

УДК 577.3

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ УФ- И ИК-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛ СФИНГОМИЕЛИНА С ФЕНОЛЬНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

К.М. Маракулина, Р.В. Крамор, Ю.К. Луканина, М.В. Козлов, Л.Н. Шишкина

*(Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля РАН; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru)*

Метод изомолярных серий адаптирован для изучения комплексообразования сфингомиелина с фенольными антиоксидантами (изоборнилфенолы различного строения и ионол), а также стехиометрии этого процесса. Показано, что сфингомиелин вступает во взаимодействие с исследованными фенольными антиоксидантами в разных мольных соотношениях, которые определяются структурой фенолов. Анализ изменения ИК-спектров смесей относительно спектров отдельных компонентов показал, что в образовании комплексов участвуют гидроксильная группа фенольных антиоксидантов, гидроксильная, сложноэфирная амидная и холиновая группы сфингомиелина.

**Ключевые слова:** комплексообразование, метод изомолярных серий, сфингомиелин, изоборнилфенолы, ионол.

Поскольку липиды являются чрезвычайно лабильными соединениями и подвергаются окислению не только в биологических, но и в модельных системах, возникает проблема сохранения их нативности и повышения устойчивости к окислению [1]. Как известно, липиды биомембран представлены в основном фосфолипидами (ФЛ), которые организованы в бислои, при этом жирнокислотные хвосты направлены внутрь мембраны, а полярные головки находятся на ее поверхности. Кроме того, ингибирующая эффективность фенольных антиоксидантов (АО) зависит не только от концентрации и физико-химических характеристик АО, но и от их взаимодействия с субстратом окисления [2]. Это в свою очередь требует детального изучения механизма взаимодействия природных и полусинтетических АО с природными ФЛ. Одним из важнейших динамических свойств липидного бислоя является его текучесть, обусловленная способностью отдельных молекул ФЛ перемещаться в пределах одного монослоя, что приводит к быстрой латеральной диффузии [3]. Показано также ассиметричное распределение ФЛ как в биологических, так и в модельных мембранах [4–7]. При этом ФЛ, содержащие холиновую группировку, располагаются преимущественно во внешнем монослое мембраны, а аминофосфолипиды – во внутреннем [5]. Таким образом, сфингомиелин, присутствующий во всех мембранах млекопитающих, локализуется в основном во внешнем монослое мембраны, что делает его одним

из первых участников в реакциях с АО. В качестве АО были исследованы изоборнилфенолы (ИБФ) – перспективные полусинтетические АО, синтезированные на основе лесопромышленных отходов [8]. Выбор ИБФ обусловлен несколькими факторами. Во-первых, ранее для этих соединений в модельной реакции инициированного окисления этилбензола методом поглощения кислорода была показана высокая антирадикальная активность [9]. Для всех исследованных ИБФ стехиометрический коэффициент ингибирования был близок к двум. Во-вторых, для некоторых ИБФ показана биологическая активность [10, 11].

Цель данной работы – исследование комплексообразования между молекулами сфингомиелина и полусинтетическими изоборнилфенолами разного строения, а также изучение стехиометрии этого процесса.

### Материалы и методы

ИБФ были синтезированы сотрудниками Института химии Коми НЦ УрО РАН под руководством чл.-корр. РАН А.В. Кучина методом алкилирования фенолов природным терпеном – камфеном [8, 12, 13] и любезно предоставлены нам для исследований. Для сравнения был выбран ионол (ВНТ) – стандартный липофильный АО из класса пространственно затрудненных фенолов. Объектом исследования служил препарат сфингомиелина (СМ) из мозга быка (Дальневосточный государственный университет, Влади-

восток) в виде хлороформного раствора. Структурные формулы исследованных АО и СМ представлены на рис. 1. Чистоту и фракционный состав препарата СМ контролировали методом тонкослойной хроматографии [14]. Использовали стеклянные пластинки размером 90×120 мм, силикагель типа G («Sigma», США). В качестве подвижной фазы применяли смесь хлороформа, метанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в объемном соотношении 12,5:7,5:2,0:1,0 соответственно. Все растворители характеризовались степенью чистоты либо «х.ч.», либо «ос.ч.» Количественный анализ отдельных фракций ФЛ проводили на фотоэлектроколориметре «КФК-3» (Россия) при  $\lambda = 800$  нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Более подробно методика анализа состава ФЛ представлена в работе [15].

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) определяли методом УФ-спектрофотометрии по отношению значений оптической плотности соответственно при 230 и 270 нм к оптической плотности основного пика [16]. УФ-спектры растворов в кварцевых кюветах ( $l = 10$  мм) регистрировали на

спектрофотометре «UNICO 2800» («UNICO», США). Поскольку СМ плохо растворялся в чистом гексане, на каждые 3 мл раствора добавляли 25 мкл этилового спирта, в кювету сравнения наливали смесь 3 мл гексана и 25 мкл этанола.

