

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИТАМИНОВ- АНТИОКСИДАНТОВ

Спектры комбинационного рассеяния света (КРС) каждого соединения настолько специфичны, что могут служить для идентификации этого соединения и обнаружения его в клатратных смесях. Предложено изучать структуры веществ в процессе их антиокислительной деятельности по спектрам входящих в них витаминов-антиоксидантов.

Современная медицина использует антиоксиданты для улучшения здоровья человека и профилактики болезней. Свободно-радикальные процессы характеризуются балансом между образованием продуктов перекисного окисления липидов, обладающих мощным повреждающим действием, и защитной системой антиоксидантов, которая ограничивает накопление этих высокотоксичных продуктов. В физиологических условиях функционирование защитных механизмов сводит к минимуму возможность неконтролируемого протекания свободно-радикальных процессов в организме [1].

На биологическое производство свободных радикалов оказывают влияние потребляемая нами пища и состояние окружающей среды. Свободный радикал – это химическое соединение, имеющее один или более неспаренных электронов, образованное в результате либо потери, либо приобретения одного электрона. Неспаренным считается электрон, занимающий в единственном числе молекулярную или атомную орбиталь. Высокая реакционная способность радикалов приводит в физиологических условиях к ускорению процессов окисления, разрушающих молекулярную основу клетки, и вызывает в результате многочисленные патологические состояния.

Соединения, способные связывать частицы, содержащие неспаренные электроны, и образовывать менее активные или вовсе неактивные радикалы, называют антиоксидантами. Антиоксиданты играют важную роль в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в организме,

существенно влияя на его состояние, поэтому исследования антиокислительных свойств соединений в последнее время получили широкое развитие. Наиболее распространенными источниками антиоксидантов считаются растительные объекты [1, 2].

На сегодняшний день существует несколько методов определения активности антиоксидантов. По способам регистрации проявляемой антиокислительной активности можно выделить волюмометрические, фотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные и электрохимические методы. Обычно используют протекающую по радикальному механизму модельную реакцию (чаще всего – окисления) какого-либо индивидуального соединения. По ее влиянию на протекание оценивают антиокислительную активность индивидуального соединения или смеси. Кинетика контролируется либо по поглощению кислорода способами измерения объема, либо по изменению характеристик реакционной смеси – изменению поглощения электромагнитного излучения, флуоресценции, люминесценции и т.д.

Группа молодых ученых университета предлагает использовать для изучения структуры витаминов - антиоксидантов ранее не применявшийся для этих целей метод исследования антиоксидантов – лазерную спектроскопию вынужденного комбинационного рассеяния. С помощью предложенного метода проведен анализ структуры спектров витаминов-антиоксидантов. Метод включает два этапа: компьютерное моделирование колебательных спектров и сравнение с

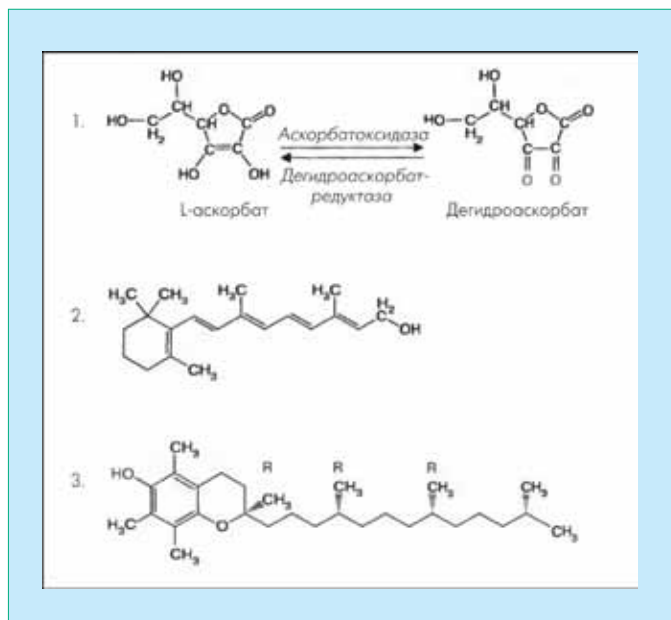


Рис.1 Структурные формулы исследуемых витаминов-антиоксидантов

экспериментальными спектрами комбинационного рассеяния. Моделирование колебательных спектров проводится при помощи входящих в программный продукт HyperChem 6.03 полуэмпирических квантово-химических методов расчета [3]. Экспериментальные спектры комбинационного рассеяния получены в лаборатории КАРС-спектроскопии ВолГУ при помощи импульсного излучения второй гармоники YAG:Nd³⁺-лазера в режиме модуляции добротности [4].

