

Вольтамперометрическое исследование каталитических redox-процессов с участием аминокислот

Г.С. Шаповал, И.Е. Миронюк, В.Ф. Громова, О.С. Кругляк

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

Методами импульсной вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса исследованы redox-процессы с участием кислорода и ряда протеиногенных аминокислот на медном катоде. Показано, что аспарагиновая и глутаминовая кислоты и в меньшей степени их амиды благодаря адсорбции на медном электроде оказывают каталитическое действие на восстановление кислорода. Высказано предположение об образовании комплекса этих аминокислот с кислородом как механизме этого влияния.

Введение

Каталитические процессы электронного переноса (ЭП) в биосистемах представляют значительный интерес для изучения из-за их уникальной эффективности, связанной с высокой специфичностью ферментов-катализаторов. Как правило, процесс ЭП происходит на заряженной поверхности биомембраны, служащей матриksom для ферментов электронпереносящей цепи [1]. Изменение поверхностного заряда мембраны может регулировать активность ферментов и, следовательно, скорость ЭП [2].

Электронный перенос является либо стартовой, либо промежуточной реакцией в цепочке redox-процессов, которые в зависимости от природы задействованных субстратов могут приводить к образованию как продуктов нормальной жизнедеятельности организма, так и к патогенным соединениям, атакующим и повреждающим белковые молекулы, биомембраны клетки.

Изучение механизмов ЭП в биосистемах, в которых этот каталитический процесс сопровождается быстрыми химическими превращениями, такими, как перенос протонов и других ионов, связывание лигандов при комплексообразовании, изменение структуры белковых молекул, – задача очень трудная и не всегда разрешимая. В то же время электрохимические методы исследования позволяют напрямую получать информацию об ЭП между электродом и исследуемым объектом, что облегчает понимание механизмов этого процесса. Поэтому для изучения каталитических процессов ЭП в биосистемах успешно используют их моделирование в условиях электрохимической ячейки с участием фрагментов белковых молекул и известных redox-агентов с постепенным усложнением и приближением исследуемых систем к живым организмам.

Известно [1, 3], что некоторые из аминокислот (АК) – простейших фрагментов белковых молекул – сами участвуют в процессах ЭП на отрицательно заряженных клеточных мембранах.

С этой точки зрения чрезвычайно перспективным является изучение электрохимического поведения в

отрицательной области потенциалов систем, содержащих АК и кислород, ступенчатое восстановление которого позволяет получать активные интермедиаты, способные взаимодействовать с биомакромолекулами, а метод вольтамперометрии – фиксировать эти интермедиаты. Процесс ЭП электрод-кислород протекает на поверхности электрода подобно тому, как это происходит *in vivo* на поверхности биомембран. Поэтому одним из условий корректности моделирования каталитического ЭП является адсорбция участников redox-реакций.

Исходя из этих представлений, мы исследовали электрохимическими методами процесс взаимодействия некоторых протеиногенных АК с продуктами восстановления кислорода, а также их адсорбцию на поверхности медного катода.

Материалы и методы исследования

Для изучения были взяты α -АК L-ряда: аспарагиновая (Asp) и глутаминовая (Glu) кислоты, играющие важную роль в процессе электронного транспорта через клеточные мембраны [3–5], их амиды (Asn, Gln), а также АК с короткой боковой цепью, играющие преимущественно структурную роль в белках: глицин (Gly), аланин (Ala).

Их способность к адсорбции на отрицательно заряженной поверхности изучали методом спектроскопии электрического импеданса с помощью универсальной системы ACM Instruments Auto по 3-электродной схеме на фоне 0,1 М NaCl по методике, описанной в [6]. В качестве рабочего электрода использовали медный торцевой электрод, вспомогательным электродом служила платиновая пластина, потенциал (-0,2 – -1,3 В) задавали относительно хлорсеребряного электрода сравнения.