ИК-спектры хлороформных растворов как отдельных компонентов, так и их смесей в концентрации  $10^{-2}$  моль/л были сняты на ИК-Фурье-спектрофотометре «Spectrum 100», оптический материал – селенид цинка («Perkin Elmer», Германия).

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [18], а также с помощью пакета программ KINS [19]. Достоверность различий рассчитывали по  $t$ -критерию Стьюдента. Результаты представлены в виде среднеарифметического значения с указанием его среднеквадратичной ошибки.

### Результаты и их обсуждение

По данным тонкослойной хроматографии, партии препарата СМ несколько различаются как по содержанию ФЛ в составе общих липидов, которое варьирует от  $36,1 \pm 2,0$  до  $81,2 \pm 2,2\%$ , так и по коли-

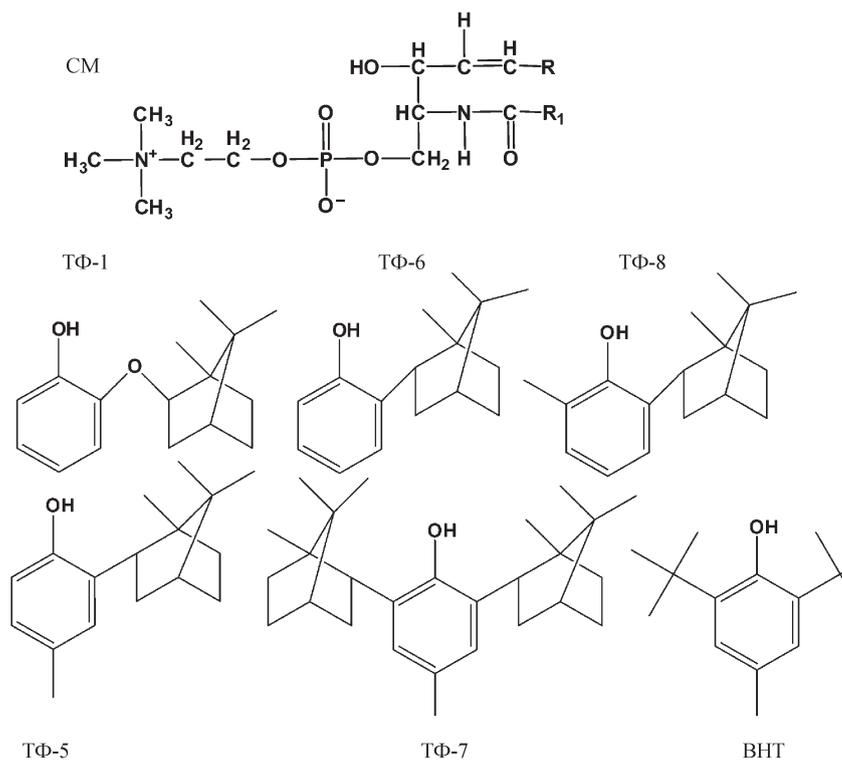


Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений: СМ – сфингомиелин; ТФ-1 – оксиизоборнилфенол; ТФ-5 – 4-метил-2-изоборнилфенол; ТФ-8 – 2-метил-6-изоборнилфенол; ТФ-7 – 4-метил-2,6-диизоборнилфенол; ТФ-6 – 2-изоборнилфенол; ВНТ – 4-метил-2,6-дитретбутилфенол

чественному соотношению фракций ФЛ. Однако СМ является основной фракцией, его доля колеблется от 95,0±0,3 до 97,2±0,5%, в то время как суммарное относительное содержание всех минорных фракций не превышает 3–5% в составе ФЛ в разных партиях препарата СМ.

Как известно, сфингомиелин является одним из самых насыщенных ФЛ, а следовательно и одним из наиболее устойчивых к окислению, поэтому УФ-спектры разных партий препаратов СМ практически идентичны (рис. 2, а). Можно видеть, что в УФ-спектре СМ не выявляются пики в областях ДК и КД, их содержание в относительных оптических единицах составляет 0,0205 и 0,005 соответственно (рис. 2, а). Так как все исследованные фенольные АО в своей структуре имеют гидроксильную группу, бензольное кольцо и насыщенные заместители разной структуры, их УФ-спектры аналогичны и в них наблюдаются пик в области 200–205 нм, плечо в области 235 нм и плато в области 270–280 нм. Типичный УФ-спектр ИБФ на примере ТФ-5 приведен на рис. 3, а.

