

УДК 544.654.076.324.2

Е.А. Лут, Б.Ф. Минаев, Е.И. Аксиментьева, А.П. Шевченко

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛЕНИЯ МЕТИОНИНА В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

С применением квантово-химических расчетов изучено электрохимическое анодное окисление метионина в кислых и щелочных водных растворах на платине. Методом ВЗЛР/6-31G* показано, что наиболее вероятным реакционным центром окисления метионина в кислых средах является атом серы, о чем свидетельствует необратимая волна окисления метионина в области 0.78—1.5 В (Ag/AgCl). Установлено, что в щелочных растворах электроокисление метионина также происходит необратимо, но через две последовательные стадии разряда карбоксильного аниона, что хорошо согласуется с данными квантово-химических расчетов. На основе полученных экспериментальных и расчетных данных, а также идентификации продуктов электроокисления предложен механизм окисления метионина в щелочной среде.

Изучение механизма окислительно-восстановительных реакций с участием простейших протеинов — важный этап при создании моделей физико-химических процессов в белковых системах [1—7]. Особый интерес в этой связи вызывают реакции окисления метионина, поскольку именно они влияют на гормональный баланс [5] и процессы биологического старения [1, 4, 6]. При этом метионин действует как биологический антиоксидант путем прямого или косвенного взаимодействия с активным кислородом [2, 3]. Несмотря на интенсивное изучение окисления аминокислот (в том числе и серосодержащих), известные реакционные схемы, в частности для окисления метионина, весьма противоречивы [2, 7—9]. В большинстве исследований во внимание принимаются реакции, происходящие при кислотности среды ниже изоэлектрической точки, тогда как окислительно-восстановительные процессы с участием метионина в щелочных средах почти не изучены. В ряде работ предполагается схожесть механизмов окисления метионина в кислых, нейтральных и щелочных средах, причем большинство исследователей склоняются к мнению, что единственный реакционный центр во всех случаях — это атом серы, а продукты окисления — сульфоксид, сульфон и даже сульфокислота; показана также возможность окисления аминогруппы в щелочных средах [8, 9]. Для процессов электрохимического окисления метионина, специфически адсорбирующегося на платине, предписывается схема, включающая разрыв связи C—S и образование сульфокислоты [8]. В то же время прямая идентификация продуктов электроокисления аминокислот на платине в щелочных растворах с помощью ИК-спе-

ктроскопии отражения *in situ* однозначно указывает на возможность декарбоксилирования анионов аминокислот с дальнейшим окислением оставшихся фрагментов до аммиака, спиртов и других продуктов [3, 7].

Для физико-химического обоснования возможных путей превращения метионина в различных средах в работе применен квантово-химический подход [10, 11] в сочетании с экспериментальным моделированием реакций окисления с помощью электрохимического метода. Данный метод, в отличие от химического, не осложнен образованием продуктов превращения вспомогательных веществ и позволяет изучать реакции окисления при контролируемых потенциалах рабочего электрода.

Электрохимические исследования проводили в трехэлектродной ячейке методом циклической вольтамперометрии на установке, включающей потенциостат ПИ-50-1 и программатор ПР-8. Циклические вольт-амперные кривые (ЦВА) обрабатывали при помощи компьютерной программы Science Plotter. Растворы исследуемого вещества готовили растворением точной навески метионина марки Merck. В кислой среде фоновым раствором выступала сульфатная кислота марки х.ч., исследования в щелочной среде проводили в присутствии литий перхлората марки х.ч. Рабочий электрод представлял собой платиновую проволоку, впаянную в стекло с видимой поверхностью $1.4 \cdot 10^{-5}$ м². Скорость изменения его потенциала составляла 0.01–0.2 В/с, рабочий диапазон поляризации в щелочной и кислой средах — 0–2.2 В. Вспомогательным электродом служила платиновая платинированная пластинка, электрод сравнения — насыщенный аргентум-хлоридный (Ag/AgCl). Все из-

мерения осуществляли при комнатной температуре в атмосфере аргона.

