

УДК 547.22:541.127

СПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРОЦЕССАХ РАДИКАЛЬНО-ЦЕПНОГО ОКИСЛЕНИЯ В АПРОТОННОЙ СРЕДЕ**О.В. Смирнова*, И.В. Ефимова*, Й.А. Опейда***

УФ-спектрофотометрически подтверждено существование восстановленной, окисленной и ионных форм аскорбиновой кислоты в растворах, полученных в результате автоокисления аскорбиновой кислоты в апротонной среде и окисления органического субстрата в присутствии аскорбиновой кислоты. Методом ЯМР-спектроскопии показано, что аскорбиновая кислота в процессе ингибирования радикально-цепного окисления органического субстрата в апротонной среде при температуре 348 К необратимо окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты. Доказано, что дальнейшего окисления дегидроаскорбиновой кислоты с образованием 2,3-дикетоглулоновой кислоты в данных условиях не происходит.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, дегидроаскорбиновая кислота, радикально-цепное окисление, УФ-, ЯМР-спектроскопия.

Вступление

Среди ингибиторов радикально-цепного окисления особый интерес вызывают биоантиоксиданты, ярким представителем которых является аскорбиновая кислота (АК). Биологическая активность АК обусловлена существованием обратимо превращающихся восстановленной, окисленной и ионных форм аскорбиновой кислоты, которые вместе представляют эффективную систему, обладающую высокой витаминной активностью. Нестабильность АК вызывает интерес к ее стабильным аналогам при условии сохранения ими антиоксидантного действия, но введение любых заместителей в структуру АК лишает ее уникальной способности обратимо окисляться до дегидроаскорбиновой кислоты [1,2].

Антиокислительную функцию АК выполняет в водной фазе, что подтверждено многочисленными работами по исследованию ее свойств в водных растворах [3,4], а также в присутствии переходных металлов Fe^{2+} и Cu^{+} [5]. В органических средах наиболее изучено действие АК совместно с липофильными ингибиторами, где она неизменно выступает в роли синергиста [6]. Особый интерес представляют содержащие АК ингибирующие системы, которые обеспечивают возможность регенерации антиоксиданта по циклическому механизму. Обусловленный двойственной реакционной способностью АК (взаимодействие AN_2 и AN^{\cdot} с радикалами ингибитора и рекомбинация анион-радикала аскорбиновой кислоты), циклический механизм обрыва цепей реализуется в системах с токоферолом и глутатионом [7]. Однако особенности участия АК в элементарных реакциях радикально-цепного процесса окисления органических субстратов остаются невыясненными до сих пор.

Необычные биологические свойства АК, направленные на защиту от свободно-радикальной деструкции, скорее всего, связаны с эффективностью АК в качестве ловушки радикалов и стабильностью ее анион-радикала ($A^{\cdot-}$). Анион-радикал аскорбиновой кислоты является основным продуктом при взаимодействии АК с несколькими окислительно-восстановительными системами в протонных средах. Известно, что анион-радикал аскорбиновой кислоты в протонной среде рекомбинирует с образованием дегидроаскорбиновой кислоты и аскорбат-иона, и таким образом прекращает развитие свободно-радикальных реакций [8]. Вместе с тем в апротонных растворителях процесс окисления АК и ингибирование ею окисления других соединений остаются не до конца изученными.

Все биохимические процессы, в которых принимает участие АК, основаны на ее способности обратимо окисляться до дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК). Этим обстоятельством и осложнено изучение антиоксидантных свойств АК в свободнорадикальных процессах окисления, развитие которых протекает как в водной, так и в липидной фазе.

* *Институт физико-органической химии и углекислоты им. Л.М. Литвиненко НАН Украины*

Целью данной работы было доказательство существования восстановленной, окисленной и ионных форм АК в апротонной среде и возможность использования именно апротонных систем в качестве модельных для определения того, как гидрофильная по своей природе АК ведет себя в органической фазе в процессах радикально-цепного окисления.

Экспериментальная часть

УФ-спектроскопическим методом изучены растворы АК в диметилсульфоксиде, воде и кумоле. Исследования проведены на спектрофотометре Specord UV VIS в кюветах $l = 1.0$ см и $l = 0.1$ см при $T = 298$ К. Концентрация АК в диметилсульфоксиде составляла $1.40 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Растворы АК в воде и кумоле получены следующим образом. К смеси кумол – вода [1:1] добавляли необходимое количество АК и инициатора окисления азодиизобутиронитрила (концентрация азодиизобутиронитрила составляла $2.00 \cdot 10^{-2}$ моль/л, аскорбиновой кислоты $5.00 \cdot 10^{-3}$ моль/л, кумола 3.59 моль/л). Полученный раствор интенсивно перемешивали в течении 5 мин и после установления равновесия между фазами отбирали пробы водной и органической фаз для спектрального анализа. Затем на газовольнометрической установке проводили окисление раствора в гетерофазных условиях при температуре 348 К, постоянном парциальном давлении кислорода 760 мм рт. ст., и снова отбирали пробы водной и органической фаз.