Процесс комплексообразования между молекулами СМ и фенольными АО, а также его стехиометрию изучали методом изолярических серий, который широко применяется для определения состава окрашенных комплексов с металлом в координационном центре и основан на детектировании изменения оптической плотности серии растворов с постоянной суммарной концентрацией компонентов, но с разным их мольным соотношением [17]. В нашей работе мы также сочли целесообразным адаптировать данный метод для изучения возможности образования комплексов и выявления в них соотношения СМ и АО. Поэтому

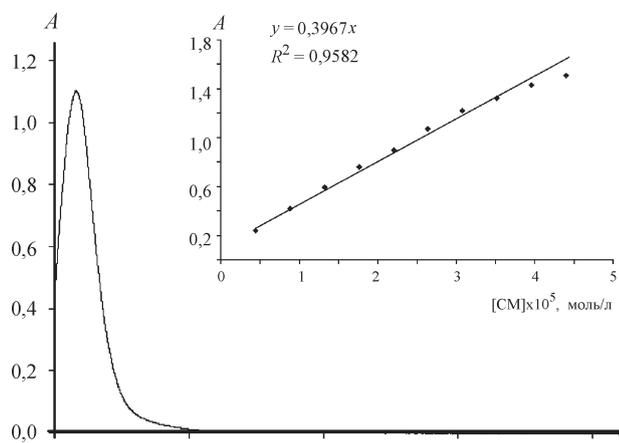


Рис. 2. а – УФ-спектр СМ; б – зависимость оптической плотности раствора СМ от его концентрации в области основного пика ( $l = 10$  мм; диапазон концентраций  $0,44 \times 10^{-5}$ – $4,4 \times 10^{-5}$  моль/л)

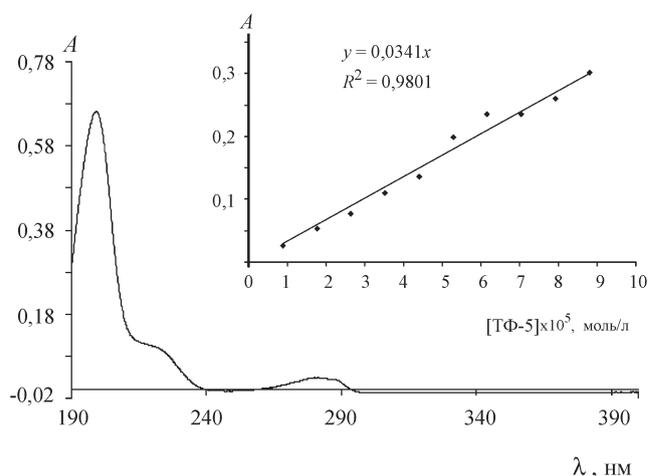


Рис. 3. а – УФ-спектр ТФ-5; б – зависимость оптической плотности раствора ТФ-5 от концентрации раствора в области плато при 275 нм ( $l = 10$  мм, диапазон концентраций  $0,44 \times 10^{-5}$ – $4,4 \times 10^{-5}$  моль/л)

первым этапом работы явилась проверка сохранения закона Бугера–Ламберта–Бера для адекватной интерпретации данных и выбора диапазона концентраций компонентов. В связи с тем, что у фенолов наблюдаются три характерные полосы, сохранение закона Бугера–Ламберта–Бера проверяли для каждой из них. Было обнаружено, что зависимость оптической плотности от концентрации фенола подчиняется закону Бугера–Ламберта–Бера в области плато при 270–280 нм в диапазоне концентраций от  $0,44 \times 10^{-5}$  до  $4,4 \times 10^{-5}$  моль/л. Соответственно все дальнейшие расчеты проводили по отклонению оптической плотности смеси при 270–280 нм (рис. 3, б). Обнаружено, что в данном диапазоне концентраций сохраняется закон Бугера–Ламберта–Бера и для растворов СМ (рис. 2, б). Мы сняли УФ-спектры серии растворов смесей СМ с фенольными АО, взятых в разных мольных соотношениях (от 0:10 до 10:0) и спектры отдельных компонентов во всех исследованных концентрациях. При условии, что между компонентами смеси нет взаимодействия, ее оптическая плотность должна быть аддитивной величиной спектров двух отдельных компонентов в тех же концентрациях. Однако для смесей СМ со всеми исследованными АО имеет место отклонение оптической плотности смеси ( $A_c$ ) от соответствующей величины суммарного спектра ( $\sum A_k$ ), т.е.  $\Delta A = A_c - \sum A_k$ . Данное отклонение свидетельствует о взаимодействии между молекулами СМ и фенольных АО.

Как видно из рис. 4,  $\Delta A$  для смесей СМ с исследованными АО имеет максимумы при разном мольном соотношении компонентов: 9:1 (для смесей СМ с ТФ-6, ТФ-7 и ТФ-8); 6:4 (для смесей СМ с ТФ-5); 8:2 (для смесей СМ с ТФ-1) и 2:8 (для смесей СМ с ВНТ).