Квантово-химические расчеты выполняли методом теории функционала плотности (ТФП) с обменно-корреляционным функционалом B3LYP при полной оптимизации геометрии с помощью квантово-химического программного пакета GAMESS [12]. Оптимизация геометрии проводилась с использованием стандартного атомного базисного набора 6.31G*(d,p), включающего также поляризационные орбитали атомов.

Конечные продукты электроокисления (аммониевых ионов, альдегидных групп и других соединений) идентифицировали по известным методикам [13, 14] после проведения препаративного электролиза при потенциалах окисления.

Молекула метионина отличается от обычных аминокислот наличием атома серы в углеводородной цепи, что и обуславливает особенности реакций окисления этой аминокислоты в различных средах. В зависимости от значения pH раствора молекула метионина, изоэлектрическая точка которой соответствует pH 5.74 [6], может пребывать в форме катиона, аниона либо цвиттер-иона. В кислых средах молекула метионина находится в форме катиона аминокислоты вследствие протонирования атома азота аминогруппы.

В соответствии с проведенными расчетами в нейтральной и слабокислой средах в молекуле метионина электронная плотность как на нижней вакантной молекулярной орбитали (НВМО), так и на верхней занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) сосредоточена, в основном, на атоме серы (рис. 1). Следовательно, в этих условиях участие карбоксильной и аминогруппы в качестве реакционных центров реакции окисления маловероятно.

Экспериментальное исследование процессов, происходящих на платиновом аноде в растворах метионина на фоне 0.5 М сульфатной кислоты в условиях линейной и циклической развертки потенциала, указывает на возможность его окисления при потенциалах $E > 0.78$ В (рис. 2, а). Появление характерных анодных пиков в области $E_p = 1.2—1.5$ В (E_p — потенциал пика) свидетельст-

вует об осложнении данной гетерогенной реакции адсорбцией органического вещества либо продуктов его превращения на поверхности электрода [15], что подтверждается также линейной зависимостью тока анодного пика (I_p) от скорости развертки (v) в координатах $\lg I_p—\lg v$ (рис. 2, б) [16, 17]. С увеличением скорости развертки от 0.02 до 0.2 В/с положение максимума окисления E_p смещается в анодную область на 250—300 мВ, а значение потенциала полувысоты $E_{1/2}$ остается почти без изменений (1.08—1.0 В). Исходя из вида вольт-амперных кривых (отсутствие электрохимической активности в обратном ходе развертки), расчета параметров необратимости (наклон прямых в координатах $dE_p/d\lg v = 0.125$ В; $dE_p/d\lg I_p = 0.124$ В),

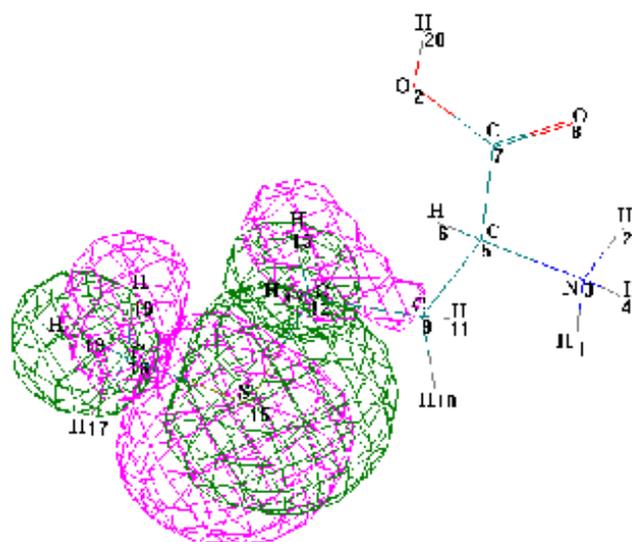


Рис. 1. Локализация ВЗМО молекулы метионина в кислой среде.

