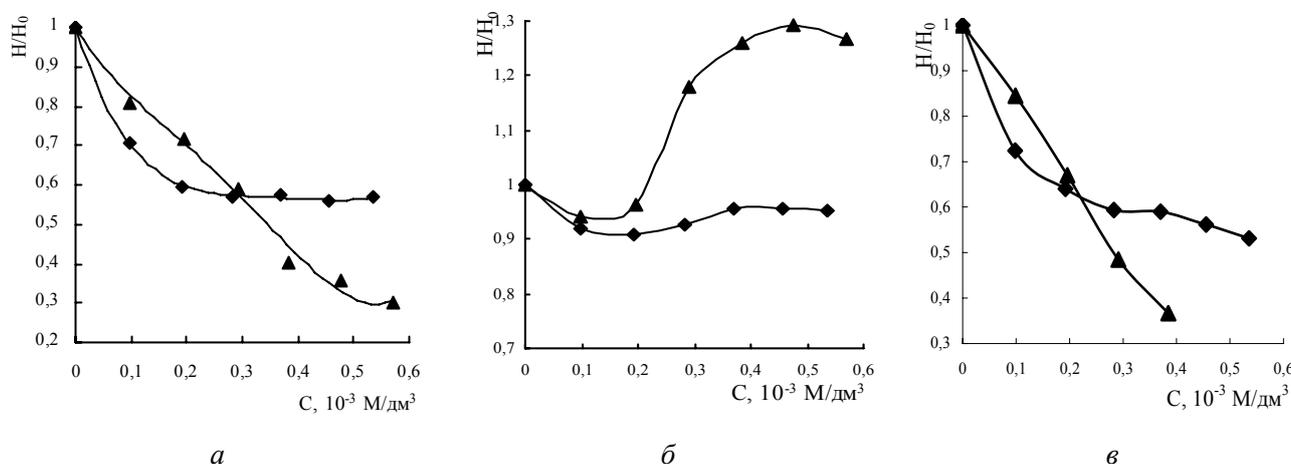


Рис. 4. Изменение относительной высоты волны гидроксильных радикалов (а), волны восстановления кислорода (б) и пероксида водорода (в) при действии: α -липовой кислоты (\blacklozenge) и глутатиона окисленного (\blacktriangle)

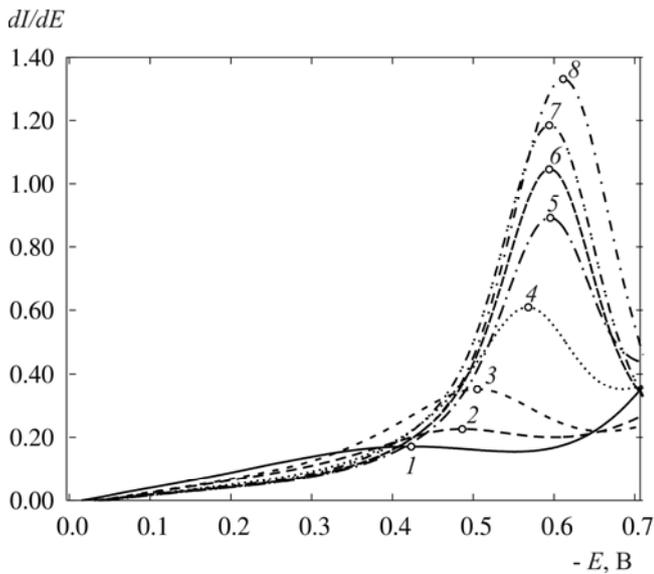
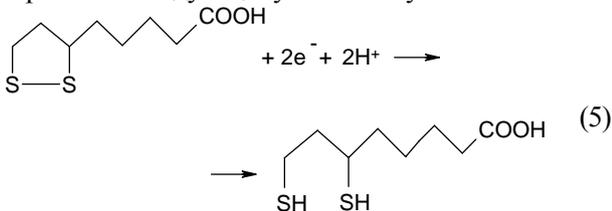