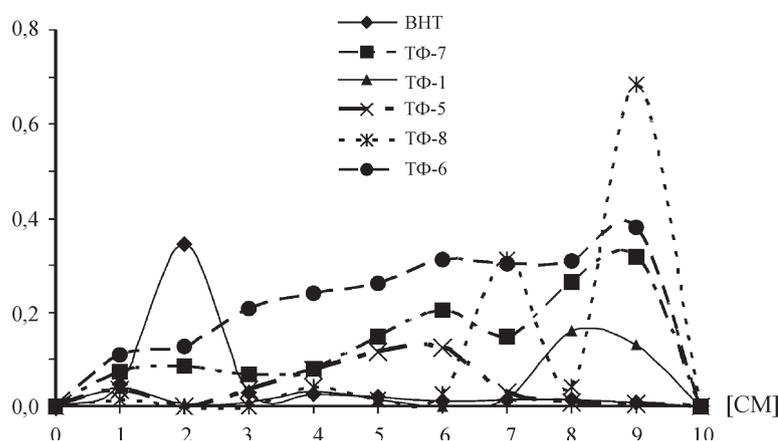


Рис. 4. Изменение отклонения оптической плотности смеси СМ и фенольных антиоксидантов относительно суммы оптических плотностей в УФ-спектрах компонентов ( $\Delta A$ ) в зависимости от их мольного соотношения (диапазон концентраций компонентов  $0,44 \times 10^{-5}$ – $4,4 \times 10^{-5}$  моль/л)

Следует отметить, что для смесей СМ с ТФ-1, ТФ-7 и ТФ-8 наблюдается несколько экстремумов, что свидетельствует о наличии комплексов разного состава. Необходимо отметить, что по сравнению с достаточно сложной зависимостью  $\Delta A$  от соотношения компонентов, выявленной для смесей СМ со всеми исследованными фенолами, подобная зависимость для смесей лецитина имеет более простой характер. Так, ранее было выявлено, что для смесей лецитина (ЛС) со всеми фенольными АО зависимость  $\Delta A$  от соотношения компонентов имеет один выраженный максимум при соотношении ЛС:АО = 6:4 [20]. Кроме того, по уменьшению значения максимального отклонения оптической плотности смеси от плотности суммарного спектра ( $\Delta A_{\text{макс}}$ ) для смесей фосфолипидов с АО последовательности также зависят от природы ФЛ. Так, в случае СМ все фенолы можно расположить в следующей последовательности: ТФ-8 > ТФ-6 > ВНТ > ТФ-7 > ТФ-1 > ТФ-5, а для смесей с лецитином – ТФ-5 > ТФ-1 > ТФ-7 > ВНТ.

Такие отличия взаимодействия СМ и ЛС с АО обусловлены, возможно, тем, что в молекуле фосфатидилхолина, который является основной фракцией лецитина (свыше 86%), остов глицериновый, а в молекуле СМ – сфингозиновый, т.е. в молекуле СМ имеется дополнительная полярная амидная группировка. Различие в структуре исходных ФЛ может оказывать влияние и на их способность к самоорганизации в неполярном растворителе. Действительно, как было показано в работе [21], лецитин и СМ при одинаковой концентрации в гексане образуют мицеллы разного диаметра. Кроме того, процесс самоорганизации лецитина протекает во времени, тогда как при экспозиции раствора СМ в течение трех часов диаметр агре-

гатов существенно не изменяется. Чтобы установить, за счет каких связей происходит взаимодействие между молекулами СМ и АО, были сняты ИК-спектры как отдельных компонентов, так и их эквимольных смесей. Как известно, количественной характеристикой наличия или отсутствия взаимодействия является не только изменение частоты колебаний данной группировки, но и изменение интенсивности данных колебаний. Поэтому в наших исследованиях мы за качественную характеристику участия каких-либо групп в комплексообразовании принимали изменение и частоты, и интенсивности колебаний разных группировок. Как известно, частота валентных колебаний несвязанной гидроксильной группы определяется не только полярностью растворителя, но и структурой молекулы. Так, в ИК-спектрах ТФ-5, ТФ-6, ТФ-7 и ТФ-8, не образующих внутримолекулярную водородную связь, частота валентных колебаний свободной ОН-группы находится в диапазоне частот от  $3597$  до  $3607 \text{ см}^{-1}$ , а в ИК-спектрах ионола, который по кинетическим характеристикам является представителем класса пространственно затрудненных фенолов [1], полоса валентных колебаний гидроксильной группы смещена в сторону больших значений и составляет  $3644 \text{ см}^{-1}$  (рис. 5). В ИК-спектрах ТФ-1, для которого экспериментально показано образование внутримолекулярной водородной связи [9], полоса колебаний ОН-группы обнаружена при  $3543 \text{ см}^{-1}$ . По структуре все исследованные фенолы можно было бы отнести к пространственно затрудненным фенолам, однако, как показано в работе [9], по своим кинетическим характеристикам данные ИБФ могут быть отнесены к пространственно незатрудненным фенолам. Такое заключение сделано авторами работы [9] на основа-

нии аддитивности ингибирующего действия ТФ-7, молекула которого содержит изоборнильные группы в обоих *o*-положениях в смеси с пространственно не-экранированным  $\alpha$ -токоферолом в реакции инициированного окисления этилбензола, а также на основании высоких значений константы скорости ( $k_7$ ) взаимодействия гидроксильной группы данных ИБФ в реакциях с пероксидными радикалами. Как видно из рис. 5, для СМ колебания в этой области частот отсутствуют, что соответствует его химическому составу. Для СМ характерна полоса поглощения связанной гидроксильной группы при  $3300\text{ см}^{-1}$ , что свидетель-