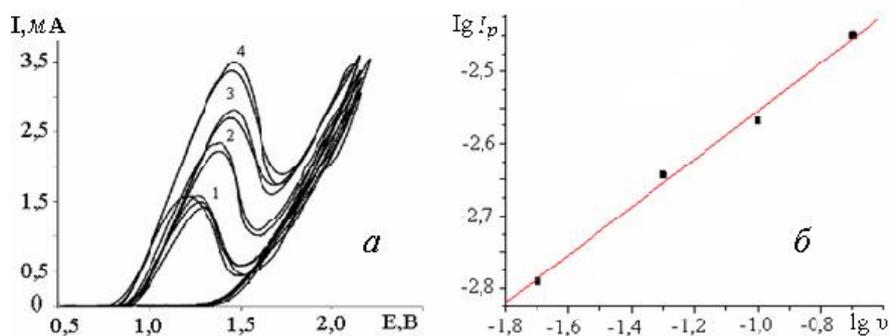


Рис. 2. а — ЦВА платинового электрода, полученные в 0.1 М растворе метионина на фоне 0.5 М H_2SO_4 при скорости развертки потенциала, В/с: 1 — 0.02; 2 — 0.05; 3 — 0.1; 4 — 0.2; б — зависимость тока анодного максимума от логарифма скорости развертки потенциала.

близких к теоретическому значению (0.118 [16]), можно утверждать, что реакция протекает необратимо. Оценка гетерогенной константы скорости k_s для необратимого процесса [15, 17] дает значение $8.4 \cdot 10^{-6}$ м/с, пограничное между значениями, характерными для необратимого и квазиобратимого переноса заряда [15, 17].

Проведенные исследования хорошо согласуются с данными других работ, касающихся окисления метионина [1, 2, 8, 9, 18, 19]. Это позволяет заключить, что в кислой среде окисление этой аминокислоты происходит из адсорбированного состояния с участием атома серы, подтверждая правомерность предположений, сделанных на основе квантово-химических расчетов.

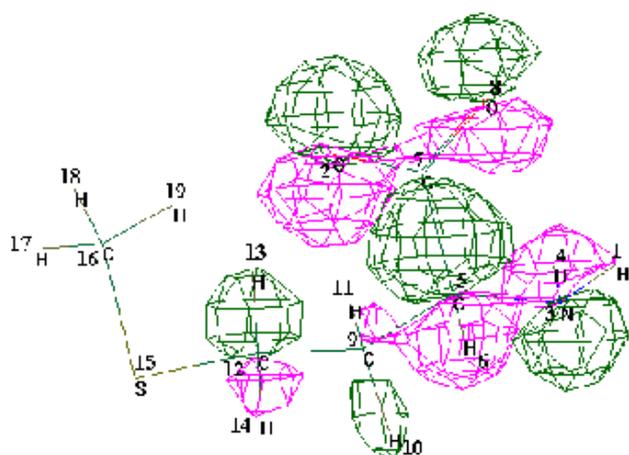


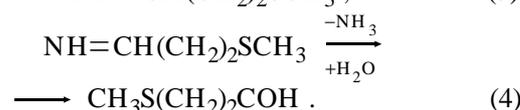
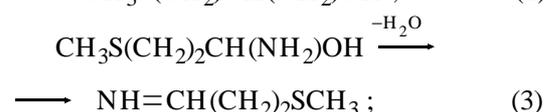
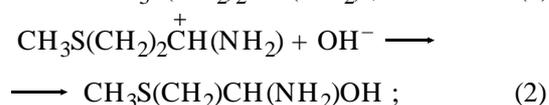
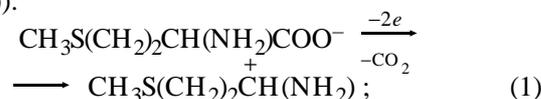
Рис. 3. Локализация ВЗМО молекулы метионина в щелочной среде.