ЯМР-спектроскопическим методом идентифицировали продукты иницированного окисления АК кислородом. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на приборе Bruker DRX-400 (100 МГц) в ДМСО- d_6 , используя остаточные сигналы растворителя в качестве внутреннего стандарта (40.0 м. д. для ядер ^{13}C). Окисление АК проводили на газовольнометрической установке в гофазных условиях.

Обсуждение результатов

С целью изучения окисления АК в апротонной среде и образования ее ионных и дегидроформ, нами были проведены УФ-спектроскопические исследования процесса окисления АК в диметилсульфоксиде в присутствии NH_4OH при низких температурах. На рисунке 1 показано изменение спектра поглощения раствора АК в диметилсульфоксиде со временем.

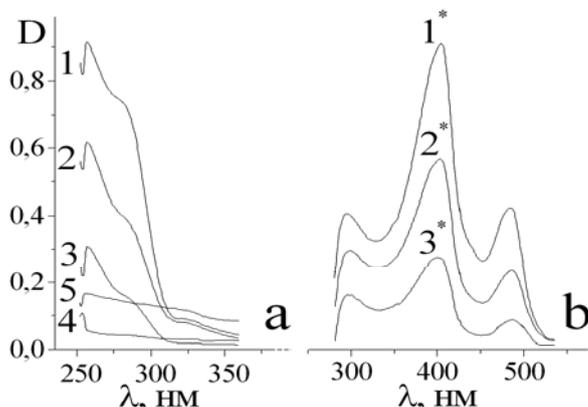


Рисунок 1. Изменение со временем спектра поглощения раствором аскорбиновой кислоты в диметилсульфоксиде:

а – для кюветы с толщиной слоя 1 мм: 1 – 0 ч, 2 – 2 ч, 3 – 4 ч; 4 – 8 ч, 5 – 50 ч;

б – для кюветы с толщиной слоя 1 см: 1* – 50 ч, 2* – 25 ч, 3* – 11 ч.

Наблюдается исчезновение пика в области 253-255 нм примерно в течение 8 - 10 часов (рисунок 1 а). Затем оптическая плотность при этих длинах волн незначительно увеличивается и колеблется в пределах 0.1-0.2, что говорит об обратимости процесса и установлении равновесия. Этот пик характерен для молекулы АК. На рисунке 1 б показан рост трех пиков с изменением времени, которые соответствуют аскорбат-иону AH^- , анион-радикалу $\text{A}^{\cdot-}$ и 2,3-дикетогулоновой кислоте (ДКГК), которая образуется в результате окисления дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК).

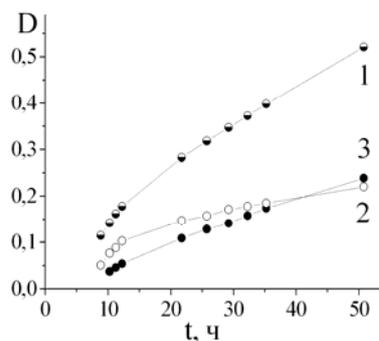
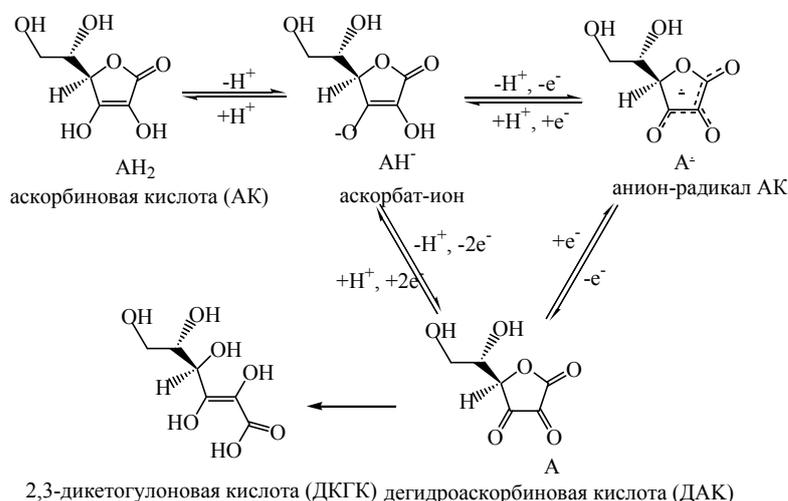


Рисунок 2. Зависимость оптической плотности (D) от времени (t) для частиц, образовавшихся в растворе АК в ДМСО: 1 - AH^- , 2 - $\text{A}^{\cdot-}$, 3 – ДКГК.