ствует о возможности образования сфингомиелином полиассоциатов. На рис. 5–7 представлены ИК-спектры ТФ-1, ТФ-5, ТФ-7, ВНТ, СМ и смесей СМ с АО в области валентных колебаний ОН-групп АО и СМ, сложно-эфирной амидной и холиновой групп СМ. Как видно из данных, представленных на рис. 5, наименее выраженные изменения интенсивности в ИК-спектрах по сравнению с индивидуальными компонентами наблюдаются в области валентных колебаний ОН-группы АО. При этом необходимо отметить, что практически отсутствуют изменения этого показателя для смеси СМ с ТФ-7 (рис. 5). Ана-

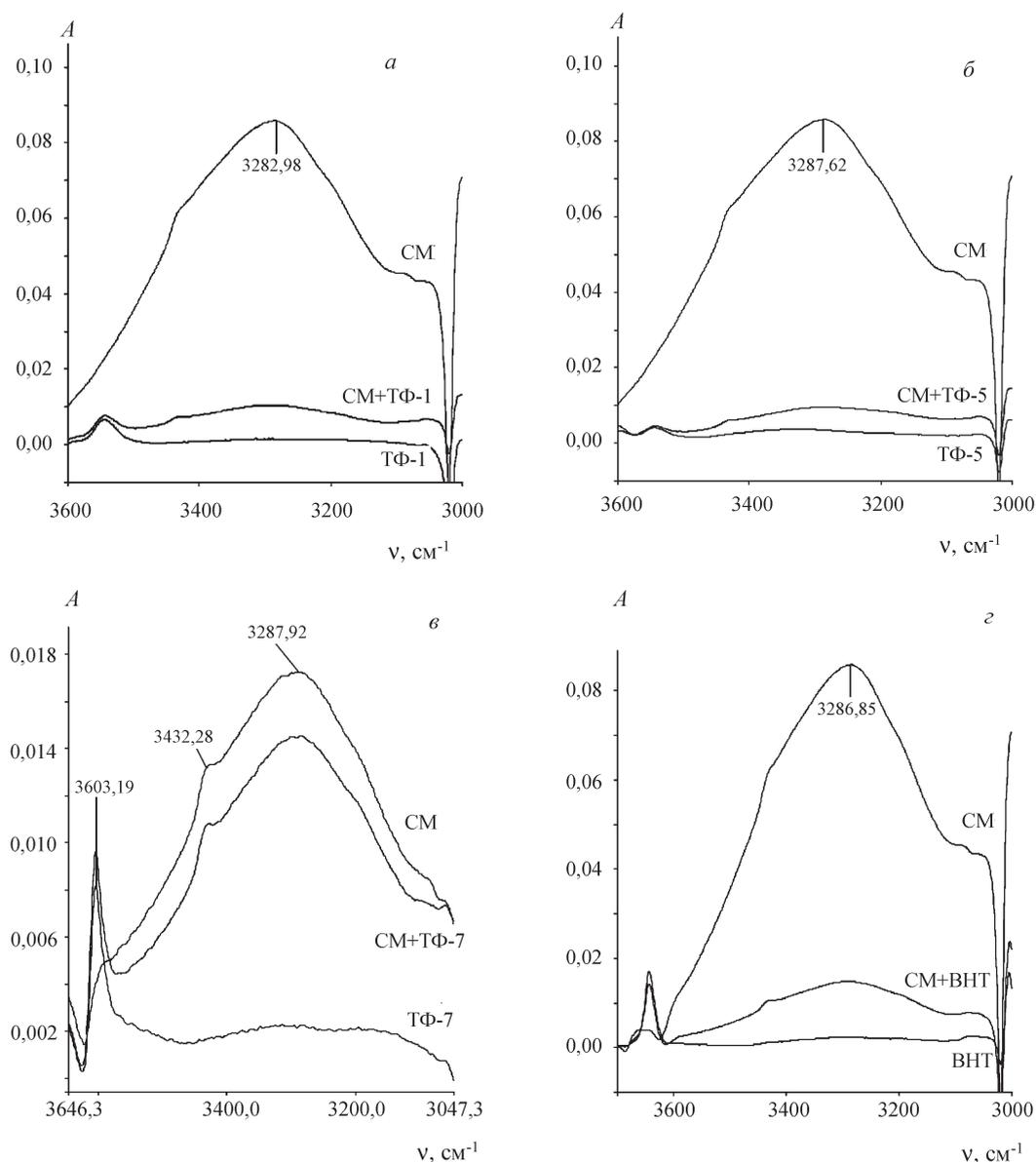


Рис. 5. ИК-спектры исследованных терпенфенолов (а), ионола (б), СМ (в) и их эквимольных смесей (г) в области валентных колебаний ОН-группы (концентрация компонентов  $10^{-2}$  моль/л)

