

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ».

Физический факультет
Кафедра общей физики

Фоменко Максим Владиславович

КУРСОВАЯ РАБОТА

**Исследование кинетики окисления глутатиона методом
спектрофотометрии**

Электромагнитный практикум, 2 курс, группа №18303

Научный руководитель:

д. х. н. Центалович Ю. П.

Оценка научного руководителя

«_____» _____ 2019 г.

Преподаватель практикума:

д.ф.- м.н., доцент, Вячеславов Л.Н.

Оценка преподавателя практикума

«_____» _____ 2019 г.

Куратор практикума:

к.ф.- м.н., доцент, Астрелин В.Т.

Итоговая оценка

«_____» _____ 2019 г.

Новосибирск 2019

Аннотация

Целью работы является определение констант скорости реакции окисления глутатиона кислородом при разных температурах, нахождение энергии активации этой реакции, а также установление термической устойчивости глутатиона в инертной среде. Измерения проводились на спектрофотометре. Получены спектры поглощения глутатиона в водном буферном растворе. Установлена термическая устойчивость вещества вплоть до 70°C. На основе полученных данных рассчитаны константы скорости реакции окисления глутатиона молекулярным кислородом и энергия активации этой реакции.

Ключевые слова: спектрофотометр, оптическая плотность, коэффициент экстинкции, спектры поглощения глутатиона, константа скорости химической реакции.

Работа выполнена в лаборатории протеомики и метаболомики Международного томографического центра СО РАН.

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Теоретическая часть	4
2.1. Назначение спектрофотометрических методов	4
2.2. Закон Бугера-Ламберта-Бера.....	5
2.3. Спектрофотометры.....	6
3. Экспериментальная часть	8
3.1. Приготовление раствора и нахождение пиков поглощения	8
3.2. Выяснение термической устойчивости	9
3.3. Кинетика процесса окисления при разных температурах.....	10
4. Заключение	14
5. Список литературы.....	14

1. Введение

Во многих областях науки, таких как химия, часто требуется прибегать к физическим методам исследования. Задачи о нахождении концентрации вещества в растворе, его термической устойчивости или нахождение параметров протекания реакции между несколькими веществами, можно решить, используя метод спектрофотометрии.

Спектрофотометрия нашла свое применение метаболизму – науке, изучающей конечные и промежуточные продукты обмена веществ в клетках. Данный метод играет большую роль в данной сфере, так как позволяет определять концентрации веществ при различных химических процессах.

В данной работе поставлены задачи: определить термическую устойчивость восстановленного глутатиона в среде аргона, найти константы скорости реакции окисления кислородом восстановленного глутатиона при нескольких температурах, а так же найти энергию активации этой реакции.

Факт термической устойчивости восстановленного глутатиона в среде аргона гарантирует, что при его нагревании в среде кислорода, возможно только появление продуктов реакции окисления.

2. Теоретическая часть

2.1. Назначение спектрофотометрических методов

Спектрофотометрические методы применяются для количественного или качественного анализа веществ.

Качественный анализ основан на том факте, что каждое вещество имеет свой уникальный спектр поглощения. Строение вещества сильно влияет на его спектр поглощения. Так, функциональные группы, зовущиеся хромофорами, определяют области сильного поглощения на характерных для них длинах волн. Получив спектр поглощения для неизвестного образца, его можно сравнить с уже известными науке спектрами и таким образом идентифицировать исследуемое вещество.

Количественный анализ базируется на том факте, что оптическая плотность раствора вещества прямо пропорциональна концентрации этого вещества, эту зависимость описывает закон Бугера-Ламберта-Бера. Для задач, поставленных в этой работе, будет применяться количественный анализ.

2.2. Закон Бугера-Ламберта-Бера

Закон Бугера-Ламберта-Бера описывает связь между потоком электромагнитного излучения, пропускаемого через образец и потоком излучения, вышедшим из него. Таким образом, этот закон определяет степень поглощения излучения конкретным веществом. Формулировка имеет вид:

$$I = I_0 * 10^{-\varepsilon * C * l_0} \quad (1)$$

Где I_0 – интенсивность подаваемого излучения, I – интенсивность излучения после прохождения через раствор вещества, ε – коэффициент экстинкции (молярного поглощения), C – концентрация вещества, l_0 – ширина кюветы (длина пути, пройденного светом). На Рис.1. приведена схема, описывающая принцип действия данного закона.