При изменении кислотности среды реакционный центр окисления метионина может находиться как на карбоксильной [3, 7], так и на аминогруппе [8] (в сильно щелочных средах), при вероятном, согласно [8, 9], участии и атома серы в окислительных реакциях. В соответствии с расчетом электронной плотности на атомах, длин связей в молекуле метионина, пребывающей в форме аниона аминокислоты (щелочная среда), установлено, что электронная плотность ВЗМО локализована преимущественно на карбоксильной группе (рис. 3).

Доля электронной плотности ВЗМО на карбоксильной группе составляет 0.6, а на атомах N и C — 0.25 ат.ед. Таким образом, можно предположить, что в щелочной среде реакция окисления метионина должна проходить, прежде всего,

за счет разряда ионизированной карбоксильной группы, поскольку на ней сосредоточено более половины электронной плотности ВЗМО.

Известно [15], что в сульфатных и перхлоратных растворах при pH 12 окисление аминокислот осуществляется через образование карбкатиона, то есть за счет прохождения декарбоксилирования с выделением молекулы CO_2 . Если энергия ионизации молекулы (энергия ВЗМО с противоположным знаком) меньше 8 эВ, то при окислении аминокислоты образуется карбкатион [15]. Рассчитанная энергия ВЗМО для аниона метионина составляет 4.62 эВ. Это позволяет предположить, что анион метионина подвергается декарбоксилированию с образованием неустойчивого карбкатиона (уравнение (1)), который вступает во взаимодействие с OH^- -группами среды с образованием 3-метилсульфонил-пропил-1 гидроксимиона (уравнение (2)):



Интермедиат $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{OH}$ неустойчив и разлагается с отщеплением воды и образованием 3-метилсульфонил-пропил-1-имиона (уравнение (3)), который гидролизуется с образованием конечного продукта электроокисления метионина — 3-метилсульфонилпропаналя, с выделением аммиака (уравнение (4)).

Продукты окисления идентифицировали путем обнаружения в растворе аммиака и альдегидной группы. Для подтверждения процесса декарбоксилирования применяли метод потенциометрического титрования. Наличие аммиака в щелочных растворах (в форме катиона аммония) после завершения окисления метионина зафиксировано качественной реакцией с реактивом Несслера по методике [13], присутствие альдегидной группы — качественной реакцией спиртового раствора веществ, полученных после электролиза, с 2,4-ди-

Т а б л и ц а 1

Квантово-химические и термодинамические характеристики продуктов электрохимического окисления метионина

| Вещество | $E_{\text{полн}}^{\cdot}$, кДж/моль | S , Дж/моль·К | $H_{\text{образ}}^{\cdot}$, кДж/моль | ВЗМО | НВМО |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|--------|-------|
| | | | | эВ | |
| $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ | -458.12 | 439.95 | -559.48 | -4.62 | 3.84 |
| $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)^+$ | -416.50 | 374.52 | 707.63 | -12.60 | -6.39 |
| $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{OH}$ | -460.40 | 411.88 | -247.29 | -9.06 | 0.29 |
| $\text{NH}=\text{CHCH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2$ | -377.84 | 369.56 | 38.82 | -9.01 | 0.32 |
| $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{COH}$ | -341.32 | 371.11 | -191.53 | -9.18 | 0.13 |

П р и м е ч а н и е. E — энергия, S — энтропия, H — теплота образования.

нитрофенилгидразином [14]. Выпадение кристаллического осадка желтого цвета подтверждало присутствие альдегидной группы.

Для косвенного подтверждения механизма окисления метионина проанализированы рассчитанные термодинамические и квантово-химические величины, которые дают возможность более глубоко объяснить протекание процесса в щелочной среде, при этом детализируя каждую из стадий отдельно. Для оценки реакционной способности веществ воспользовались значениями полной энергии, энтропии, энергиями ВЗМО и НВМО. Рассчитаны тепловые эффекты каждой предполагаемой стадии процесса, а также изменение энтальпии, энтропии и энергии Гиббса.