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования выбраны широко распространённые и доступные витамины-антиоксиданты: С, Е, А. Антиоксидантное действие каждого из них изучено в медицине различными способами, а применение спектроскопии вынужденного комбинационного рассеяния в сочетании с компьютерным моде-

лированием позволит более качественно выяснить механизмы действия антиоксидантов. Структурные формулы исследуемых витаминов-антиоксидантов приведены на рис.1.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектральные характеристики антиоксидантов исследованы методом спектроскопии вынужденного комбинационного рассеяния. Несмотря на то, что интенсивность возбуждающего рассеяние излучения достаточно большая (10^{12} Вт/м²), вид регистрируемого спектра не позволяет однозначно утверждать, что происходит именно вынужденное комбинационное рассеяние (ВКР), поэтому корректно будет назвать процесс просто – комбинационным рассеянием света (КРС), в который вносит вклад и вынужденное рассеяние. Комбинационное рассеяние света (КРС) веществом сопровождается заметным изменением частоты рассеиваемого света. Если источник испускает линейчатый спектр, то при КРС в спектре рассеянного излучения обнаруживаются дополнительные линии, число и расположение которых тесно связаны с молекулярным строением вещества. При КРС преобразование первичного светового потока сопровождается обычно переходом рассеивающих молекул на другие колебательные и вращательные уровни, причём частоты новых линий в спектре рассеяния являются комбинациями частот падающего света и частот колебательных и вращательных переходов молекул.

КРС наиболее часто связано с изменением колебательных состояний молекул. Такой спектр состоит из системы спутников (сателлитов), расположенных симметрично относительно возбуждающей линии с частотой ν . Каждому спутнику с частотой $\nu - \nu_i$ (красный, или стоксов, спутник) соответствует спутник с частотой $\nu + \nu_i$ (фиолетовый, или антистоксов, спутник). Здесь ν_i одна из собственных частот колебаний молекулы. Таким образом, измеряя частоты линий КРС, можно