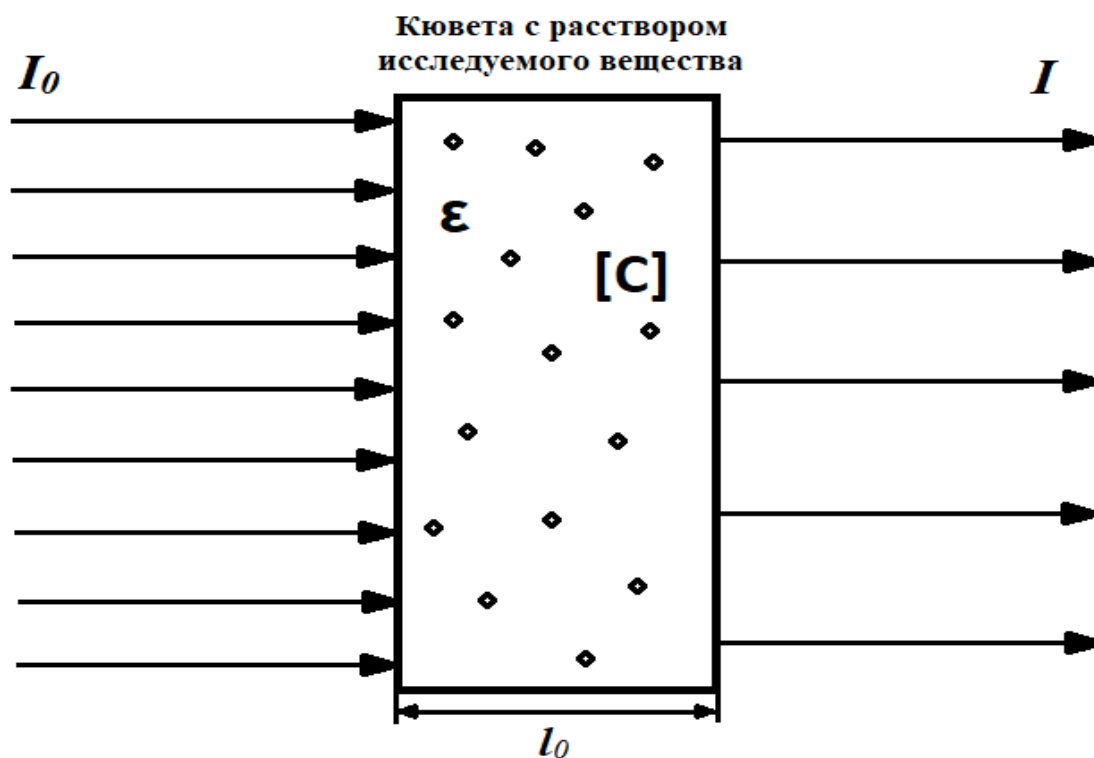


Рис. 1. Схема, описывающая принцип действия закона Бугера-Ламберта-Бера.

Безразмерная величина, в степень которой возводится десятка в законе Бугера-Ламберта-Бера, называется оптической плотностью и обозначается **OD**:

$$OD = \varepsilon * C * l_0 \quad (2)$$

Данный закон применим не во всех случаях. Если раствор вещества сильно концентрированный, pH раствора меняется со временем или поток излучения имеет слишком большую интенсивность, то будут наблюдаться расхождения.

При повышенной концентрации исследуемого вещества, часть частиц преграждает поток излучения к другим частицам, вследствие чего некоторые частицы не учувствуют в процессе поглощения.

Значение pH сильно влияет на поведение исследуемого вещества. От него зависят такие химические процессы как: гидролиз, комплексообразование, таутомерные превращения и сольватация. Эти процессы приводят к расхождению с законом Бугера–Ламберта–Бера. Данная проблема решается использованием буферного раствора с необходимым pH.

В случае высокоинтенсивного излучения значительная часть частиц переходит в возбужденное состояние, меняет или окончательно теряет способность поглощать излучение. Избыток энергии может привести к ранее перечисленным химическим процессам или разрушению исследуемого вещества, что заметно скажется на полученном результате [1].