Значение дифференциальной емкости двойного электрического слоя (ДЭС) $C_{дэс}$ рассчитывали в приближении последовательно-параллельной эквивалентной схемы электролитической ячейки по формуле

$$C = \text{Im}(Z) / [2\pi f (\text{Im}(Z)^2 + (\text{Re}(Z) - R_э)^2)],$$

где $\text{Re}(Z)$ и $\text{Im}(Z)$ – активная и емкостная части импеданса; f – частота; $R_э$ – параметр, соответствующий

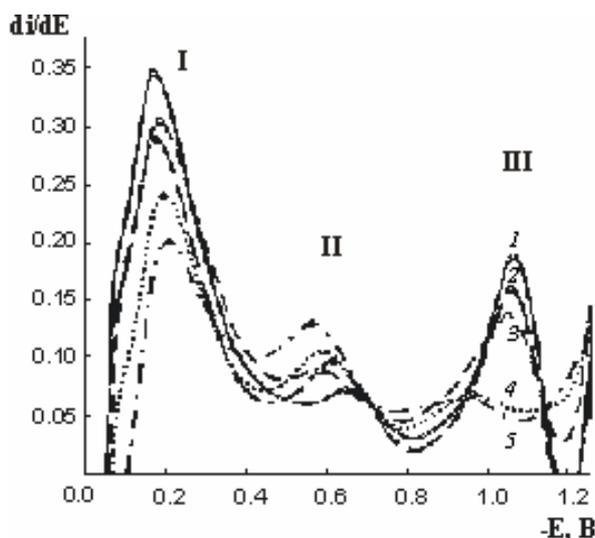


Рис. 1. Хроновольтамперограмма восстановления кислорода на медном электроде в фоновом растворе 0,1 М NaCl (I) и при наличии Asp: 2 – $2,0 \cdot 10^{-4}$; 3 – $4,8 \cdot 10^{-4}$; 4 – $7,1 \cdot 10^{-4}$; 5 – $9,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, I–III – волны восстановления кислорода

активному сопротивлению электролита, который определяли как $R_{\infty} = \text{Re}(Z)_{f \rightarrow \infty}$. Измерения проводили в области частот 400 Гц–30 кГц.

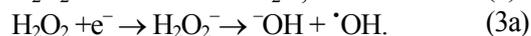
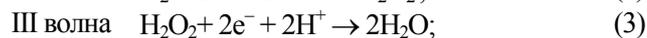
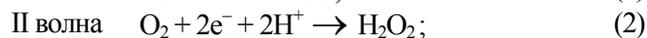
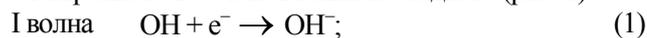
Величину степени заполнения электрода Θ рассчитывали по классической модели параллельных конденсаторов [7]:

$$\Theta(c_k) = (C_{\phi} - C(c_k)) / (C_{\phi} - C_{\infty}),$$

где c_k – концентрация исследуемого вещества; $C(c_k)$ – емкость при концентрации c_k ; C_{ϕ} – емкость фона; C_{∞} – экстраполированное значение емкости при бесконечно большой концентрации исследуемого вещества.

Вольтамперное исследование АК проводили с помощью полярографа ПУ-1 в той же 3-электродной ячейке по разработанной нами и ранее опубликованной методике [8, 9].

При электрохимическом восстановлении кислорода на медном электроде в специальном режиме на вольтамперной кривой можно выделить волну восстановления кислорода до пероксида водорода, волну восстановления пероксида водорода, а также волну гидроксильных радикалов, образующихся в процессе одноэлектронного восстановления последнего (рис. 1).



Изменение предельного тока и потенциалов соответствующих волн при добавлении в фоновый раствор АК позволяет оценивать взаимодействие последних с интермедиатами восстановления кислорода. Концентрация кислорода в исследуемом растворе соответствовала равновесной при атмосферном давлении и температуре 20 °С.