Рис. 5. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления α -липовой кислоты на платиновом катоде при продувке аргоном: 1 – фон; 2 – 0,19; 3 – 0,28; 4 – 0,37; 5 – 0,45; 6 – 0,53; 7 – 0,61; 8 – $0,69 \cdot 10^{-3}$ М/дм³

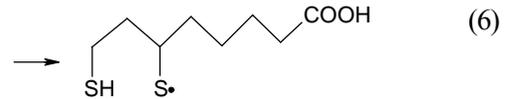
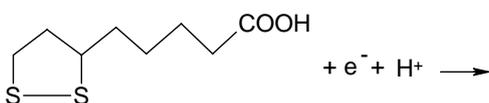
группа α -липовой кислоты, участвующая в окислительных процессах – циклический дисульфид – отличается напряжением кольца, составляющим приблизительно 17 – 25 кДж/моль. Это обусловило его достаточно низкий восстановительный потенциал E_0 , который при pH 7,0 (25 °C) равен -0,3 В [1].

В результате проведенных исследований процесса электрохимического восстановления α -липовой кислоты на платиновом катоде установлено следующее. На фоне обескислороженного 0,1 М водного раствора NaCl α -липовая кислота восстанавливается при потенциале $E = -0,48$ В, давая в импульсном режиме одну, пропорциональную ее концентрации, волну, катодно сдвигающуюся с повышением концентрации деполаризатора (рис. 5), что свидетельствует о полной необратимости процесса восстановления.

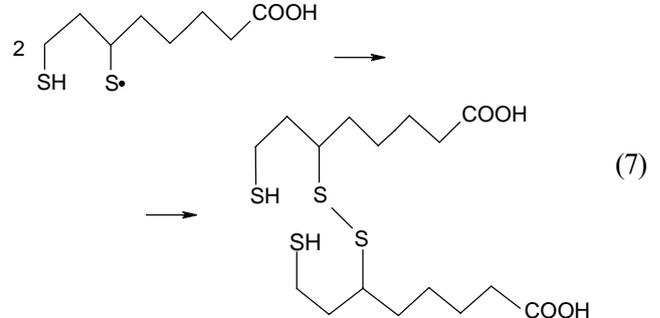
Логично предположить, что электрохимическое восстановление протекает с присоединением двух электронов по следующему механизму:



В то же время, как следует из работы [8], реакция (5) может быть ступенчатой с присоединением одного электрона, образованием одной тиольной группы и S• радикала:



что может сопровождаться последующей димеризацией, как это происходит в биосистемах [8]:



С нашей точки зрения, на платиновом катоде также осуществляется именно одноэлектронное восстановление α -липовой кислоты, которое может сопровождаться не только быстрой химической стадией димеризации продуктов восстановления, но и инициированием реакции полимеризации α -липовой кислоты. Это и является причиной полной необратимости процесса ее электрохимического восстановления.

Для подтверждения сделанного предположения была получена зависимость предельного тока (высоты пика) восстановления от концентрации α -липовой кислоты и окисленного глутатиона на платиновом катоде (рис. 6). Глутатион представляет собой димер трипептида, молекула которого приблизительно втрое более крупная и громоздкая, чем молекула α -липовой кислоты. Это достаточно веское основание для того, чтобы угол наклона кривой зависимости предельного тока от концентрации α -липовой кислоты был значи-