2.3. Спектрофотометры

На Рис.2. представлена принципиальная схема устройства спектрофотометра [2]. Свет от источника света проходит через монохроматор, он в свою очередь выделяет из него узкую полосу спектра, являющуюся монохромным излучением. Полученное монохроматическое излучение проходит через кювету с исследуемым образцом. Прошедший пучок попадает на фотозадачу, полученный сигнал усиливается и передается на обработку в компьютер.

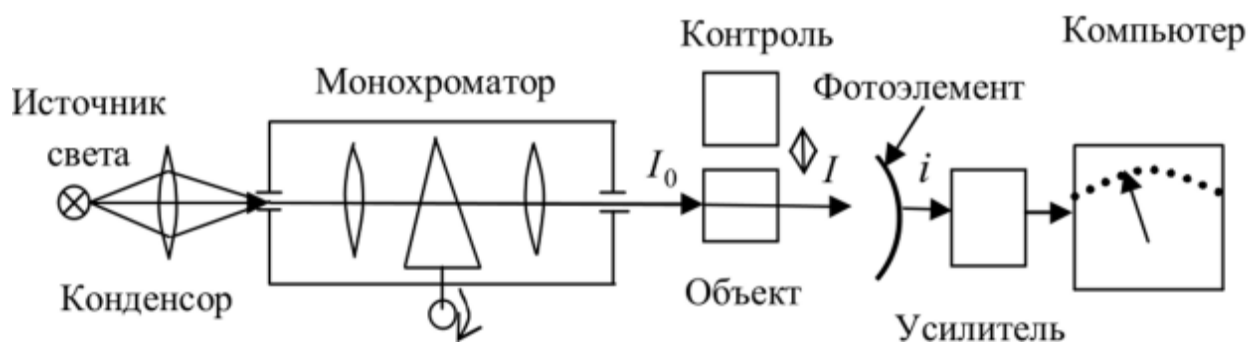


Рис. 2. Принцип устройства спектрофотометра.

В монохроматорах используют дифракционные решетки или разделяющие свет призмы. В монохроматорах видимого спектрального диапазона для разложения света в спектр обычно применяются дифракционные решетки, так как призмы проявляют разрешение, зависящее от длины волны [3].

Зачастую при использовании спектрофотометра помимо исследуемой кюветы с образцом используют аналогичную кювету с растворителем. Это необходимо для вычитания из нужного нам спектра лишнего поглощения, вызванного веществами растворителя и материалом кюветы.

В настоящее время устройство спектрофотометров несколько изменилось. Примерная схема устройства изображена на Рис.3.