Влияние добавки $9 \cdot 10^{-4}$ моль/л аминокислот на параметры вольтамперограмм восстановления кислорода на медном катоде и снижение его дифференциальной емкости при потенциале максимальной адсорбции $E = -0,3$ В

Аминокислота	Относительная величина предельного тока волн восстановления кислорода			$\Delta E_{II} = E - E_0$, мВ	$\Delta C = C - C_{\phi_2}$, мкФ/см ²	рН
	I	II	III			
Gly	1,00	1,02	0,95	0	4,6	6,7
Ala	0,95	1,04	0,90	0	1,7	6,7
Asn	1,25	1,23	0,72	30	3,3	7,6
Gln	1,18	1,25	0,84	30	4,5	7,6
Asp	0,84	1,95	0,37	140	3,9	3,55
Glu	0,85	1,9	0,45	150	2,4	3,85

Примечание. $\Delta E_{II} = E - E_0$ – сдвиг потенциала II волны восстановления кислорода; $\Delta C = C - C_{\phi}$ – изменение дифференциальной емкости медного катода относительно фонового значения C_{ϕ} .

Результаты исследований и их обсуждение

Добавление каждой из вышеназванных АК в раствор фонового электролита, содержащий атмосферный кислород, вызывает снижение емкости ДЭС во всей исследуемой области потенциалов, что свидетельствует о способности АК адсорбироваться на поверхности медного электрода (таблица). Максимальное снижение СДЭС наблюдали в присутствии Gly и Gln, наименьшее – для Ala.

Изотермы адсорбции АК, представленные на рис. 2, рассчитаны для потенциала, $E = -0,3$ В, вблизи потенциала нулевого заряда рабочего электрода. Характер изотерм достаточно сложен: все они содержат один или несколько максимумов, за которыми может следовать локальный минимум и новый рост Θ , как это наблюдается для Asn и Ala в области концентраций $1,0$ – $7,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (рис. 2, а), и в меньшей степени для Gly и Gln (рис. 2, а, б). По-видимому, такая форма изотерм связана с пространственной переориентацией адсорбированных молекул с возрастанием концентрации АК.

Изотермы адсорбции, рассчитанные для потенциала $E = -0,6$ В восстановления кислорода по реакции (2), практически совпадают с изотермами для потенциала нулевого заряда (рис. 2) для всех исследованных АК. При потенциале $E = -1,1$, соответствующем восстановлению H_2O_2 (реакция 3), форма изотерм для Gly, Asn, Ala остается неизменной при меньших значениях степени заполнения, что согласуется с представлениями о максимальной адсорбции нейтральных частиц в точке нулевого заряда электрода [10]. Для двухосновных АК Asp и Glu в области высоких концентраций (более 10 ммоль/л) максимальные степени заполнения наблюдали для более отрицательных потенциалов, что характерно для адсорбции катионов. Такие особенности,