Основные квантово-химические и термодинамические характеристики исходного аниона, промежуточных соединений и продуктов электрохимического окисления метионина в щелочной среде, рассчитанные методом функционала плотности в версии V3LYP с полной оптимизацией геометрии при помощи квантово-химического программного пакета GAMESS, приведены в табл. 1.

Рассчитанные термодинамические характеристики окисления метионина свидетельствуют о том, что с энергетической точки зрения наибольшие затраты необходимы для осуществления именно первой стадии, которая связана с отрывом электрона и протеканием процесса декарбонирования (табл. 2).

Для остальных стадий изменения значений энергии Гиббса отрицательные или небольшие положительные, что указывает на практически самопроизвольное протекание данных реакций. То есть скорость окисления метионина должна ли-

Т а б л и ц а 2

Термодинамические характеристики стадий окисления метионина

| Стадия | ΔH^{298} , кДж/моль | ΔS^{298} , Дж/моль·К | ΔG^{298} , кДж/моль |
|--------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 872.98 | 148.26 | 828.78 |
| 2 | -725.21 | 48.10 | -759.54 |
| 3 | 55.92 | 27.75 | 47.65 |
| 4 | -46.34 | 124.07 | -83.32 |

митироваться именно электрохимической стадией. Как показано в работе [20], отрыв первого электрона от молекул аминокислот (на примере глицина) ведет к образованию соответствующих катион-радикалов, устойчивых в жидкой среде. Специфическая структура радикала обеспечивает ему высокую адсорбционную способность за счет взаимодействия полярных групп с поверхностью платинового электрода.

В соответствии с электрохимическими исследованиями окисление метионина в щелочной среде при относительно низких концентрациях электроактивного вещества сопровождается формированием двух анодных волн в области $E = 1.3$ — 1.5 и $E = 1.7$ — 2.0 В (рис. 4, а), что хорошо согласуется с данными работы [16]. При более высоких концентрациях последовательные волны окисления сливаются в одну необратимую волну анодного тока в интервале 1.5 — 2.1 В (рис. 4, б, в), максимум которой сдвигается в анодную область с увеличением как концентрации метионина, так и скорости развертки, $dE_p/d\lg v = 0.150$ В (рис. 4,