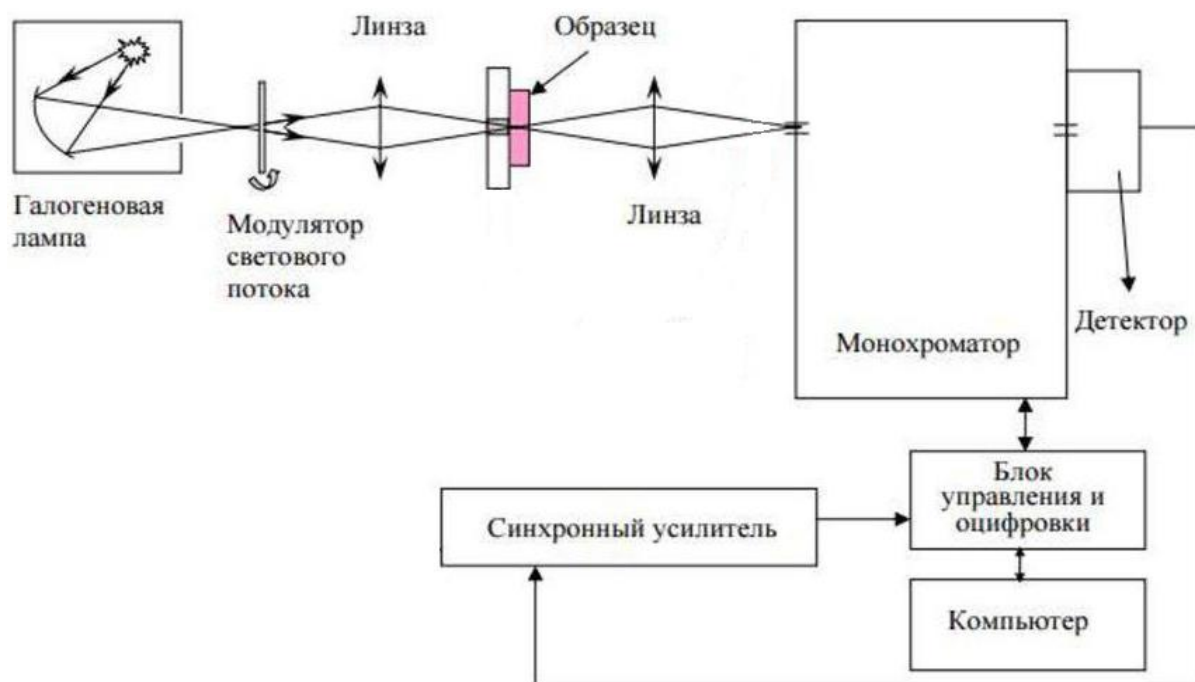


Рис. 3. Принцип устройства современного спектрофотометра.

В отличие от старых моделей, в новых спектрофотометрах, на образец падает обычный белый свет, и после прохождения через него попадает в монохроматор. В нем свет проходит через дифракционную решетку, которая проецирует разложенный по поддиапазонам свет на фотодиодную решетку. Решетка содержит определенное количество фотодиодных датчиков, преобразующих световую энергию в электрические импульсы. Поэтому любой диапазон длин волн, при подобной конструкции спектрофотометра дает свой "отклик" практически мгновенно, а не последовательно, как это имеет место в старых моделях спектрофотометров. Электрические импульсы с фотодиодов обычно обрабатываются микрокомпьютером.

3. Экспериментальная часть

3.1. Приготовление раствора и нахождение пиков поглощения

Для всех экспериментов был приготовлен одинаковый раствор восстановленного глутатиона. После нескольких пробных измерений выбрана концентрация $C = 1,67 \cdot 10^{-4}$ М (моль/л). В качестве растворителя использован водный буферный раствор $pH = 7,2$. Далее введена аббревиатура GSH для обозначения восстановленного глутатиона.

Полученный раствор был помещен в специальную кювету для спектрофотометра. После сравнения спектров чистого буферного раствора и раствора содержащего восстановленный глутатион был получен его спектр. GSH поглощает только в коротковолновой части спектра с максимумом на 210 нм. Однако, при инкубации в аэробных условиях появляется полоса поглощения с максимумом на 303 нм, соответствующая окисленному глутатиону GSSG (Рис. 4). Дальнейшие кинетические измерения проводились по поглощению образца на длинах волн $\lambda_1 = 210$ нм и $\lambda_2 = 303$ нм.