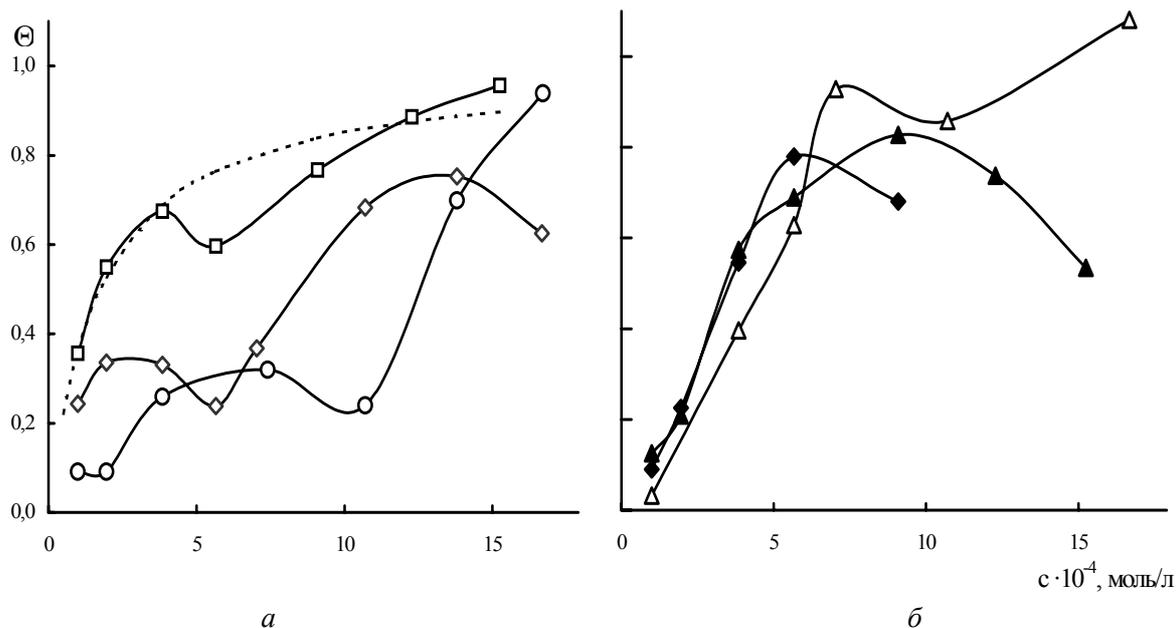


Рис. 2. Изотермы адсорбции: *а* – глицина (□), (○) аланина, аспарагина (◇); *б* – глутамина (Δ), аспарагиновой (◆) и глутаминовой (▲) кислот в присутствии кислорода на медном электроде при потенциале $-0,3$ В относительно хлорсеребряного электрода сравнения. Для глицина приведен теоретический расчет изотермы адсорбции по уравнению Ленгмюра (-----)

вероятно, связаны с тем, что АК в растворе находятся в виде биполярных цвиттер-ионов и могут ориентироваться к поверхности катода как нейтральной частью, так и положительно заряженной аминогруппой.

Наиболее простой вид, приближающийся к классической изотерме Ленгмюра, имеют изотермы адсорбции глицина (рис. 2, *а*). Это свидетельствует о том, что молекулы глицина адсорбируются в виде нейтральных цвиттер-ионов, практически не взаимодействуя между собой. Значительное снижение емкости в присутствии Glu и высокие значения степени заполнения $\Theta_{\max} = 0,9$ свидетельствуют о значительной адсорбции этой АК на поверхности электрода, однако предельный ток I и II волн восстановления кислорода при этом практически не изменился (таблица). Следовательно, адсорбированная АК не препятствует диффузии кислорода к поверхности электрода и последующему его восстановлению. В то же время предельный ток III волны кислорода в присутствии Glu снизился на 5 %, что не может быть вызвано адсорбцией АК, так как значение степени заполнения электрода при потенциале III волны меньше, чем при потенциале волн I и II. Вероятно, оно связано с уменьшением количества H_2O_2 в приэлектродном пространстве в результате его взаимодействия с АК. Аналогично на 10 % снижается III волна в присутствии Ala (таблица), причем в этом случае несколько уменьшается и волна восстановления гидроксильных радикалов (I), образующихся при потенциале III волны (реакции 3а, 1).

В присутствии всех исследованных АК наблюдается увеличение предельного тока волны восстановления кислорода (таблица), причем Asp и Glu вызывают наи-

большее его увеличение (до 95 %) и значительный сдвиг потенциала восстановления кислорода в положительную область, что свидетельствует об облегчении этого процесса в их присутствии.