При спектрофотометрическом исследовании раствора АК в ДМСО получены зависимости оптической плотности образованных в данном растворе частиц от времени (рисунок 2). Зависимость оптической плотности от времени для анион-радикала АК имеет вид кривой с насыщением, что говорит о протекании обратимого процесса окисления АК до ДАК согласно схеме:



АК, образованные ею промежуточные радикальные частицы и ДАК представляют эффективную редокс-систему, обладающую высокой витаминной активностью. Переход АК в ДАК двухэтапный: на первом этапе из молекула АК (AH_2) образуется аскорбат-ион AH^- , а на втором аскорбат-ион трансформируется в анион-радикал $\text{A}^{\cdot-}$. Далее они диспропорционируют с образованием АК и ДАК [9]. В дальнейшем ДАК необратимо гидролизуется с образованием 2,3-дикетогулоновой кислоты (ДКГК), которая может претерпевать дальнейшие изменения. Система АК биологических объектов обладает витаминными свойствами, но ДКГК, образующаяся из ДАК, уже лишена биологической активности.

Таблица 1. Наблюдаемые формы аскорбиновой кислоты в растворе ДМСО и значения соответствующей им длины волны поглощения (λ).

Частица	λ , нм	
	экспериментальное	литературное [11]
AH_2	253-255	245-265
AH^-	289-291	280
$\text{A}^{\cdot-}$	384-387	360
ДКГК	516-525	520

В таблице 1 представлены наблюдаемые частицы окислительно-восстановительной системы АК, существующей в растворе АК в ДМСО, и приведены соответствующие каждой частице

значения длины волны поглощения. Значение коэффициента экстинкции для АК в водных средах в разных работах варьировалось от 7500 до 16650 л/(моль·см), что объясняется быстрым окислением АК в нейтральных и слабокислых растворах [10]. В УФ-области ДАК имеет максимум поглощения при 220 нм, величина коэффициента экстинкции составляет 720 л/(моль·см). Анион-радикал АК поглощает при 360 нм с коэффициентом экстинкции 3700 л/(моль·см).

В данных условиях АК автоокисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК), которая претерпевает дальнейшее необратимое окисление до 2,3-дикетогулоновой кислоты (ДКГК). Доказано существование в апротонной среде редокс-системы АК, включающей в себя аскорбат-ион AH^- , анион-радикал $\text{A}^{\cdot-}$ и ДАК.

УФ-спектрофотометрическим методом исследованы водная и органическая фазы системы инициированного окисления кумола в воде в присутствии АК. В исследуемых растворах обнаружено несколько форм АК, каждую из которых фиксировали на определенной длине волны поглощения, соответствующей литературным данным [11].

Как показано в таблице 2, распределение АК между органической и водной фазами исследуемой смеси до начала процесса окисления, когда количество АК в реакционной смеси было достаточное (согласно взятой навеске), составляло 15.2 % и 84.8 % соответственно.

Таблица 2. Распределение аскорбиновой кислоты между органической и водной фазами системы инициированного окисления кумола в воде до начала процесса окисления и по окончании.

Частица	λ , нм	Распределение, %	
		Органическая фаза	Водная фаза
AH_2	244-246	15.2	84.8
		43.4*	56.6*
AH^-	289-291	78.3	21.7
		64.4*	35.6*

* - для окисленных растворов

Исследование органической и водной фаз окисленной смеси, когда баланс АК в ней смещен в сторону окисленной формы – ДАК, свидетельствует примерно о равном распределении остаточного количества АК между фазами. Аскорбат-ион большей частью содержится в органической фазе как до начала окисления исследуемой системы, так и после. Важно отметить тот факт, что подобное соотношение для форм АК при распределении между фазами сохраняется во всем рабочем диапазоне концентраций АК (0.0001-0.01 моль/л) в исследуемой смеси.

В рамках поставленной задачи ЯМР-спектроскопическим методом идентифицированы продукты инициированного окисления АК в апротонной среде. В таблице 3 приведены данные по ^{13}C ЯМР спектрам АК, ДАК и ДКГК [12], а также исследуемого раствора до окисления (исходная АК) и окисленного раствора (продукт). Как видно из таблицы 3, полученный в ходе эксперимента продукт имеет схожие химические сдвиги с ДАК, предполагая аналогичную структуру. Таким образом, доказано, что в данных условиях АК окисляется только до ДАК.