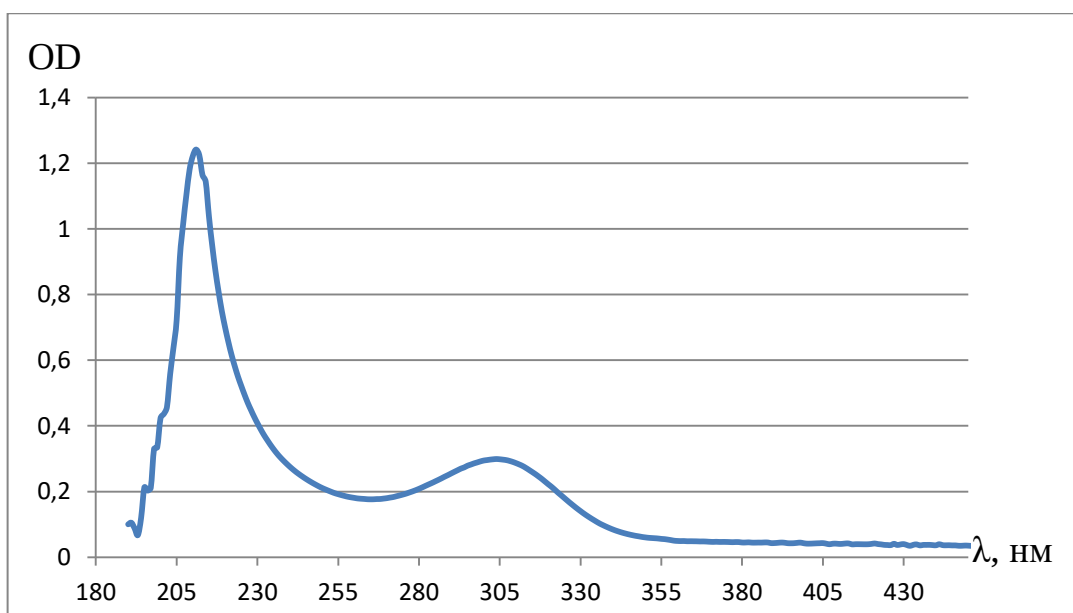


Рис.4. Спектр поглощения восстановленного глутатиона после инкубации в аэробных условиях

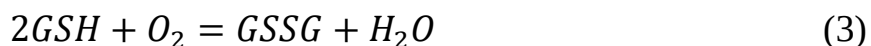
3.2. Определение термической устойчивости

Раствор GSH был помещен в специальную кювету для спектрофотометра, после этого он барботировался пять минут аргоном для вытеснения всего воздуха из раствора и над ним, а в частности кислорода. После барботирования кювета была закрыта пробкой и упакована герметично, при помощи парафильма, затем кювета установлена в термостатив. Термостатив представляет собой держатель кюветы с радиатором для отвода тепла и элементом Пельтье нагревающим или охлаждающим кювету. На протяжении всего эксперимента была установлена температура $T = 70^{\circ}\text{C}$. Эксперимент проводился 15 часов, измерения производились каждые две минуты, в автоматическом режиме.

Из полученных данных определено, что оптическая плотность со временем практически не изменялась, то есть концентрация GSH в растворе осталась неизменной, следовательно, GSH не распался под воздействием температуры $T = 70^{\circ}\text{C}$. Незначительное изменение оптической плотности, порядка 0,1 OD, объясняется наличием малого количества растворенного кислорода, который не вышел полностью из раствора, при барботировании аргоном. Как только весь присутствующий кислород прореагировал, изменение оптической плотности не наблюдалось.

3.3. Кинетика процесса окисления при разных температурах

В этой части работы проведено нахождение констант скорости реакции окисления GSH кислородом, при трех различных температурах. Реакция окисления протекает с образование свободных радикалов, общий вид реакции:



Где GSSG – окисленный глутатион.

Биологической функцией GSH в организме является защита SH-групп ферментов и белков от окисления [4].

Измерения проводились при температурах 25, 40, 70 °C. Изменение концентрации определялось по изменению оптической плотности на длине волны $\lambda_2 = 303$ нм. Связь между концентрацией GSSG и оптической плотностью описывается формулой (2).

Для всех трёх температур, исследуемый раствор GSH в кювете, барботировали чистым кислородом десять минут, для предельного растворения кислорода в растворе. Для температур 25°C и 40°C снятие измерений проводилось каждые две минуты на протяжении 15 часов, но для температуры 70°C измерения проводились каждые 30 секунд на протяжении одного часа, все измерения проведены в автоматическом режиме. Время выбрано исходя из того факта, что константа скорости химической реакции зависит от температуры, чем она выше тем быстрее идет реакция.

Полученные графики были аппроксимированы в среде MatLab по формуле:

$$OD = A * e^{-k_1 * t} + B * e^{-k_2 * t} + C \quad (4)$$

Значения констант A , B , C , k_1 , k_2 приведены в Таблице 1.

	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}	A	B	C	$[O_2]_T, M$
$T = 70^\circ C$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	-0.53	0.43	$5.52 \cdot 10^{-2}$	$1.23 \cdot 10^{-3}$
$T = 40^\circ C$	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$	-0.88	0.63	0.09	$0.96 \cdot 10^{-3}$
$T = 25^\circ C$	$1.7 \cdot 10^{-4}$	$9.3 \cdot 10^{-5}$	-2.54	1.26	0.15	$0.63 \cdot 10^{-3}$

Таблица 1. Параметры для аппроксимации кинетических кривых по формуле (4).

Если концентрация одного из реагентов на порядок ниже, чем остальных, изменением остальных концентраций в ходе реакции можно пренебречь. Поэтому, формула (5) применима в поставленном эксперименте, так как концентрация растворенного кислорода превышает концентрацию GSH.