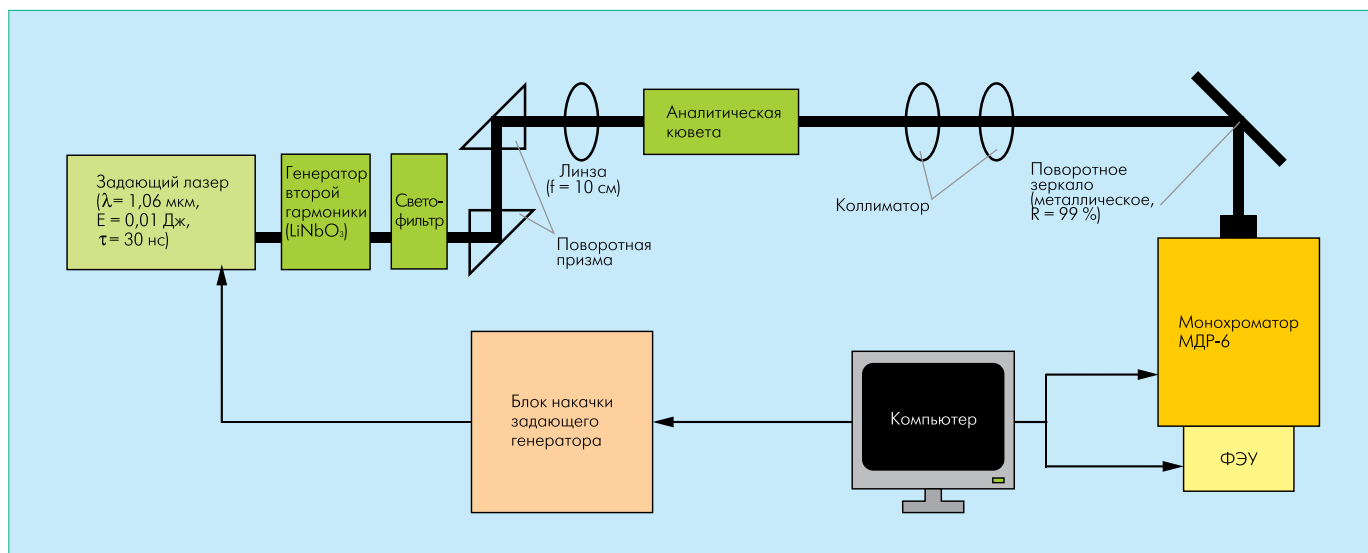


Рис.2 Модель процессов, происходящих в капельной пробе при оседании в ней эритроцитов

определять частоты собственных (или нормальных) колебаний молекулы, проявляющихся в спектре. Аналогичные закономерности имеют место и для вращательного спектра КРС. В этом случае частоты линий определяются вращательными переходами молекул. В простейшем случае вращательный спектр КРС – последовательность почти равноотстоящих симметрично расположенных линий, частоты которых являются комбинациями вращательных частот молекул и частоты возбуждающего света.

Процесс КРС состоит из двух связанных между собой актов – поглощения первичного фотона с энергией $h\nu$ (h – постоянная Планка) и испускания фотона с энергией $h\nu'$ (где $\nu' = \nu \pm \nu_i$), происходящих в результате взаимодействия электронов молекулы с полем падающей световой волны. Молекула, находящаяся в невозбужденном состоянии, под действием кванта с энергией $h\nu$ через промежуточное электронное состояние, испуская квант $h(\nu - \nu_i)$, переходит в состояние с колебательной энергией $h\nu_i$. Этот процесс приводит к появлению в рассеянном свете стоксовой линии с частотой $\nu - \nu_i$. Если фотон поглощается системой, в которой уже возбуждены колебания, то после рассеяния она может перейти в нулевое состояние; при этом энергия рассеянного фотона превышает энергию поглощенного. Этот процесс приводит к появлению антистоксовой линии с частотой $\nu + \nu_i$.