Таблица 3 Данные по ^{13}C ЯМР спектрам L-аскорбиновой кислоты (L-АК), L-дегидроаскорбиновой кислоты (L-ДАК) и дикетогулоновой кислоты (ДКГК), а также исследуемой системы до окисления (исходная АК) и окисленной системы (продукт)

Вещество	Химические сдвиги, δ , м. д.					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
АК	170.6	117.9	152.9	74.8	68.3	61.9
исходная АК	170.68	117.23	152.95	74.59	68.31	61.95
ДАК	173.6	91.4	105.7	87.6	73.0	76.2
ДКГК	174.5	94.7	94.4	74.6	68.6	62.5
Продукт	171.28	92.21	102.97	84.59	69.78	75.15

Изучение инициированного АИБН окисление АК в апротонной среде при температуре 348 К показало, что единственным продуктом окисления является ДАК, дальнейшее окисление ДАК в данных условиях не происходит.

Выводы

В данной работе спектрально подтверждено образование и существование окисленной, восстановленной и ионных форм АК в апротонной среде и значения длинны волны поглощения этими частицами согласуются с литературными данными. Показано, что в условиях эксперимента АК выполняет антиоксидантную функцию, окисляясь при этом до ДАК. На основании полученных результатов спектрального исследования доказана возможность существования окислительно-восстановительной системы АК не только в водных растворах, но и в органической среде. Таким образом, АК выполняет антиоксидантные функции не только в водной среде, как принято считать, но и в органической фазе.

Для дальнейшего изучения антиоксидантных свойств АК целесообразно исследовать радикально-цепные окислительные процессы органических гидрофобных субстратов ингибированные АК в апротонной среде, где реализуются гомофазные условия проведения эксперимента.

Литература

1. Yamamoto I., Tai A., Fujinami Y., Sasaki K., Okazaki S. Synthesis and Characterization of a Series of Novel Monoacylated Ascorbic Acid Derivatives, 6-O-Acyl-2-O-r-D-glucopyranosyl-L-ascorbic Acids, as Skin Antioxidants // *J. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 45. – P. 462-468.
2. Nielsen J. H., Kristiansen G. H., Andersen H. J. Ascorbic Acid and Ascorbic Acid 6-Palmitate Induced Oxidation in Egg Yolk Dispersions // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48. – P. 1564-1568.
3. Skrovankova S., Mlcek J., Sochor J., Baron M., Kynicky J., Jurikova T. Determination of Ascorbic Acid by Electrochemical Techniques and other Methods // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2015. – Vol. 10. – P. 2421-2431.
4. Wang Y.-N., Lau K.-Ch., Lam W. W. Y., Man W.-L., Leung Ch.-F., Lau T.-Ch. Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Ascorbic Acid in Aqueous Solutions by a trans-Dioxoruthenium(VI) Complex // *Inorg. Chem.* – 2009. – Vol. 48. – P. 400-406.
5. Uluata S., McClements D.J., Decker E.A. How the multiple antioxidant properties of ascorbic acid affect lipid oxidation in oil-in-water emulsions // *J. Agric. Food Chem.* – 2015. – Vol. 63. – P. 1819-1824.
6. Bradshaw M. P., Prenzler P. D., Scollary G. R. Ascorbic Acid-Induced Browning of (+)-Catechin In a Model Wine System // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – Vol. 49. – P. 934-939.
7. Jayasinghe C., Gotoh N., Wada S. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 141. – P. 3077-3084.
8. Liao M.-L., Seib P. A. Chemistry of L-ascorbic Acid Related to Foods // *Food Chem.* – 1988. – Vol. 30. – P. 289-312.
9. Retsky K.L. Freeman M.W., Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 1304-1309.
10. Yuan J.-P., Chen F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution // *J. Agric. Food Chem.* - 1998. - Vol. 46, №12. - P. 5078-5082.
11. Рудакова Л.В., Савушкин Р.В., Хрипушин В.В., Селеменев В.Ф. Многопараметрическая оптимизация состава смешанных растворителей для экстракции и спектрофотометрического определения аскорбиновой и никотиновой кислот // *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация.* - 2008. - № 1. - С. 32-36.
12. Dabbagh H. A., Azami F., Farrokhpour H. Y., Chermahini A. N. UV-vis, NMR and FT-IR spectra of tautomers of vitamin C. Experimental and DFT calculations. // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 59. – P. 2588-2594.