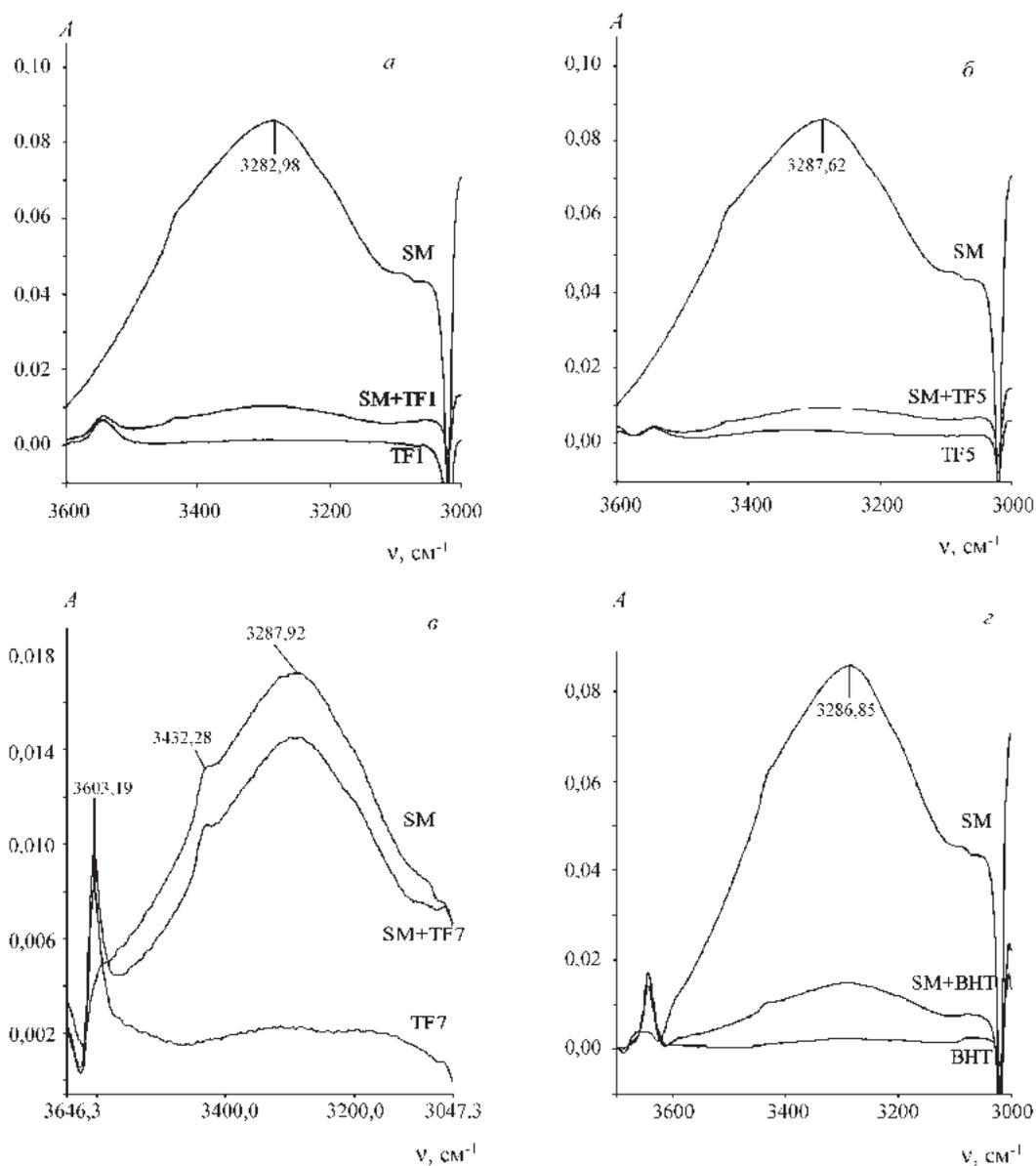


Рис. 6. ИК-спектры исследованных терпенфенолов (а), ионола (б), СМ (в) и их эквимольных смесей (г) в области валентных колебаний сложноэфирной амидной группы (концентрация компонентов  $10^{-2}$  моль/л)

логичный результат обнаружен и для смеси СМ с ТФ-8. Следует заметить, что наибольшие изменения в спектрах смесей относительно спектров индивидуальных компонентов наблюдаются в интенсивности колебаний связанной гидроксильной группы СМ (рис. 5).

В экспериментах со всеми исследованными фенолами интенсивность колебаний данной группировки падает, однако для смесей СМ с ТФ-7 (рис. 5), ТФ-6 и ТФ-8 эти изменения не так существенны как для смесей СМ с другими АО. Это свидетельствует об участии ОН-групп АО в ослаблении межмолекулярной водородной связи в ассоциатах СМ. Частота валентных колебаний сложноэфирной амидной группы СМ

обнаруживается при  $1650\text{ см}^{-1}$  (рис. 6). В присутствии ТФ-1, ТФ-5 и ВНТ наблюдается существенное снижение интенсивности валентных колебаний амидной группы, наличие в смеси ТФ-6 и ТФ-7 (рис. 6) практически не влияет на интенсивность колебаний данной группировки. Интенсивность полосы колебаний смесей СМ с ТФ-8 при частоте  $1650\text{ см}^{-1}$  также снижается, но не столь значительно, как в присутствии ТФ-1, ТФ-5 и ВНТ.