Константа скорости реакции находится по формуле:

$$K = \frac{k_1}{[O_2]_T} \quad (5)$$

Где $[O_2]_T$ – предельная концентрация кислорода в растворе при данной температуре T , k_1 – величина из формулы (5) отвечающая за скорость окисления GSH кислородом с образованием окисленного глутатиона – GSSG. Величина k_2 отвечает за дальнейшее окисление GSSG до неизвестных продуктов. Концентрации кислорода при используемых в работе температурах приведены в Таблице 1 [5]. В Таблице 1 введено специальное обозначение М – для определения молярной концентрации, определяемой как моль/литр.

Кинетические графики для трех температур, а также аппроксимирующие их кривые изображены на Рис.5-7.

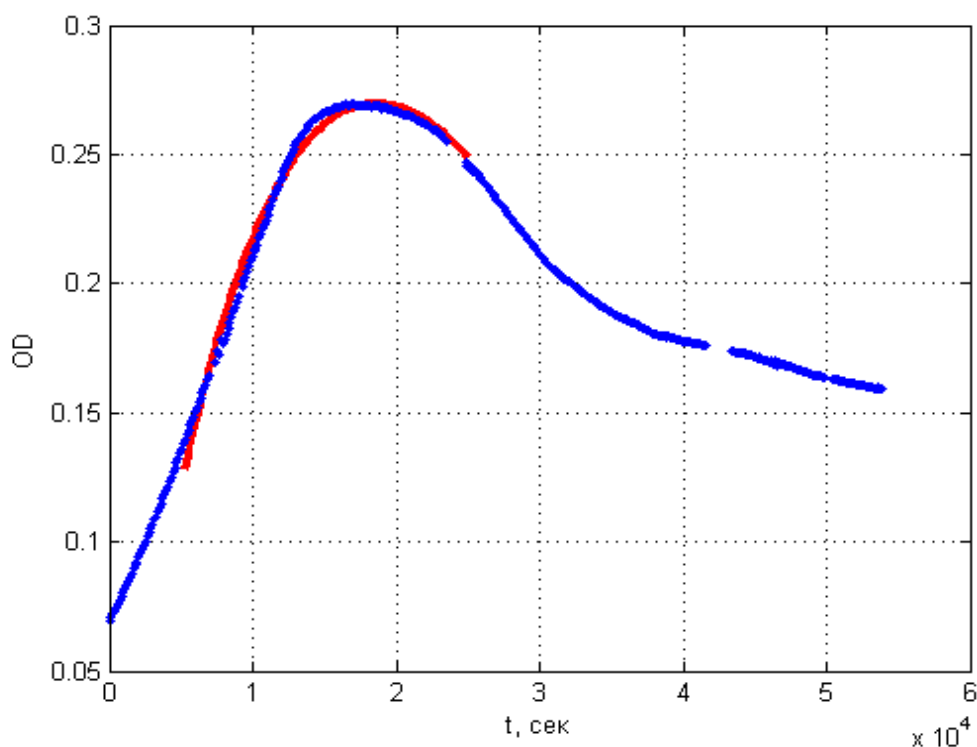


Рис. 5. Графики изменения оптической плотности от времени при $T = 25^\circ\text{C}$. OD – оптическая плотность раствора на 303 нм, t – время. Синие точки – практические измерения, красная кривая - аппроксимирующая кривая, построенная по формуле (3).

