

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии наук»

КОНТРОЛЬНЫЙ ПИСЬМЕННЫЙ ПЕРЕВОД НАУЧНОГО ТЕКСТА ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ

04.06.01 – Наименование специальности

02.00.04 Наименование направления подготовки

Role of curcumin on the determination of the critical micellar concentration by absorbance, fluorescence and fluorescence anisotropy techniques

Роль куркумина в определении критической концентрации мицеллообразования методами абсорбции, флуоресценции и флуоресцентной анизотропии.

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 115 – 2012 – P. 9–15

Выполнил:

аспирант
Кушназарова Рушана
Абдурашитовна


Подпись, дата

Проверил:

Научный руководитель
Захарова Люция Ярулловна,
д.х.н., профессор


подпись

Принял:

Газизулина Лилия Рустемовна,
кандидат филологических наук,
доцент кафедры Иностранные
языки в профессиональной
коммуникации КНИТУ


подпись

Роль куркумина в определении критической концентрации мицеллообразования методами абсорбции, флуоресценции и методами флуоресцентной анизотропии.

Аннотация

Куркумин ($C_{21}H_{20}O_6$) является природным антиоксидантом, который имеет широкий спектр физиологических и фармацевтических действий. В данной работе, куркумин впервые используется для определение критической концентрации мицеллообразования (ККМ) как ионогенных, так и неионогенных ПАВ методами УФ-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии и флуоресцентной поляризационной анизотропии. Результаты исследований различных ПАВ согласованы с данными, полученными методами кондуктометрии, тензиометрии и калориметрии. Интенсивность поглощения и флуоресценции куркумина усиливаются в различных мицеллярных растворах. Профили интенсивности поглощения и флуоресценции в зависимости от концентрации поверхностно-активного вещества может быть описана сигмоидальной функцией для оценки ККМ исследуемых амфи菲尔ов. Тем не менее, мы обнаружили, что некоторые из профилей анизотропии сигмовидны в природе.

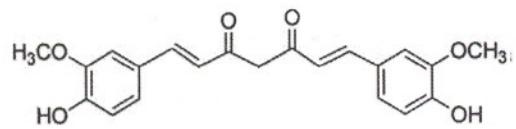
Ключевые слова: Куркумин, ККМ, УФ-спектроскопия, флуоресценция, анизотропия, кинетической уравнение Больцмана.

1. Введение

Известно, что ПАВ могут образовывать в растворе упорядоченные структуры после достижения определенной концентрации, называемой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), которая является важной характеристикой ПАВ. Почти все физические свойства раствора ПАВ

проявляют строгую зависимость от концентрации в области самоорганизации или мицеллообразования. ККМ ПАВ может быть определена с помощью различных методов, таких как: кондуктометрии, тензиометрии, флуориметрии, ультрафиолетовой и видимой спектрофотометрии, вискозиметрии, калориметрии и ЯМР. Среди этих методов, спектроскопические методы применены для определения ККМ с помощью красителя и других соединений в качестве зондов; самоабсорбция поверхностно-активных веществ в растворе также возможна.

Куркумин ранее использовали в качестве зонда для определения белка в реальных образцах. В этой работе куркумин впервые использовался в качестве зонда для определения ККМ различных ПАВ спектроскопически. Значения ККМ разных ПАВ были определены спектроскопически с использованием куркумина в качестве красителя и полученные результаты сравнивались со значениями, полученными другими методами. Куркумин 1,7-бис(4- гидрокси-3- метоксифенил)-1,6- гептадиен- 3,5-дион является основным ингредиентом в природе с желто-оранжевым пигментом (куркумиоиды), найденные в индийском пряном растении - куркума и в своем составе содержит две молекулы феруловой кислоты, связанных через метиленовый мостик у атома углерода карбоксильных групп. Куркумин является липофильной молекулой с фенольными группами и сопряженными двойными связями. Это фенольное соединение имеет широкую область применения в медицине. Структурная формула куркумина:



Куркумин привлек большой интерес недавно, потому что несколько экспериментальных исследований показали, что этот природный полифенол обладает противовоспалительным, антиоксидантным, анти-муковисцидозным, противоопухолевым, противораковым, заживляющим, антиангиогенным эффектом. Основной проблемой в использовании куркумина для лечения любого заболевания является его плохая растворимость в воде (20 мкг/мл),

которая может быть улучшена за счет увеличения рН раствора. Куркумин подвергается быстрому разложению под действием гидролиза с последующей молекулярной фрагментацией на продукты : транс-6-(40- гидрокси-30-метоксифенил)-2,4- диокси -5-гексенал, ванилин, феруловая кислота, ферулол метана. Разложение куркумина можно избежать путем инкапсуляции его в мицеллы ПАВ, тем самым заметно увеличив его биодоступность. Однако, использование куркумина в качестве зонда для определения ККМ ПАВ нигде не упоминалось. В этой статье изучение оптической плотности и флуоресценции куркумина проводилось в нескольких мицеллярных системах, включая катионные, анионные и неионные амфифилы для оценки ККМ, а также для исследования взаимодействия куркумина с амфифилом.

Для сравнения значений ККМ, полученные методами поглощения и флуоресценции, мы также использовали флуоресцентную поляризационную анизотропию для оценки ККМ с использованием куркумина в качестве флуорофора. Положение молекулы флуорофора в мицеллярных агрегатах может предсказать количество ориентированных диполей и может отражать характер и изменения окружения флуорофора в ансамбле ПАВ.

Удобство установления куркумина в качестве стандартной пробы для определения ККМ из зависимости интенсивности поглощения и флуоресценции от концентрации ПАВ очевидно, поскольку ККМ является самым важным параметром при исследовании мицелообразования ПАВ и позволяет упростить экспериментальные результаты, полученные разными методами. Все полученные экспериментальные данные анализируются и обсуждаются в условиях определения ККМ.

1.1 Реагенты

Куркумин из куркумы длинной (куркума) высокого качества является продуктом фирмы Sigma , а метанол является продуктом фирмы SRL (Индия). Анионные ПАВ додецилбензосульфонат натрия (ДБСН) и н-

додеканоилсарказинат натрия (ДДСН) были приобретены в фирме Sigma и додецилсульфат натрия (ДСН) из фирмы SRL (Индия). Катионные ПАВ: додецилtrimетиламмоний бромид (ДТАБ) и тетрадецилtrimетиламмоний бромид (ТДТАБ) являются продуктом фирмы Sigma, цетилtrimетиламмоний бромид (ЦТАБ) продукты фирмы Alfa Aesar и октадецилtrimетиламмоний бромид (ОДТАБ) продукт фирмы Fluka. Все некатионные ПАВ, поликсиэтилен(20)сорбитан монолаурат (Твин-20), поликсиэтилен(20)сорбитан монопальмитат (Твин-40), поликсиэтилен(20)сорбитан моностеарат (твин-60) и поликсиэтилен(20)сорбитан моноолеат (Твин-80) являются продуктами фирмы Sigma. Все ПАВ перед использование были осушены. Была использована бидистиллированная деионизированная вода для приготовления всех растворов.

1.2 Приготовление раствора куркумина

Исходный раствор куркумина (1 мг/мл в метаноле) был приготовлен путем добавления определенной навески куркумина в растворе метанола. Смесь обрабатывали ультразвуком для получения прозрачного раствора. Небольшое количество этого раствора растворяют в 2,5 мл воды для достижения экспериментальной концентрации раствора куркумина, где концентрация метанола была бы очень маленькой. Считается, что такая небольшая концентрация метанола не влияет на спектральное и самоагрегационное поведение амифифила.

2. Экспериментальные методы

Спектроскопия в УФ видимой области.

Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре УФ 1601 Shimadzu (Япония) с использованием 10 мм кварцевой кюветы. Спектры измерялись в диапазоне длин волн 200-600 мм.