Существенные изменения интенсивности полосы в области  $970\text{ см}^{-1}$  в смесях СМ с фенольными АО (рис. 7) свидетельствуют об участии холиновой группировки СМ в образовании комплексов с изученными АО.

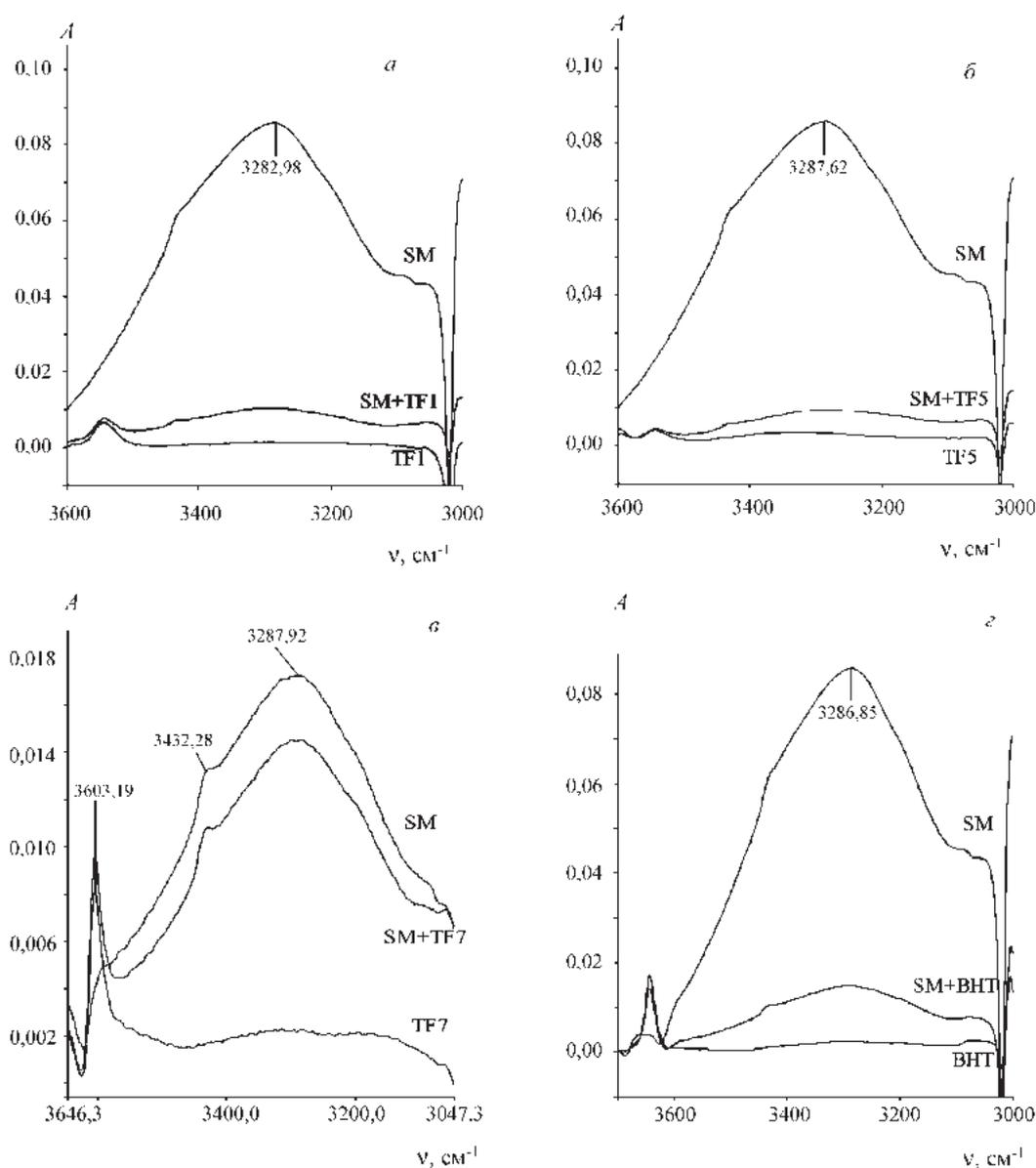


Рис. 7. ИК-спектры исследованных терпенфенолов (а), инола (б), СМ (в) и их эквимольных смесей (г) в области валентных колебаний холиновой группировки (концентрация компонентов 10-2 моль/л)

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что СМ, действительно, образует комплексы с изученными фенольными антиоксидантами, что подтверждено с помощью УФ-спектрофотометрии адаптированным нами методом изомольных серий. Использование ИК-спектроскопии позволило установить, что в образовании комплексов СМ с АО участвуют гидроксильные группы фенолов и СМ, холиновая и сложнэфирная амидная группы СМ. По уменьшению различий в интенсивности всех исследованных частот в ИК-спектрах СМ с АО исследованные соединения располагаются в следующей последовательности: ТФ-5 > ТФ-1 > ВНТ >> ТФ-8 > ТФ-6 ≥ ТФ-7. Стехиометрия комплексов существенно зави-