КРС, как и инфракрасная спектроскопия, является эффек-

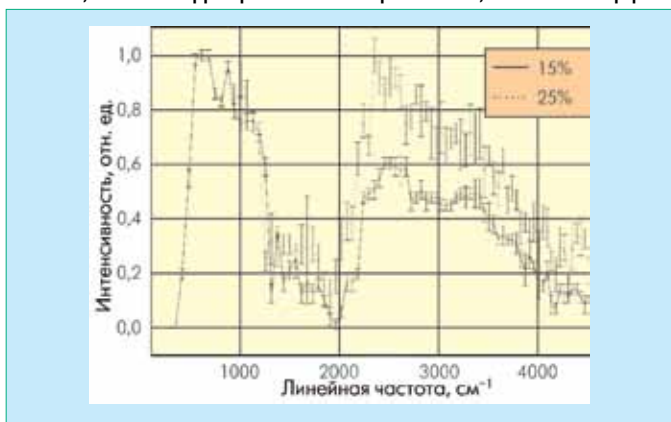


Рис. 3 Спектры раствора витамина С с концентрациями 15% и 25%

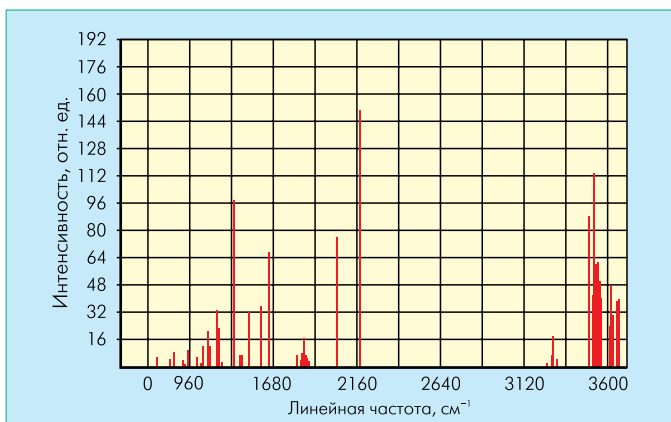


Рис. 4 Рассчитанный спектр 30%-ного раствора витамина С

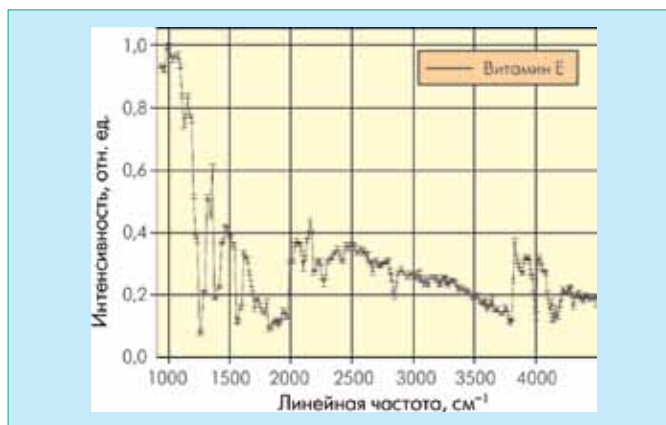


Рис. 5 Экспериментальный спектр КРС 10%-ного раствора витамина Е в растительном масле

тивным методом исследования строения молекул и их взаимодействия с окружающей средой. Существенно то, что спектр КРС и инфракрасный спектр поглощения не дублируют друг друга, поскольку определяются различными правилами отбора. Частоты, а также другие параметры линий КРС во многих случаях сохраняются при переходе от одного соединения к другому, обладающему тем же структурным элементом. Эта так называемая характеристичность параметров линий КРС лежит в основе структурного анализа молекул с неизвестным строением.

Спектры КРС каждого соединения настолько специфичны, что могут служить для идентификации этого соединения и обнаружения его в смесях. Качественный и количественный анализ по спектрам КРС широко применяют в аналитической практике, особенно при анализе смесей углеводов.

Для получения экспериментальных спектров витаминов-антиоксидантов используется излучение импульсного лазера, которое возбуждает вынужденное КРС (ВКР) в кювете с исследуемыми жидкими витаминами-антиоксидантами. Рассеянное кюветой излучение анализируется монохроматором. Затем регистрируются стоксовы компоненты спектров КРС. Из связи частот излучения накачки и стоксовой компоненты определяются частоты характеристических колебаний молекул исследуемых веществ:

$$\nu_{\text{кол}} = \nu_{\text{лаз}} - \nu_s$$

где $\nu_{\text{кол}}$ – частота характеристических колебаний исследуемых веществ, $\nu_{\text{лаз}}$ – частота излучения накачки, ν_s – регистрируемая стоксова частота рассеянного излучения. Все измерения проводились по три раза для каждого типа витамина в диапазоне 540–700 нм.

Для проведения эксперимента использованы растворы антиоксидантов кристаллического витамина С в дистиллированной воде, витаминов Е и А с концентрациями 10% и 4,4% соответственно в растительном масле. Раствор витамина Е состоит из 10% самого витамина и 90% растительного масла. Структурная формула растительного масла очень сложна, и поэтому её учёт при теоретическом расчете спектра колебательных мод проблематичен.