Небольшое количество исходного раствора куркумина (8,4 мкл) было добавлено к 2,5 мл воды для достижения конечной концентрации куркумина 9 мкМ. Концентрированный раствор ПАВ был постепенно добавлен в водный раствор куркумина и спектры поглощения записывались после каждого добавления.

2.2 Исследования флуоресцентного излучения и анизотропии поляризации

Спектр и интенсивность флуоресцентного излучения и анизотропии, где в качестве флуоресцентного зонда был использован куркумин, были измерены на флуоресцентном спектрометре Perkin Elmer LS 55 с использованием 10 мм кварцевой кюветы. Исходный куркумин объемом 50 мкл был добавлен в 2,5 мл воды для достижения концентрации куркумина 53,1 мкМ. Спектры флуоресценции были записаны в диапазоне длин волн от 450 до 750 нм и с шириной щели испускания и излучения 10 нм. Концентрированный раствор ПАВ был постепенно добавлен в водный раствор куркумина и спектры испускания были записаны после спектров возбуждения. Скорость сканирования была 250 нм в минуту. Для измерения поляризации длина волны возбуждения и испускания были 423 нм и 553 нм соответственно. Значение анизотропии было принято как среднее из пяти последовательных значений. Температура образца перед каждым измерением должна была достигать 300 К.

3.Результаты и обсуждение

3.1 Спектры поглощения и излучения куркумина

Спектры поглощения и излучения куркумина в воде представлены на рисунке а и б. Максимум поглощения куркумина находится на длине волны 423 нм, а максимум излучения на 553 нм. Спектры поглощения куркумина при различных концентраций Твин - 40 и спектры флуоресценции куркумина также при различных концентраций Твин -80 , представлены на рисунке 1а и 1б. Максимум поглощения при различных концентрациях ПАВ (твин-40) находится на такой же длине волны (423 нм). Однако, на спектре

флуоресценции мицеллярного раствора наблюдается синее смещение от 553 до 527 при концентрации ниже ККМ, и спектр остается постоянным на длине волны 527 нм и при значениях выше ККМ. Поэтому для определения ККМ ПАВ измерение флуоресценции проводили при длине волны 527. Спектры других мицеллярных растворов не показаны для экономии места.

Значения ККМ представлены в таблице 1, в которой показаны соотношения значений, полученные разными методами.

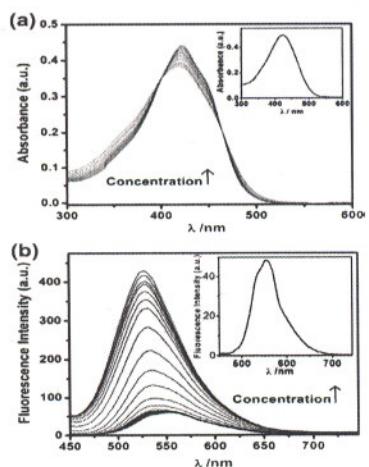


Рис.1(а) Спектр поглощения куркумина при различных концентрациях (0,00669-0,03282 mM) твин-40. Вставка: спектр поглощения куркумина в воде при 300 К.
(б) Спектр флуоресценции куркумина при различных концентрациях (0,00088-0,01856 mM) твин-80. Вставка: спектр флуоресценции куркумина в воде при 300 К.

На рисунке2 представлены спектры поглощения ДСН, ДТАБ и Твин-80 при концентрациях равных их собственному значению ККМ. Спектр куркумина в растворе ДТАБ демонстрирует структуру с двумя пиками (приблизительно в область 423 и 445 нм), но этот тип структуры спектра (за исключением области 423 нм) отсутствует в ДСН и воде. Отсутствие вибронной структуры в полосе поглощения куркумина указывает на то, что он энергично взаимодействует с молекулами воды на слое Штерна мицеллы ПАВ. Спектры поглощения

расположены в таком же порядке и полученных в тех же экспериментальных условиях: ДТАБ > Твин-40 > ДСН. Спектр флуоресценции амфифилов: ДБСН, ЦТАБ и Твин-60 при их концентрациях равных ККМ представлен на рис. 2б. Пики испускания мицеллярных растворов остаются почти такими же, но интенсивность варьируется в зависимости от системы к системе. Спектр ДБНС находился в промежутке между спектрами ЦТАБ и Твин-60. По сравнению с ДСН и Твин-60, куркумин в растворе ЦТАБ проявляет наиболее широкий спектр с пиком 525 нм. Вероятно, это произошло за счет того, что карбонильная группа куркумина связана с головной группой ЦТАБ.