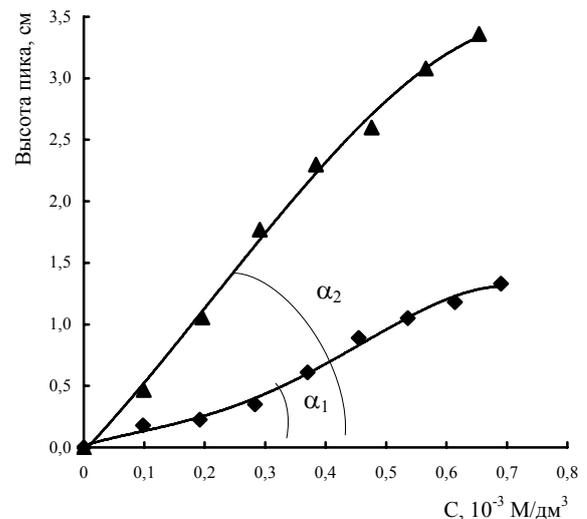


Рис. 6. Зависимость высоты волны восстановления α -липовой кислоты (♦) и глутатиона (▲) от концентрации на платиновом катоде при продувке аргоном

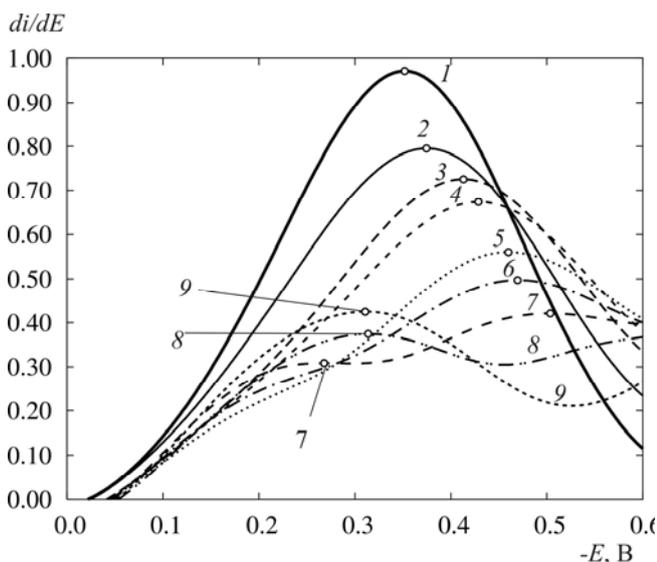


Рис. 7. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления α -липоевой кислоты на платиновом катоде в присутствии кислорода: 1 – фон; 2 – 0,098; 3 – 0,19; 4 – 0,28; 5 – 0,37; 6 – 0,45; 7 – 0,54; 8 – 0,69; 9 – $0,83 \cdot 10^{-3}$ М/дм³

тельно больше угла наклона аналогичной зависимости для глутатиона. Однако, как следует из рис. 6, угол наклона кривой зависимости предельного тока (высоты пика) от концентрации α_2 глутатиона значительно выше, чем α_1 α -липоевой кислоты. Это свидетельствует о том, что восстановление α -липоевой кислоты, очевидно, сопровождается химическим превращением, которое приводит к достаточно высокой скорости исчерпания деполаризатора у поверхности катода, т. е. не только к димеризации, а скорее к инициированию процесса полимеризации.

В присутствии кислорода электрохимическое поведение α -липоевой кислоты выглядит иначе. Ее добавление в насыщенный кислородом раствор фона приводит к снижению предельного тока волны молекулярного кислорода вследствие взаимодействия АФК с α -липоевой кислотой и к появлению при потенциале $E = -0,28$ В волны продукта этого взаимодействия, предельный ток и потенциал которого растет с увеличением концентрации α -липоевой кислоты (рис. 7).

Специфика процессов в биосистемах, в частности в живой клетке, связана с их протеканием на поверхности биомембран. Прогрессивность электрохимического моделирования таких редокс-реакций, кроме всего прочего, состоит в том, что они протекают на электроодной поверхности, на которой может адсорбироваться деполаризатор.