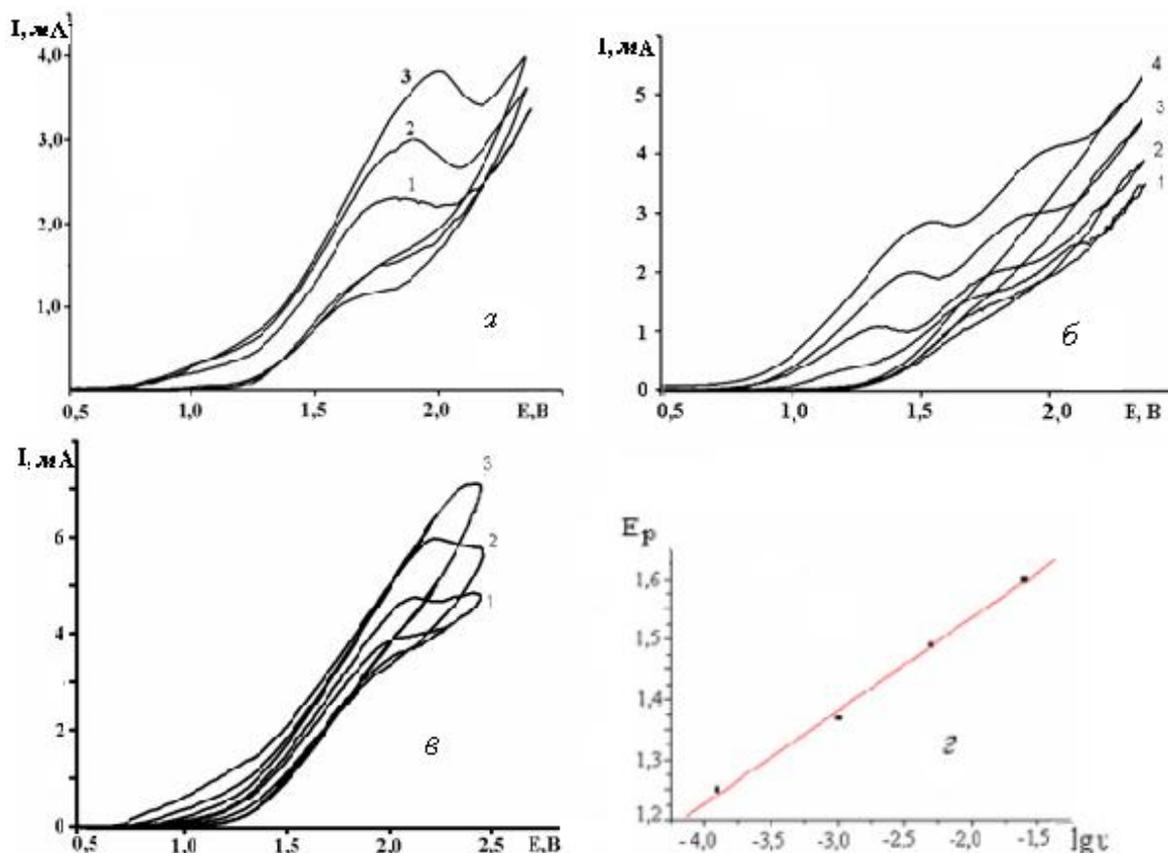


Рис. 4. ЦВА окисления 0.05 (а), 0.03 (б) и 0.1 М (в) раствора метионина в щелочной среде (рН 12) на фоне 0.5 М LiClO_4 при скорости развертки, В/с: 1 — 0.01; 2 — 0.02; 3 — 0.05; 4 — 0.1; д — зависимость потенциала пика окисления метионина от логарифма скорости развертки потенциала.

з). Такое электрохимическое поведение свидетельствует о том, что процесс окисления метионина в щелочной среде протекает необратимо и осложнен адсорбцией не только исходного электроактивного вещества, но и продуктов его превращения [18].

Проведенные квантово-химические расчеты и электрохимические исследования позволили подтвердить, что в кислой среде окисление метионина на платине происходит необратимо, из адсорбированного состояния с участием атома серы. В щелочных растворах его электроокисление протекает также необратимо, но через две последовательные стадии разряда карбоксильного аниона, что хорошо согласуется с данными квантово-химических расчетов. Рассчитанные термодинамические характеристики окисления метионина указывают на то, что лимитирующей является стадия, связанная с отрывом электрона и протеканием процесса декарбоксилирования. На основании эксперимен-

тальных и расчетных данных, а также идентификации продуктов электроокисления предложен механизм окисления метионина в щелочной среде, включающий разряд аниона аминокислоты, взаимодействие образованного карбокатиона с OH^- -группами среды, что приводит к формированию промежуточного соединения 3-метилсульфонил-пропил-1-гидроксиамина. Интермедиат неустойчив и разлагается с отщеплением воды и образованием 3-метилсульфонил-пропил-1-имина. При гидролизе последнего образуется конечный продукт окисления метионина — 3-метилсульфонилпропаналь, с выделением аммиака.

РЕЗЮМЕ. З використанням квантово-хімічних розрахунків досліджено електрохімічне окиснення метіоніну в кислих та лужних водних розчинах на платині. Методом ВЗЛР/6-31G* показано, що найбільш імовірним реакційним центром окиснення метіоніну в кислому середовищі є атом сірки. Встановлено, що в лужних роз-

чинах електроокиснення метіоніну відбувається необоротно через стадію розряду карбоксильного аніону, що добре корелює з даними квантово-хімічних розрахунків. На основі отриманих експериментальних і розрахункових даних, а також проведеної ідентифікації продуктів електроокиснення запропоновано механізм окиснення метіоніну в лужному середовищі.