На рис. 2с показано, что куркумин в растворе ЦТАБ дает пик поглощения на длине волны 336 нм и плечо графика на 423 нм при низкой концентрацией ЦТАБ. По мере увеличения концентрации ЦТАБ, пик поглощения на длине волны 366 нм теряет свою интенсивность и переходит в плечо, тогда как пик на 423 нм увеличивается, постепенно образуя четкий пик. При более высокой концентрации ЦТАБ, плечо на пике 366 нм исчезает и куркумин дает выраженный максимум спектра поглощения на 423 нм с плечом на длине волны 445.

Общеизвестно, что β -дикетонная группа куркумина может образовывать хелатный комплекс с металлами ионов. Таким образом, положительно-заряженная головная группа ЦТАБ электростатически взаимодействует с β -дикетонной группой куркумина, образуя комплекс ЦТАБ - куркумин. Это связывание уменьшается за счет сопряженных связей в ароматическом кольце в структуре куркумина. Как следствие, куркумин дает пик поглощения при длине волны 366 нм при низкой концентрации ЦТАБ. С увеличением концентрации, ЦТАБ постепенно покидает β -дикетонный группу куркумина из-за сильной гидрофобности ароматических колец куркумина. Таким образом, сопряженная структура куркумина восстанавливается, и это дает пик при длине волны 423 нм с исчезновением пика на длине волны 366 нм. ДТАБ и ТДТАБ также показывают этот спектр.