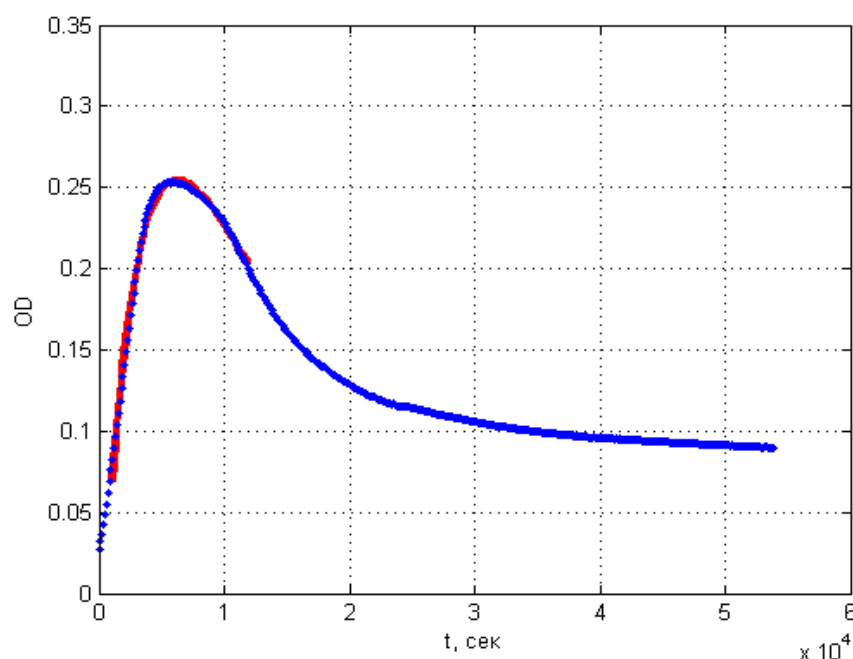


Рис. 6. Графики изменения оптической плотности от времени при $T = 40^{\circ}\text{C}$. OD – оптическая плотность на 303 нм, t – время. Синие точки – практические измерения, красная кривая - аппроксимирующая кривая, построенная по формуле (3).

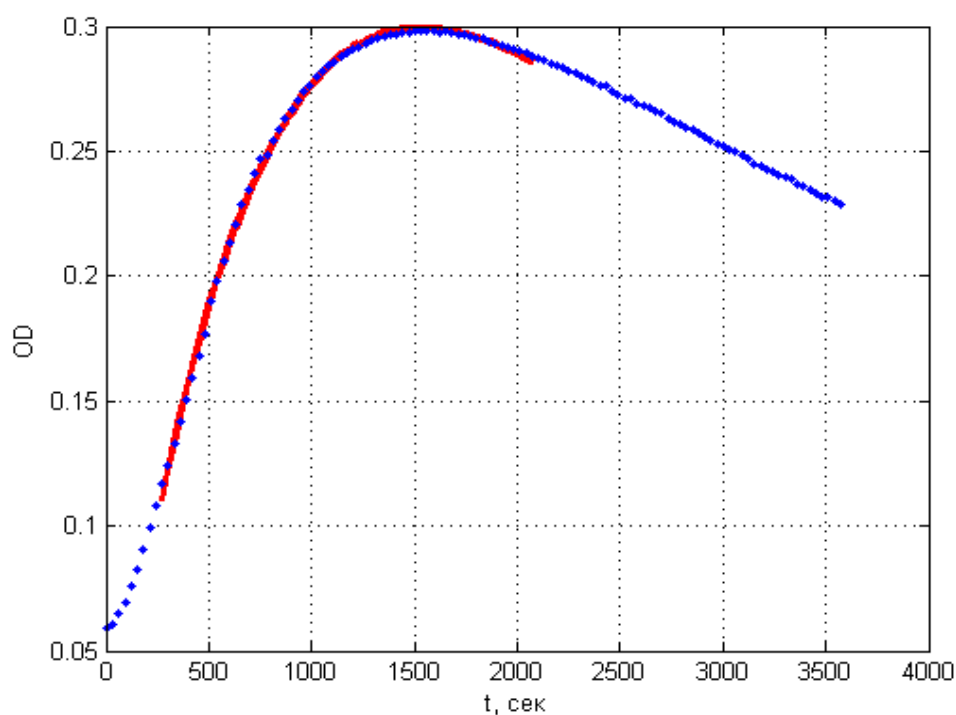


Рис. 7. Графики изменения оптической плотности от времени при $T = 70^{\circ}\text{C}$. OD – оптическая плотность на 303 нм, t – время. Синие точки – практические измерения, красная кривая - аппроксимирующая кривая, построенная по формуле (3).

Применив формулу (5), были получены константы скорости при соответствующих температурах: $K_{25} = 0.139 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{40} = 0.366 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{70} = 2.46 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Согласно уравнению Аррениуса:

$$K(T) = A * e^{-\frac{\Delta E}{RT}} \quad (6)$$

Где A – константа скорости реакции при стремлении температуры к бесконечности, характеризует частоту столкновений реагирующих молекул, T – температура, R – универсальная газовая постоянная, ΔE – энергия активации, энергия необходимая для протекания реакции между столкнувшимися частицами.