Поскольку изоионные точки Asp и Glu лежат в области кислых pH ($\text{pI}_{\text{Glu}} = 3,22$; $\text{pI}_{\text{Asp}} = 2,77$ [1]), их добавки снижают pH фонового электролита соответственно до 4,2–3,7 и 4,0–3,55. Независимым методом установлено, что концентрация кислорода в растворе с изменением pH при добавлении Asp не изменяется. Таким образом, облегчение восстановления кислорода может быть связано с его предварительной протонизацией при высоких концентрациях H^+ [10], либо со взаимодействием кислорода с АК. Для выяснения природы этого явления изучали воздействие на вольтамперограммы восстановления кислорода добавок 0,1 М HCl в тех же условиях. В этом случае при снижении pH фонового электролита до 3,55 при неизменной концентрации кислорода предельный ток его восстановления на медном электроде также увеличился на 70 %, однако сдвиг потенциала восстановления кислорода составил лишь 40 мВ, что на 100 мВ меньше, чем для Asp при том же pH (рис. 3). Волна восстановления H_2O_2 (реакция 3) уменьшилась примерно на 40 %. На основании этого мы предполагаем, что увеличение предельного тока восстановления кислорода может быть вызвано изменением механизма ЭП при увеличении концентрации протонов, в результате чего часть кислорода восстанавливается по 4-электронному механизму:



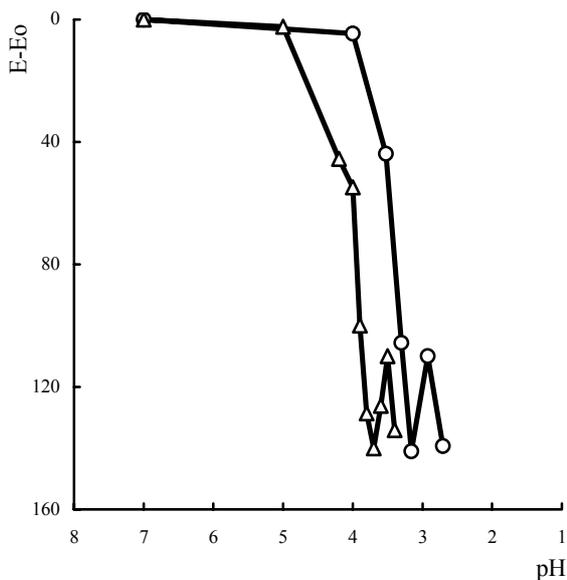


Рис. 3. Сдвиг потенциала волны восстановления кислорода на медном электроде в присутствии Asp (Δ) и соляной (\circ) кислот

Согласно уравнению Рендлса–Шевчика [11], предельный ток $I = kCn$, где C – концентрация кислорода, которая остается в эксперименте неизменной, а n – число электронов, изменяется с $n = 2$ до $n = 4$. Восстановление части кислорода по 4-электронному пути ведет к соответствующему сокращению продуцирования промежуточного продукта 2-электронного восстановления (реакции 1, 2) – пероксида водорода.

Подобное явление облегчения восстановления молекулярного кислорода на ртутном капельном электроде и изменения механизма с двухстадийного с присоединением одного электрона на каждой стадии в одностадийный 2-электронный процесс в неводной апротонной среде наблюдали в присутствии изоцианатов [10].

Таким образом, предварительная протонизация молекулярного кислорода в присутствии избытка протонов во многом объясняет влияние двухосновных АК на процесс восстановления кислорода, однако, сдвиг потенциала восстановления кислорода в присутствии Asp при гораздо более высоких значениях pH (рис. 3) позволяет предположить, что в облегчении этого процесса играет определенную роль также взаимодействие с АК. Возможно, это происходит за счет формирования на заряженной поверхности электрода комплекса кислорода и протонов АК:

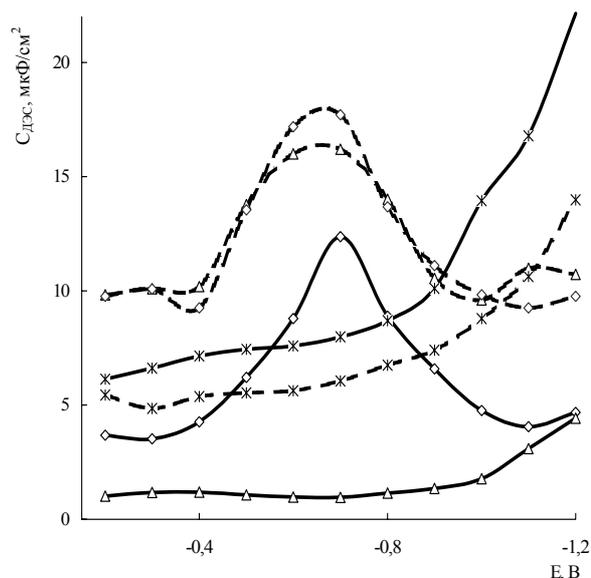
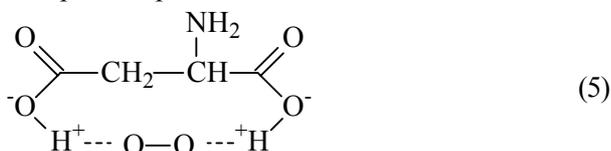


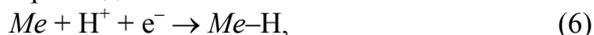
Рис. 4. Дифференциальная емкость медного электрода в 0,1 М фоновом растворе NaCl, содержащем аспарагиновую кислоту в концентрации $3,85 \cdot 10^{-4}$ (Δ) и $16,7 \cdot 10^{-4}$ (\circ) моль/л в присутствии (—) и в отсутствие (---) кислорода

Особенности адсорбции Asp в присутствии и в отсутствие кислорода также свидетельствуют в пользу предположения об образовании ее комплекса с кислородом.

В присутствии кислорода Asp снижает $C_{дэс}$, причем максимальное снижение наблюдается при концентрации $3,85 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что сравнимо с концентрацией кислорода в исследуемом растворе (рис. 4). Именно это свидетельствует об адсорбции Asp в виде нейтральных частиц, возможно, в виде комплекса (5), облегчающего восстановление кислорода (рис.1). Когда кислород удален из ячейки, значения $C_{дэс}$ в присутствии Asp в области потенциалов (-0,2 – -0,8) В превышают фоновые значения, что свидетельствует об адсорбции Asp в этом случае в виде анионов (степень диссоциации β -карбоксильной группы Asp при исследованных концентрациях составляет 0,75–0,35).

Следует отметить, что максимальное влияние на вольтамперные кривые восстановления кислорода Asp и Glu оказывают именно вблизи концентраций их максимальной адсорбции ($7,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рис. 1, 2, б).

Максимум, наблюдающийся на С–Е - кривых в области потенциалов -0,4 – -1,0 В в отсутствие кислорода и при высоких концентрациях Asp в присутствии O_2 (рис. 4), вероятно, связан с адсорбцией и восстановлением диссоциированных ионов водорода H^+ , концентрация которых в растворе кислых АК достаточно высока (таблица). Адсорбция H^+ на поверхности электрода сопровождается ЭП



что ведет к соответствующему увеличению измеряемого значения $C_{дэс}$. Для подтверждения этого предполо-

ложения сняты С–Е-кривые HCl на фоне 0,1 М NaCl. На этих кривых процесс адсорбции ионов водорода (6) проявляется в виде максимума в области потенциалов -0,4 – -0,9 В.

Появление этого максимума на С–Е-кривых Asp в присутствии кислорода при более высоких, чем в отсутствие кислорода, концентрациях свидетельствует о том, что адсорбция Asp (или ее комплекса с кислородом) энергетически более выгодный процесс, чем (6). Аналогичный максимум $S_{дэс}$ также наблюдали для Glu при концентрации $1,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л, при которой рН исследуемого раствора соответствует рН появления максимума на С–Е-кривых Asp и составляет 3,7.

Таким образом, различия в адсорбции Asp в присутствии и в отсутствие кислорода позволяют предположить, что в результате ее взаимодействия с кислородом на поверхности медного электрода адсорбируются частицы большего размера, скорее всего комплексные соединения.