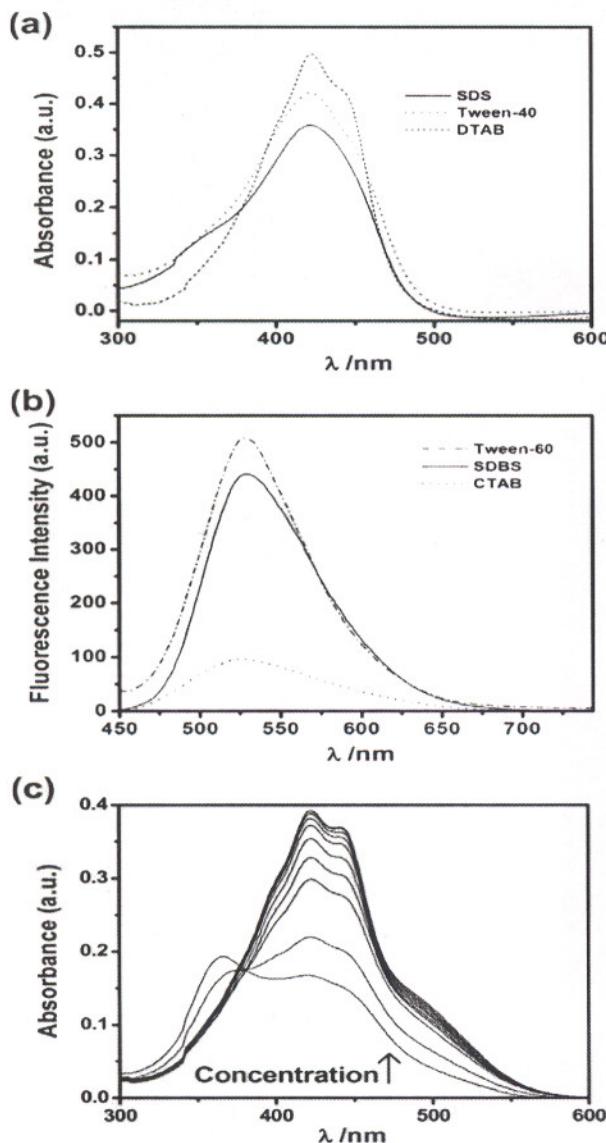


Рис.2(а) Спектр поглощения куркумина мицеллярных растворов ДНС, Твин-40 и ДТАБ при их ККМ. (б) Спектр флуоресценции мицеллярных растворов Твин-60, ДБНС и ЦТАБ при изх ККМ. (с) Спектр поглощения куркумина при различных концентрациях ЦТАБ при 300К.

3.2. Поглощение в растворе ПАВ

На рис.3а показан спектр поглощения куркумина в присутствии следующих ПАВ: ДНС, ДДСН и ДТАБ ,а на вставке - Твин-40 и Твин-80. Профили были сигмоидальны в действительности и в данной работе использовались для оценки ККМ путем постановки их в кинетическое уравнение Больцмана:

$$A = \frac{a_i - a_f}{x - x_0} + a_f$$

Переменная A соответствует значению поглощения куркумина, независимой переменной (x) является концентрация ПАВ, a_i и a_f соответственно начальными и конечными асимптотами сигмоиды, x_0 - центр сигмоиды, Δx - параметр, который характеризует крутизну функцию. Сигмоидальный график показывает значение ККМ в точке x_0 .

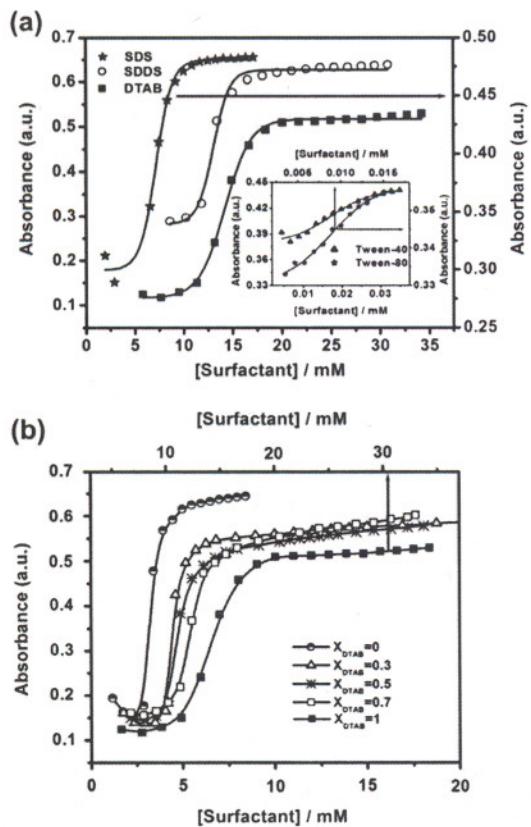


Рис.3(а) График зависимости оптической плотности от концентрации ПАВ ДНС, ДДСН и ДТАБ. Вставка: спектр поглощения ПАВ Твин-40 и Твин-60. (б) спектр поглощения от концентрации ПАВ при разных молярных соотношения ДТАБ и ТТАБ при 300К.

К дополнению к рис.3а также представлены иллюстрации зависимости сигмоидального поглощения от концентрации ПАВ для катионных смешанных мицелл при разных мольных соотношениях ДТАБ и ТТАБ (рис.3б). Известно, что смешанные мицеллярные системы обладают большей солубилизационной

емкостью, чем одиночная мицеллярная система, так катионные смешанные мицеллярные системы ДТАБ и ТТАБ могут обеспечить более гидрофобную микросреду для куркумина, чем одиночная мицеллярная система, в результате повышается поглощение куркумина в смешанных мицеллярных системах. Значение ККМ системы, полученное этим методом совпадает с результатами электропроводности, поверхностного натяжения и изотермического калориметрического титрования, значения представлены в таблице 2. Значения для смешанных мицеллярных систем, содержащие в себе ЦТАБ и ТТАБ не были представлены для экономии места. В таблице 3 приведены значения ККМ этих систем при различных мольных соотношения ЦТАБ.