References

1. Yamamoto I., Tai A., Fujinami Y., Sasaki K., Okazaki S. Synthesis and Characterization of a Series of Novel Monoacylated Ascorbic Acid Derivatives, 6-O-Acyl-2-O-r-D-glucopyranosyl-L-ascorbic Acids, as Skin Antioxidants // *J. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 45. – P. 462-468.
2. Nielsen J. H., Kristiansen G. H., Andersen H. J. Ascorbic Acid and Ascorbic Acid 6-Palmitate Induced Oxidation in Egg Yolk Dispersions // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48. – P. 1564-1568.

3. Skrovankova S., Mlcek J., Sochor J., Baron M., Kynicky J., Jurikova T. Determination of Ascorbic Acid by Electrochemical Techniques and other Methods // Int. J. Electrochem. Sci. – 2015. – Vol. 10. – P. 2421-2431.
4. Wang Y.-N., Lau K.-Ch., Lam W. W. Y., Man W.-L., Leung Ch.-F., Lau T.-Ch. Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Ascorbic Acid in Aqueous Solutions by a trans-Dioxoruthenium(VI) Complex // Inorg. Chem. – 2009. – Vol. 48. – P. 400-406.
5. Uluata S., McClements D.J., Decker E.A. How the multiple antioxidant properties of ascorbic acid affect lipid oxidation in oil-in-water emulsions // J. Agric. Food Chem. – 2015. – Vol. 63. – P. 1819-1824.
6. Bradshaw M. P., Prenzler P. D., Scollary G. R. Ascorbic Acid-Induced Browning of (+)-Catechin In a Model Wine System // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – P. 934-939.
7. Jayasinghe C., Gotoh N., Wada S. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions // Food Chem. – 2013. – Vol. 141. – P. 3077-3084.
8. Liao M.-L., Seib P. A. Chemistry of L-ascorbic Acid Related to Foods // Food Chem. – 1988. – Vol. 30. – P. 289-312.
9. Retsky K.L. Freeman M.W., Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification // J. Biol. Chem. - 1993. - Vol. 268. - P. 1304-1309.
10. Yuan J.-P., Chen F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution // J. Agric. Food Chem. - 1998. - Vol. 46, №12. - P. 5078-5082.
11. Rudakova L.V., Savushkin R.V., Khripushin V.V., Selemenev V.F. Multiparameter optimization of a composition of the mixed solvents for extraction and spectrophotometric definitions of ascorbic and nicotinic acids. // Proceeding of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. - 2008. - № 1. - P. 32-36.
12. Dabbagh H. A., Azami F., Farrokhpour H. Y., Chermahini A. N. UV-vis, NMR and FT-IR spectra of tautomers of vitamin C. Experimental and DFT calculations. // J. Chil. Chem. Soc. – 2014. – Vol. 59. – P. 2588-2594.

Поступила до редакції 11 квітня 2017 р.

О.В. Смирнова, І.В. Єфімова, Й.О. Опейда. Спектральне дослідження форм аскорбінової кислоти в процесах радикально-ланцюгового окиснення в апротонних середовищі.

УФ-спектрофотометрично підтверджено існування відновленої, окисленої та іонних форм аскорбінової кислоти в розчинах, отриманих в результаті автоокиснення аскорбінової кислоти в апротонному середовищі і окиснення органічного субстрату в присутності аскорбінової кислоти. Методом ЯМР-спектроскопії показано, що аскорбінова кислота в процесі інгібування радикально-ланцюгового окиснення органічного субстрату в апротонному середовищі при температурі 348 К необоротно окиснюється до дегідроаскорбінової кислоти. Доведено, що подальшого окиснення дегідроаскорбінової кислоти з утворенням 2,3-дикетоглунової кислоти в даних умовах не відбувається.

Ключові слова: аскорбінова кислота, дегідроаскорбінової кислота, радикально-ланцюгове окиснення, УФ-, ЯМР-спектроскопія.

O.V. Smirnova, I.V. Efimova, I.O. Opeida. Spectral study of ascorbic acid forms in radical chain oxidation processes in aprotic medium.

UV-spectrophotometrically confirmed the existence of reduced, oxidized and ionic forms of ascorbic acid in solutions obtained as a result of auto-oxidation of ascorbic acid in aprotic medium and oxidation of organic substrate in the ascorbic acid presence. NMR spectroscopy showed that ascorbic acid during the inhibition of radical chain oxidation of an organic substrate in the aprotic medium at 348 K irreversibly oxidizes to dehydroascorbic acid. It has been proved that further dehydroascorbic acid oxidation with the 2,3-diketogulonic acid formation does not occur under these conditions.

Keywords: ascorbic acid, dehydroascorbic acid, radical chain oxidation, UV, NMR spectroscopy.