Такая способность α -липоевой кислоты установлена здесь при исследовании ее адсорбции на поверхности платинового катода методом импедансометрии. Так, α -липоевая кислота снижает пропорционально ее концентрации емкость ДЭС платинового электрода в интервале потенциалов $-0,1 - -0,6$ В, т. е. при потен-

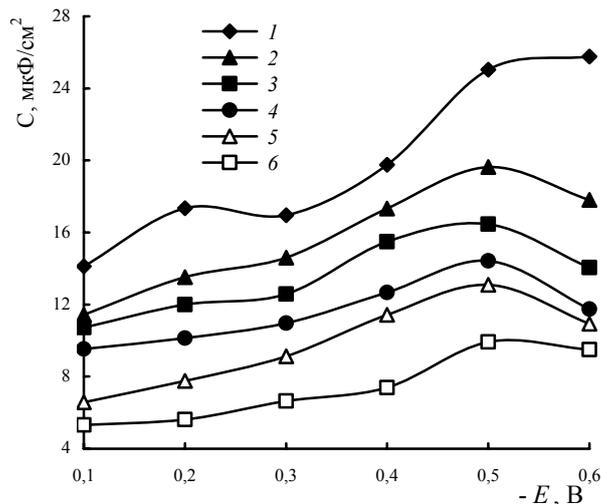
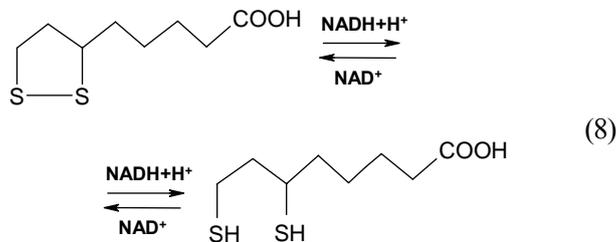


Рис. 8. $C - E$ кривые ДЭС платинового катода на фоне 0,1 М раствора NaCl воде (1) при различных концентрациях α -липоевой кислоты: 2 – 0,098; 3 – 0,19; 4 – 0,37; 5 – 0,54; 6 – $0,83 \cdot 10^{-3}$ М/дм³.

циале восстановления как самой липоевой кислоты, так и кислорода (рис. 8).

По-видимому, наблюдаемые особенности электрохимических реакций с участием α -липоевой кислоты, кислорода и АФК в определенном приближении могут служить моделью редокс-процессов, протекающих в биосистемах с участием NADH и NAD⁺ [7]:



Кроме того, известно, что в биосистемах [17] при совместном применении α -липоевой и аскорбиновой кислоты их антиоксидантное действие усиливается.

В наших экспериментах также наблюдалось значительное усиление антиоксидантного действия α -липоевой кислоты при совместном присутствии с аскорбиновой кислотой. Как видно из рис. 9, при наличии аскорбиновой кислоты под влиянием α -липоевой кислоты предельный ток волны как гидроксильных радикалов, так и пероксида водорода, характеризующих соответственно антирадикальную и антиокислительную активность α -липоевой кислоты, снижается значительно более резко.

Далее мы попытались установить, обладает ли α -липоевая кислота превентивной антиоксидантной активностью по ее взаимодействию с ионами двухвалентного железа [11].

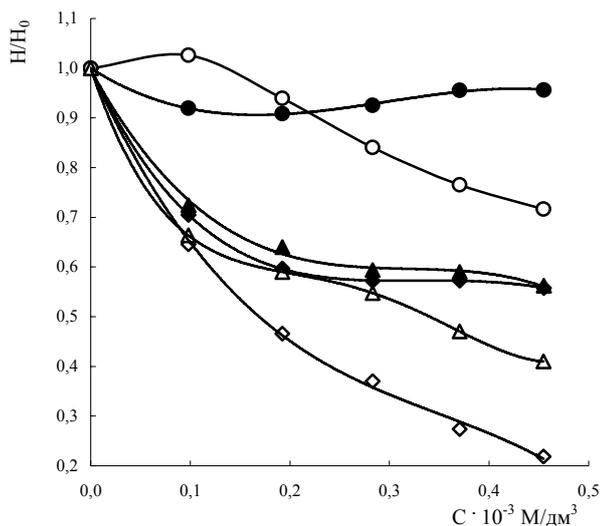


Рис. 9. Зависимость относительной высоты пика: \blacklozenge – первой, \bullet – второй, \blacktriangle – третьей волны от концентрации α -липовой кислоты, то же в присутствии аскорбиновой кислоты в соотношении 2 : 1: \diamond – первая, \circ – вторая, Δ – третья волна