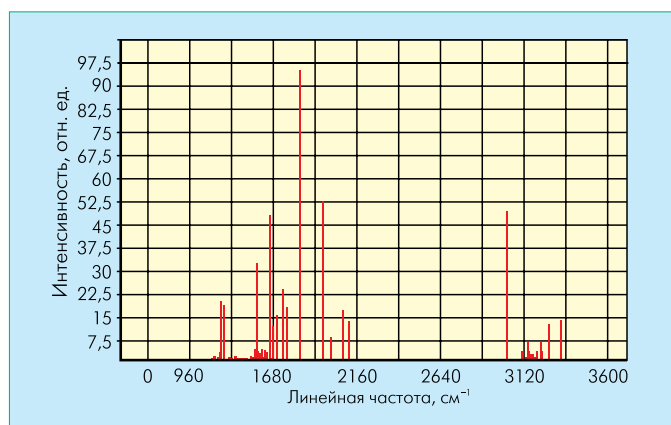


Рис. 6 Рассчитанный спектр колебательных мод витамина Е

Колебательные спектры этих же витаминов промоделированы с помощью пакета прикладных программ HyperChem несколькими полуэмпирическими методами: INDO (Intermediate Neglecting of Differential Overlap), MNDO (Modified INDO), MINDO3 (Modified INDO, version 3), AM1 (является улучшением метода MNDO), PM3 (является версией метода AM1), ZINDO/1 (является вариантом метода INDO) [3]. Для проведения анализа полученные рассчитанные спектры сравниваются с экспериментальными и выбираются только те методы расчета, в которых наблюдается наилучшее совпадение с экспериментальными спектрами. Такой подход дает возможность выбрать наиболее подходящий метод численного расчета.

Определенные характеристические частоты в спектрах соответствуют различным типам связей в молекулярном соединении, а интенсивность линий определяется электрооптическими параметрами молекулы [2].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Для реализации данного метода в лаборатории КАРС-спектроскопии ВолГУ [4] собрана экспериментальная установка (рис.2). Установка состоит из задающего YAG:Nd³⁺-лазера, работающего в режиме гигантского импульса на длине волны 1,0634 мкм, и генератора второй гармоники на термостатированном кристалле LiNbO₃, излучающем на длине волны 531,7 нм.

Система электропитания лазеров включает в себя блок накачки, который питает задающий генератор и управляет лазером. Кроме того, блок накачки задающего генератора формирует напряжения, необходимые для питания внешних устройств, таких как термостат генератора второй гармоники и блок управления затвором задающего лазера. В аналитической кювете проводится возбуждение КРС. Блок регистрации включает в себя монохроматор МДР-6 с компьютерной перестройкой диапазона измерений; ФЭУ, предназначенный для регистрации полученного спектра на выходе монохроматора, а также устройство сопряжения с ПЭВМ.

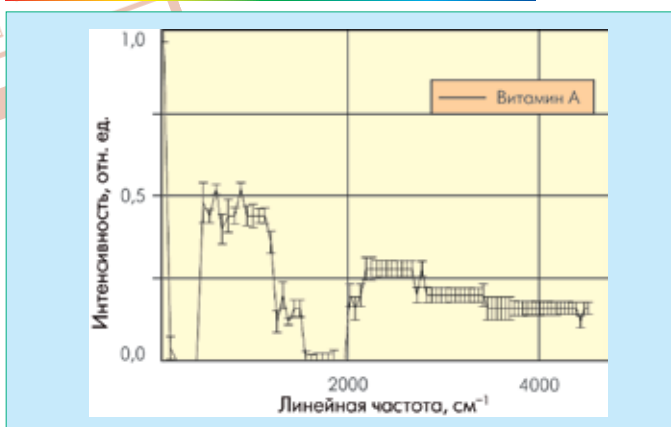


Рис.7 Спектр КРС раствора витамина А

РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя данный метод, получили экспериментальные спектры КРС витаминов-антиоксидантов и их рассчитанные спектры колебательных мод. Интенсивность полос в экспериментальных спектрах нормирована на интенсивность возбуждающего излучения. По шкале абсцисс на рис.3–8 отложены частоты колебательных мод исследуемых веществ, определенные по формуле частоты характеристических колебаний молекул.

На рис.3 представлены экспериментальные спектры колебательных мод 15%- и 25%-ного раствора витамина С. На рис.4 приведен рассчитанный спектр колебательных мод 30%-ного раствора витамина С при помощи метода AM-1, давшего наилучшее совпадение с экспериментом. Видно, что зарегистрированные колебательные спектры, состоящие из широких полос в области $500\text{--}1000\text{ см}^{-1}$, $2100\text{--}3000\text{ см}^{-1}$. Рассчитанные другими методами спектры качественно совпадают с теми, которые представленным на рис.4. Наиболее интенсивная полоса спектра в области 2200 см^{-1} соответствует связи $\text{C}=\text{O}$ в молекулярном соединении [5].