SUMMARY. The processes of methionine oxidation on the platinum electrode in the acid and alkali solvents have been investigated by the DFT quantum chemical and electrochemical methods. Based on calculation it is shown that the most probable reaction center of methionine oxidation in acid solution is the Sulfur atom. It is found that in alkali solution the methionine oxidation proceeds irreversible by the carboxyl anion discharge, which is in a good agreement with quantum chemical calculation. On the basis of experimental and theoretical data with additional chemical identification of the obtained electrooxidation products a new mechanism of methionine oxidation in alkali medium has been proposed.

1. Ziyatdinova G., Grigor'eva L., Morozov M. et al. // *Microchim Acta*. -2009. -**165**. -P. 353—359.
2. Wood M.J., Prieto J.H., Komives E.A. // *Biochim. et Biophys. Acta*. -2005. -**1703**. -P. 141—147.
3. Ogura K., Kobayashi M., Nakayama M., Miho Y. // *J. Electroanal. Chem.* -1998. -**449**. -P. 101—109.
4. Kim Y.H., Berry A.H., Spencer D.S., Stites W.E. // *Protein Engineering*. -2001. -**14**, № 5. -P. 343—347.
5. Teh L.C., Murphy L.J., Huq N.L. et al. // *J. Biol. Chem.* -1987. -**262**, № 14. -P. 6472—6477.
6. Дюга Г., Пенни К. Биорганическая химия. -М.: Мир, 1983. -С. 26.

7. Введенский А.В., Карташова Т.В., Бобринская Е.В. // *Вестн. ВГУ*. -2008. -№ 1. -С. 7—14.
8. Туманова Е.А., Сафронов А.Ю., Капустин А.В. // *Электрохимия*. -2001. -**37**, № 9. -С. 1127—1130.
9. Gomez-Mingot M., Iniestal J., Montiel V. et al. // *Analyst*. -2002. -**127**. -P. 1164—1168.
10. Лут О.А., Білий О.В. // *Вісн. Львів.ун-ту. Сер. хім.* -2007. -№ 48. -Ч. 2. -С. 108—112.
11. Лут О.А., Білий О.В. // *Укр. хім. журн.* -2008. -**74**, № 4. -С. 97—100.
12. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al. PC GAMESS version 7.0 (Dragon) / *J. Comput. Chem.* -1993. -**14**. -P. 1347—1363.
13. Степанов Г.Р. Качественный химический полумикроанализ неорганических веществ. -Минск.: Высш. шк., 1971.
14. Шрайнер Р., Фьюзон Р. Систематический качественный анализ органических соединений. -М.: Изд-во иностр. лит., 1950. -Т. 1.
15. Байзер М., Лунд Г. Органическая электрохимия / Пер. с англ. В.А. Петросяна и Л. Г. Феоктистова. -М.: Химия, 1988. -Кн. 1.
16. Введенский А.В., Бобринская Е.В., Карташова Т.В. // *Конденсированные среды и межфазные границы*. -2006. -**8**, № 4. -С. 264—272.
17. Gosser D.K. Cyclic Voltammetry. Simulation and Analysis of Reaction Mechanism. -New-York: VCH Publ., 1993.
18. Туманова Е.А., Королев С.А., Ложкин В.И. и др. // *Электрохимия*. -1999. -**35**, № 12. -С. 1499—1502.
19. Tan W.T., Goh J.K. // *Electroanalysis*. -2008. -**20**, № 22. -P. 2447—2453.
20. Minaev V.F., Lut O.A., Baryshnikov G.V., Minaeva V.A. // IV Russian-Japanese Seminar "Molecular and Biophysical Magnetoscience" (SMBM) (Orenburg, Russian Federation Proceedings), Sept. 16—19, 2009. -P. 8—10.

Черкаський національний університет
ім. Богдана Хмельницького
Львівський національний університет ім. Івана Франко

Поступила 16.10.2009