Для этого в водный раствор FeCl_2 на фоне 0,1 М NaCl добавляли раствор α -липовой кислоты. При этом происходят следующие изменения на вольтамперной кривой (рис. 10). Волна двухвалентного железа снижается и сдвигается в отрицательную область потенциала симбатно концентрации α -липовой кислоты, очевидно, в результате ее взаимодействия с двухвалентным железом, т. е. благодаря наличию превентивной антиоксидантной активности. Кроме того, нельзя исключить того, что наблюдаемые изменения вольтамперограмм ионов двухвалентного железа под влиянием α -липовой кислоты могут быть связаны и с образованием ее комплекса с железом.

Интересно отметить, что антиоксидантный эффект α -липовой кислоты в биосистемах связывают именно с ее способностью переводить двухвалентное железо в трехвалентное, что препятствует его участию в процессах пероксидации организма [18], а также со способностью дигидролиповой кислоты хелатировать свободное железо и выводить его таким способом из организма [19].

Проведенные исследования окислительно-восстановительных реакций α -липовой кислоты *in vitro* позволили уточнить на молекулярном уровне и расширить представления о механизме ее антирадикального и антиокислительного действия, а также о способности выступать в роли превентивного антиоксиданта. Полученные данные хорошо согласуются с описанным в литературе действием α -липовой кислоты в биосистемах [1,3,12,15–20], в том числе при ее применении в сочетании с аскорбиновой кислотой.

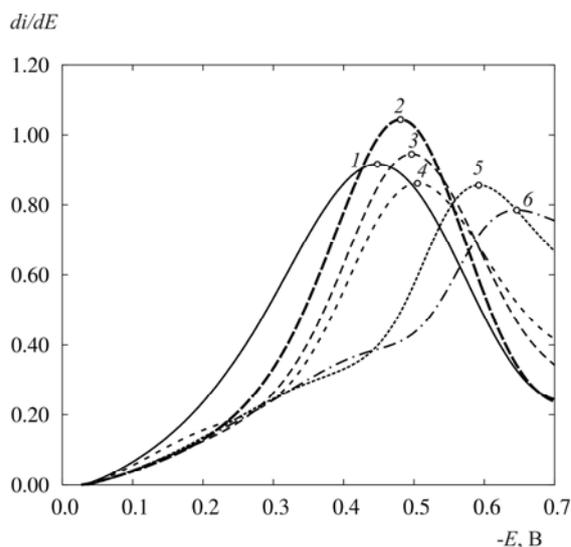


Рис. 10. Дифференциальные вольтамперограммы восстановления на платиновом катоде на фоне 0,1 М раствора NaCl в воде ионов Fe^{2+} (1), $C = 0,57 \cdot 10^{-3}$ М/дм³, при различных концентрациях α -липовой кислоты: 2 – 0,098; 3 – 0,19; 4 – 0,37; 5 – $0,54 \cdot 10^{-3}$ М/дм³