На рисунке 5 и 6 представлены экспериментальный спектр 10%-ного раствора витамина Е в масле и его рассчитанный

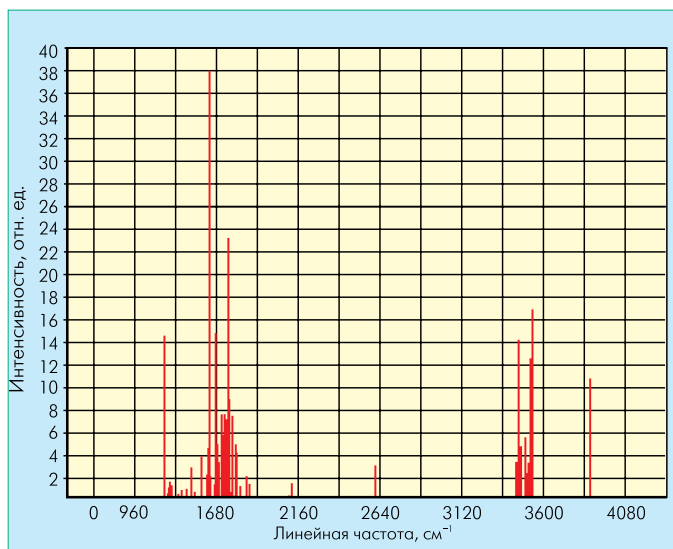


Рис.8 Рассчитанный спектр витамина А

спектр методом AM-1 без растворителя. Видно, что экспериментальный и модельный спектры качественно совпадают. Следует отметить, что экспериментальные спектры имеют полосатую структуру и поэтому при сравнении их с рассчитанными спектрами можно говорить лишь о качественном совпадении. Отметим, что полосы в области $1200\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ и $3100\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ могут соответствовать $\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}\text{--}\text{H}$ связям молекулярных соединений витамина Е [5].

На рис. 7 и 8 представлены экспериментальный спектр 4,4%-ного раствора витамина А в масле и его модельный спектр без растворителя. Рассчитанный спектр витамина А получен методом MNDO, давшем результат, наиболее близко совпадающий с экспериментальным. Отметим, что в области $1000\text{--}1500\text{ см}^{-1}$ и в экспериментальном, и в модельном спектрах обнаружена явно выраженная колебательная полоса. Данная полоса может соответствовать колебаниям $\text{C}\text{--}\text{C}$ связи в молекулярном соединении [5].

Экспериментальные и рассчитанные спектры витаминов-антиоксидантов качественно совпадают. Поэтому сочетание спектроскопии КР и методов моделирования позволяет следить за структурными изменениями веществ в процессе исследования их антиоксидантной активности. Важно отметить аккуратность интерпретации полученных результатов при исследовании сложных молекулярных соединений методом, предложенным в данной работе. Также необходимо учитывать различие между теоретическими и экспериментальными спектрами органических веществ, связанное с уширением регистрируемых полос (влиянием растворителей и не учитываемых более сложных процессов на расплывание полос в спектре требует подробного изучения).

Работа выполнена при финансовой поддержке Волгоградского государственного университета (грант 55-2009-а/ВолГУ). Авторы признательны за помощь в подготовке материалов статьи Е.С. Тюриной и Я.И. Князеву и выражают им благодарность.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Зайцев В.Г.** Моделирование системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов. – Дис. канд. биол. наук. Волгоград, 2001.
2. **Ельяшевич М. А.** Атомная и молекулярная спектроскопия. Изд. 3-е. –М.: КомКнига, 2006.
3. **Кобзев Г.И.** Применение неэмпирических и полуэмпирических методов в квантово-химических расчетах: Учебное пособие. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004.
4. **Храмов В.Н., Куценко С.А., Гладышев Е.С.** Система управления и регистрации лазерного измерительного комплекса «КАРС-спектрометр». – Вестник СПбО АИН, 2008, №5.
5. **Васильев А. В., Гриненко Е. В., Щукин А. О. и др.** Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. –СПб.: СПбГЛТА, 2007.