В присутствии Asn и Gln повышение предельного тока и небольшой сдвиг потенциала восстановления кислорода в положительную область (таблица) также свидетельствуют в пользу последнего предположения. При этом, возможно, образование комплекса происходит с участием двух молекул АК.

На основании сопоставления данных исследования адсорбции АК на медном катоде и влияния АК на волны восстановления кислорода можно предположить следующее:

– отрицательно заряженная поверхность электрода благодаря адсорбции АК оказывает каталитическое действие на процесс ЭП, реакции кислорода и продуктов его восстановления с АК; эффективность этого действия симбатна степени заполнения поверхности электрода адсорбированным веществом и зависит от строения АК;

– Glu и Ala практически не оказывают влияния на механизм ЭП на молекулу кислорода;

– адсорбированные на поверхности катода в виде комплекса с кислородом и двухосновные АК (Asp и Glu) влияют на ЭП значительно в большей степени, чем одноосновные Asn и Gln.

Полученные в результате проведенных исследований представления о каталитическом эффекте отрицательно заряженной поверхности электрода на механизм redox-процессов с участием O_2 , активных форм его восстановления и АК могут быть использованы при изучении процессов, протекающих на отрицательно заряженных биомембранах.

1. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др., *Основы биохимии*, Москва, Мир, 1981.

2. Гринштейн С.В., Кост О.А., *Успехи биол. химии*, 2001, **41**, 77.

3. Griffiths H.R., *Free Radic. Res.*, 2000, **33**, 47.

4. Feng Z.Q., Imabayashi S., Kakiuchi T. et al., *J. Electroanal. Interface. Electrochem.*, 1995, **394**, 149.

5. Amores-Sainchez M.I., Medina M.A., *Mol. Genet. Metab.*, 1999, **67** (2), 100.

6. Миронюк И.Е., Шаповал Г.С., Громовая В.Ф. и др., *Теорет. и эксперим. химия*, 2001, **37** (2), 105.

7. Дамаскин Б.Б., Петрий О.А., Батраков В.В., *Адсорбция органических соединений на электродах*, Москва, Наука, 1968.

8. Шаповал Г.С., Громовая В.Ф., Миронюк И.Е., *Теорет. и эксперим. химия*, 1996, **32** (2), 124.

9. Shapoval G.S., Gromovaya V.F., Myronyuk I.Ye., *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **44**, 289.

10. Шаповал Г.С., Майрановский С.Г., Маркова Н.П. и др., *Электрохимические процессы с участием органических веществ*, Москва, Наука, 1970.

11. Галлос З., *Теоретические основы электрохимического анализа*, Москва, Мир, 1974.

Поступила в редакцию 10.11.2005 г.

Вольтамперометричне дослідження каталітичних redox-процесів за участю амінокислот

Г.С. Шаповал, І.Є. Миронюк, В.П. Громова, О.С. Кругляк

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

Методами імпульсної вольтамперометрії та спектроскопії електрохімічного імпедансу досліджено redox-процеси за участю кисню та деяких протеїногенних амінокислот на мідному катоді. Показано, що аспарагінова і глутамінова кислоти та меншою мірою їх амідні завдяки адсорбції на мідному електроді виявляють каталітичну дію щодо процесу відновлення кисню. Висловлено припущення про утворення комплексу амінокислот з киснем як про механізм такої дії.

Voltamperometric investigation of catalytic redox-processes involving aminoacids

G.S. Shapoval, I.Ye. Myronyuk, V.P. Gromova, O.S. Kruglyak

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

Redox processes involving oxygen and some proteinogenous amino acids are investigated with impulse voltammetry and by virtue of the electrochemical impedance spectroscopy technique at a copper cathode. Aspartic and glutamic acids and their amides, to a lesser degree, are shown to exert a catalytic effect on oxygen reduction as a result of their adsorption on the copper electrode. A supposition is made that the formation of a complex of amino acids with oxygen is a mechanism of the catalytic effect.

Реклама Киселева 1