1. Мецлер Д., *Биохимия*, Москва, Мир, 1980, Т.2.
2. Howie J.K., Honts J.J., Sawyer D.T., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99** (19), 6323–6326.
3. Барабой В.А., *Укр. биохим. журн.*, 2005, **77** (3), 20–26.
4. Antonovich M., Prenzler P.D. et al., *Analyst*, 2002, **127**, 183–198.
5. Зиятдинова Г.К., Григорьева Т.Б., Будников Г.К., *Журн. аналит. химии*, 2006, **52** (4), 45–49.
6. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **375** (1), 465–468.
7. Eicher I., Schmidt H.-L., *Biosens. and Bioelectron.*, 2001, (16), 245–252.
8. Krishnan C. V., Garnett M., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2011, (6), 3607–3630.
9. Громова В.Ф., Шаповал Г.С., Миронюк И.Е., *Журн. общей химии*, 2002, **72** (5), 828–831.
10. Шаповал Г.С., Миронюк И.Е., Громова В.Ф., Кругляк О.С., *Катализ и нефтехимия*, 2006, (14), 43–47.
11. Шаповал Г.С., Кругляк О.С., *Журн. общей химии*, 2011, **81** (7), 1092–1099.
12. Pryor W.A., *Free Radicals in Biolodg.*, New York, Academic Press, San Francisco, London, 1976, Vol. 1.
13. Шаповал Г.С., Кругляк О.С., Пуд А.А., *Теорет. и эксперим. химия*, 2011, **47** (4), 229–233.
14. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Батраков В.В., *Адсорбция органических соединений на электродах*, Москва, Наука, 1968.
15. Одинак М.М., Вознюк И.А., Мельникова Е.В. и др., *Consilium Med.*, 2007, **8**, 179–183.
16. Patel M.S., Packer L., *Lipoic Acid: Energy production, Aantioxidant Activity and Health Effects*, CRC Press,

Taylor & Francis Group, New York, 2008.

17. Xu D.P., Wells W.W., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1996, **28** (1), 77–85.

18. Hagen T.M., Ingersoll R.T., Lykkesfeldts J. et al., *FASEB J.*, 1999, **13** (2), 411–418.

19. Biewenga G.P., Haenen G.R., Bast A., *Gen. Pharmacol.*, 1997, **29** (3), 315–319.

20. Ou P., Trirschler H.J., Wolff S.P., *Biochem. Pharmacol.*, 1995, **29** (50), 123–126.

Поступила в редакцію 23.03.2012 з.

Електрокаталітичні реакції α -ліпоєвої кислоти

Г.С. Шаповал¹, О.С. Кругляк¹, Т.І. Мотронюк²

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
Україна, 02094 Київ, вул. Мурманська, 1; факс: (044) 573-25-52

²Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут”

Україна, 03056 Київ, пр. Перемоги, 37; тел.: (044) 241-76-06

Під час дослідження методом диференціальної імпульсної вольтамперометрії на мідному і платиновому електродах реакцій електрокаталітичного окиснення і електрохімічного відновлення α -ліпоєвої кислоти встановлено особливості її антиоксидантної дії. По взаємодії з гідроксильними радикалами і пероксидом водню α -ліпоєвої кислоти визначена її антирадикальна і антиокиснювальна активність, а по взаємодії з іоном двовалентного заліза – превентивна антиоксидантна активність. Встановлено, що електрокаталітичні і електрохімічні реакції α -ліпоєвої кислоти супроводжуються адсорбцією на мідному і платиновому електродах. Показано, що аскорбінова кислота підсилює антиоксидантну дію α -ліпоєвої кислоти.

Electro-catalytic reactions of α -lipoic acid

G.S. Shapoval¹, O.S. Kruglyak¹, T.I. Motronyuk²

¹Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine,
1, Murmanskaya Str., Kyiv, 02094, Ukraine, Fax: (044) 573-25-52

²National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”,
37, Peremogy av., Kyiv, 03056, Ukraine, tel.: (044) 241-76-06

Electro-catalytic oxidation and electrochemical reduction of α -lipoic acid have been studied by differential pulse voltammetry on the copper and platinum electrodes. This allowed estimating the specificity of antioxidant action of this acid. Thus, by its interaction with hydroxyl radicals and hydrogen peroxide its antiradical and antioxidation activity has been determined. In the case of its interaction with Fe²⁺ cations its preventive antioxidation activity has been found. It has been established that the electro-catalytic and electrochemical reactions of α -lipoic acid are accompanied with its adsorption on copper and platinum electrodes. It has been demonstrated that ascorbic acid enhances the antioxidant action of α -lipoic acid.