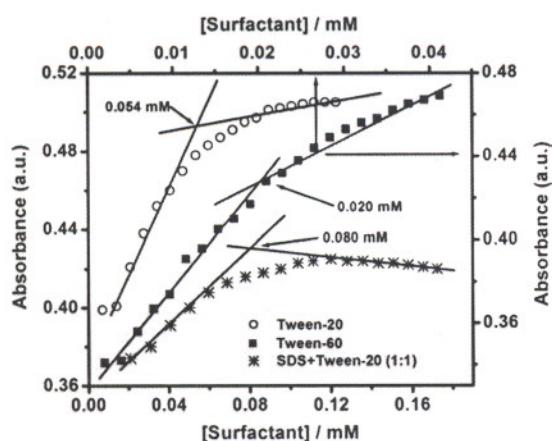


Рис.4 Зависимость спектра поглощения куркумина от разных концентраций ПАВ: Твин-20, Твин- 60 и эквимолярной смеси ДСН и Твин-20, T=300К.

На рис. 4 показана зависимость пика поглощения куркумина от ПАВ Твин-20 и Твин-60. Значение ККМ было определено по излому. Предмицеллярная область имеет наибольший уклон чем постмицеллярная. Эти значения ККМ были приведены в таблице 1. Если мы попытаемся определить ККМ согласно кинетическому уравнению Больцмана, то мы можем получить значение в точке x_0 , которое сильно отличается от фактического значения. В результате мы определяем ККМ путем проведения касательных, которое точно соответствует литературным значениям, полученные поверхностным натяжением , микрокалориметрическими методами и т.д. В случае смеси ДСН и Твин-20 мы

получаем значение ККМ по похожему излому, но что интересно, предмицеллярный наклон положительный, а постмицеллярный наклон отрицательный. После ККМ, из-за взаимодействия анионной головной группы ДСН с полиоксиэтиленовой группой Твин-20, куркумин не может войти в гидрофобное ядро мицеллы, вследствие чего уменьшается оптическая плотность. Значение ККМ было показано в таблице 4.

3.3 Излучение в растворе ПАВ

На рис.5а показаны зависимости интенсивности излучения от ПАВ ТТАБ, ДСН, ДБСН, ДТАБ и на вставке: Твин-40, Твин-60 и Твин-80. Профили графиков имеют сигмоидальный характер. Так с помощью кинетического уравнения Больцмана были вычислены значения ККМ и представлены в таблице 1. На рис.5 показано, что интенсивность флуоресценции среди ионогенных ПАВ является самой низкой для ДБСН, а среди неионогенных ПАВ- Твин-80. Здесь, Значение ККМ было определено путем проведения двух касательных на предмицеллярной и постмицеллярной областях. Ниже значения ККМ, интенсивность флуоресценции практически не зависит от концентрации ПАВ, и выше значения ККМ, она быстро растет за счет увеличения солюбилизации куркумина, в результате которой происходит образование ионных комплексов за счет электростатического взаимодействия в более гидрофобной микроокружении смешанных мицеллярных систем ДСН/ Твин-20. Тип графика, полученный для ОДТАБ не показан из-за экономии места. Значения ККМ различных бинарных смесей представлены в таблице 4 и сравниваемые со значениями ККМ, полученными другими методами.

Аналогично, для значений ККМ бинарных смесей анионных ПАВ ДСН и ДБСН в таблице 5 были продемонстрированы методы поглощения и флуоресценции от различных мольных долях ДНС (α ДНС).