сит от структуры исследованных АО. Именно ТФ-7, в молекуле которого содержатся две изоборнильные группы в *o*- и *o'*-положениях, а также ТФ-6 и ТФ-8 образуют комплексы со СМ, в составе которых содержится наименьшее количество АО. Эти ИБФ показывают и наименьшие изменения характеристик колебаний функциональных групп, участвующих в комплексообразовании. Наличие комплексов ФЛ с природными и синтетическим фенольными АО показано и в работах [9, 22–24]. Однако представленные в работе данные свидетельствуют о том, что масштаб деформации спектров и соотношение компонентов в комплексе зависят как от природы ФЛ, так и от структуры АО.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эмануэль Н.М., Ляскова Ю.Н. Торможение процессов окисления жиров. М., 1961.
2. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. // Усп. хим. 1985. **54**. С. 1540.
3. Ивков В. Г., Берестовский Т. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
4. Jong K., Ott P. // FEBS. 1993. **112**. N 49. P. 183.
5. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М., 1997.
6. Quinn P.J. // Subcell.Biochem. 2002. **36**. P. 39.
7. Laurinavičius S., Bamford D.H., Somerharju P. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. P. 2568.
8. Чукичева И.Ю., Кучин А.В. // Рос. Хим. Жур. 2004. **48**. № 3. С. 21.
9. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н., Кучин А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю. // Нефтехимия. 2011. **51**. № 5. С. 354.
10. Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2008. **145**. № 3. С. 296.
11. Плотников М.Б., Чернышова Г.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. // Вестн. Рос. АМН. 2009. № 11. С. 12.
12. Чукичева И.Ю., Кучин А.В., Спирихин Л.В., Борбулевич О.Я., Чураков А.В., Белоконь А.И. // Бутлеровские сообщения. 2003. № 1. С. 9.
13. Chukicheva I. Yu., Timusheva I. V., Spirikhin L. V., Kutchin A. V. // Chem. Nat. comp. 2007. **43**. N 3. P. 245.
14. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Финдлея Дж.Б., Эванза У.Г. М., 1990.
15. Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smoytryaeva M.A. // Oxidation Commun. 2001. **24**. N 2. P. 276.
16. Шведова А.А., Полянский Н.Б. // Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*. М., 1992. С. 74.
17. Н.А. Костромина, В.Н. Кумок, Н.А. Скорик. Химия координационных соединений. М., 1990.
18. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1980.
19. Брин Э.Ф., Травин С.О. // Хим. физика. 1991. **10**. № 6. С. 830.
20. Маракулина К.М., Крамор Р.В., Шишкина Л.Н. // Труды X молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗЫ «Биохимическая физика». М., 2010. С. 153.
21. Маракулина К.М., Плащина И.Г., Козлов М.В., Шишкина Л.Н. // Бутлеровские сообщения. 2011. **25**. № 7. С. 96.
22. Шарафутдинова Р.Р., Насибуллин Р.С., Фахретдинова Е.Р. // Химическая физика и мезоскопия. 2008. **10**. № 4. С. 510.
23. Мазалецкая Л. И., Шелудченко Н. И., Шишкина Л. Н. // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. **46**. № 2. С. 148.
24. Keyong Xu, Benguo Liu, Yuxiang Ma, Jiquan Du, Guanglei Li, Han Gao, Yuan Zhang, Zhengxiang Ning // Molecules. 2009. N 14. P. 3486.

Поступила в редакцию 12.01.12

## USE OF THE UV- AND IR-SPECTROSCOPY FOR INVESTIGATION OF COMPLEXATION BETWEEN MOLECULES OF SPHINGOMYELIN AND PHENOLIC ANTIOXIDANTS

K.M. Marakulina, R.V. Kramor, Yu.K. Lukanina, M.V. Kozlov, L.N. Shishkina.

(Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences)

The method of isomolar series was adapted for investigation of phenomenon and stoichiometry of complexation of sphingomyelin with phenolic antioxidants (isobornyl phenols with different structure and ionol). The sphingomyelin is shown to react with phenolic antioxidants at the different molar ratio, which depends on the structure of the phenols. Analysis of changes in the IR-spectra of mixtures with respect to the spectra of individual components revealed that the hydroxyl group of phenolic antioxidants, hydroxyl, ester amide linkage and choline groups of sphingomyelin are involved in the formation of complex.

**Key words:** complexation, method of isomolar series, sphingomyelin, isobornylphenols, ionol.

**Сведения об авторах:** Маракулина Ксения Михайловна – аспирант Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (maksmy@mail.ru); Крамор Руслан Владимирович – мл. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; Луканина Юлия Константиновна – науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. хим. наук; Козлов Михаил Васильевич – науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. биол. наук; Шишкина Людмила Николаевна – зав. лаб. № 0110 Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, докт. хим. наук, профессор.