Из формулы (6) следует, что если построить график $\ln(K)$ от $1/T$ полученные точки должны лежать на одной прямой (Рис.8).

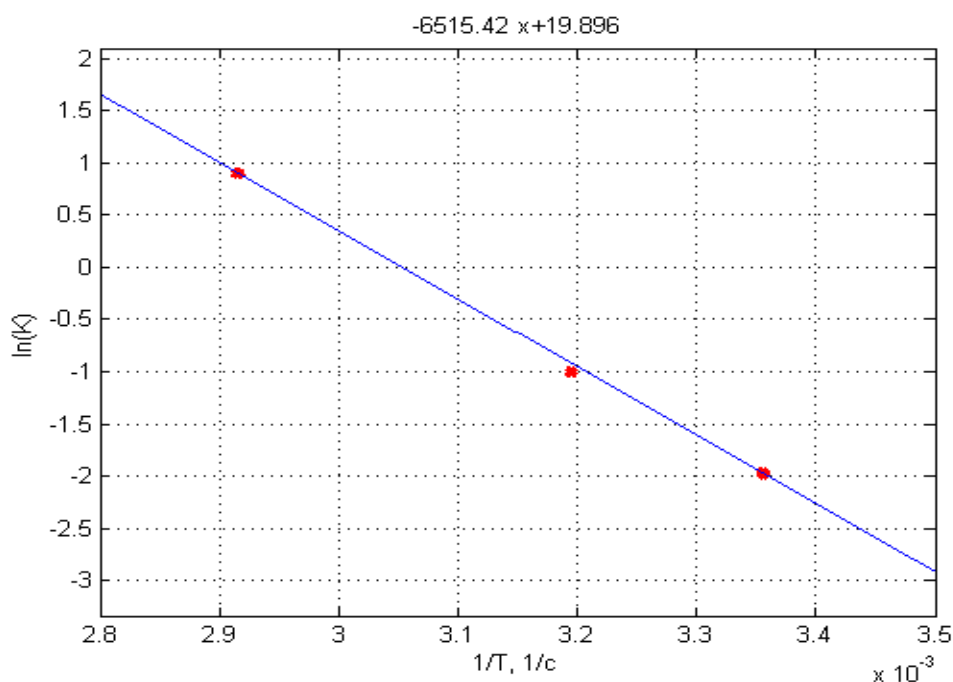


Рис. 8. Графики $\ln(K)$ от $1/T$. $\ln(K)$ – натуральный логарифм от значения константы скорости реакции, $1/T$ – обратная температура. Красные точки – практические измерения, синяя прямая – прямая изменения константы скорости в Аррениусовских координатах.

Исходя из формулы (7), если умножить тангенс угла наклона полученной прямой на универсальную газовую постоянную, то можно получить ΔE – энергию активации.

$$\ln(K) = -\frac{\Delta E}{R} * \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (7)$$

Используя, ранее полученные константы скорости реакции, вычислено значение энергии активации, для реакции окисления GSH, которое составило 54,1 кДж/моль.

4. Заключение

В проделанной работе, методом спектрофотометрии, установлена термическая устойчивость GSH в бескислородной среде вплоть до 70°C. По снятым кинетическим измерениям окисления GSH кислородом были найдены три константы скорости реакции при температурах 25, 40, 70 °C, их численные значения составили: $K_{25} = 0.139 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{40} = 0.366 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{70} = 2.46 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. На их основе, используя закон Аррениуса, найдена энергия активации реакции окисления GSH кислородом, равная 54,1 кДж/моль.

5. Список литературы

1. А. П. Крешков. Основы аналитической химии. Физико-химические (инструментальные) методы анализа, Изд. «Химия», 1970.
2. Схема взята с сайта www.studref.com
3. Зайдель А.Н., Островская Г.В., Островский Ю.И. “Техника и практика спектроскопии”, 1972.
4. Химическая энциклопедия, том 1, Изд. «Советская энциклопедия», 1988.
5. Зависимость концентрации кислорода в воде от температуры взята с сайта <https://dpva.ru/Guide/GuideMedias/GuideAir/AirSolubilityInWater/>