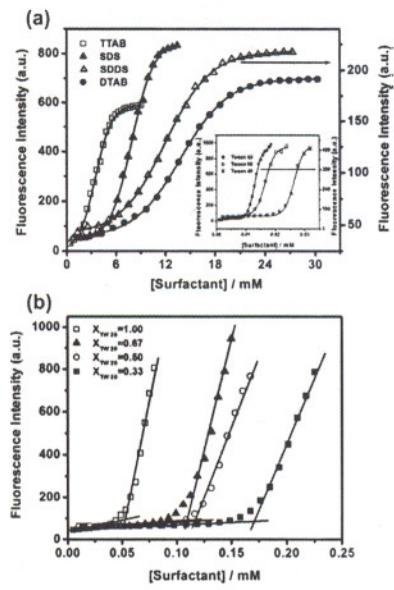


Рис.5 (а) Зависимость интенсивности флюоресценции от концентрации ПАВ ТТАБ, ДСН, ДДСН и ДТАБ. Вставка: интенсивность флуоресценции от ПАВ Твин-80, Твин-60 и Твин-40. (б) Влияние интенсивности флуоресценции куркумина от разных мольных соотношений смешанных мицелл Твин-20 и ДСН при 300 К.

3.4. Поляризационная анизотропия флуоресценции в растворе ПАВ

Анизотропия флуоресценции определяется по формуле:

$$r = \frac{(I_v - GI_h)}{(I_v + 2GI_h)}, \text{ где}$$

I_v и I_h соответственно флуоресцентные интенсивности вертикально и горизонтального поляризационного излучения, где образец возбуждается вертикальным поляризационным светом.

G - коэффициент, отношение чувствительности детекторной системы для вертикального и горизонтального поляризационного света.

Анизотропия должна показать значительное различие (0.1 или более) от значения базовой линии (т.е. в водном растворе без добавления ПАВ) при более высоких соотношениях концентраций ПАВ для получения точных результатов. На рис.6 показана зависимость анизотропии от различных

концентрации ПАВ ТТАБ, ДСН и ДДСН. Профили графиков сигмоидальны; резкое изменение анизотропии приводит к значению ККМ, которое вычисляется с помощью кинетического уравнения Больцмана. Значение анизотропии увеличивается с увеличением концентрации ПАВ. Это отражает изменение в среде куркумина. С увеличением концентрации ПАВ, куркумин может связываться с молекулами ПАВ, имеющие тенденцию к вращательному движению куркумина, которое дает более высокие значения анизотропии.

При ККМ куркумин солюбилизируется в гидрофобное ядро мицеллы. В случае Твин-40, Твин-60 и ОДТАБ анизотропия уменьшается с ростом концентрации ПАВ с низкой ККМ и выравнивается при высокой ККМ. Эти ПАВ имеют низкие значения ККМ по сравнению с другими ПАВ. Возможно, с увеличением концентрации амфифила тенденции связывания куркумина с амфифилом становится незначительной, что приводит к снижению анизотропии. При ККМ куркумин становится солюбилизованным, что приводит к более низкой микровязкости. Но куркумин не может определить значения ККМ растворов ДТАБ, ЦТАБ, ДДНС и Твин-80, что не соответствует флуорофору, куркумин как зонд по отношению к этим ПАВ определяет ККМ. Поэтому что показанные фотофизические свойства чувствительны к окружающим условиям. Анизотропия зависит от ориентации флуорофора. В растворах ДТАБ, ЦТАБ, ДБСН и Твин-20 флуорофор в куркумине принимает то положение, которое не чувствует морфологические изменения в мицеллярных агрегатах. Таким образом, мы не можем измерить ККМ методом анизотропии с использованием одиночного зонда, как это повторялось ранее.

Заключение

В данной работе установлено, что как одиночный, так и смешанный раствор ПАВ может значительно увеличить спектр поглощения и интенсивность флуоресценции куркумина. Эти измерения свидетельствуют о роли

гидрофобного взаимодействия куркумина между мицеллярной системой. Результаты поглощения и излучения куркумина в различных растворах ПАВ доказали совпадение значений ККМ с данными, полученными другими методами. Таким образом, эти методы могут использоваться для определения ККМ ПАВ с использованием антиоксиданта. Куркумин может быть использован в качестве флуорофора в качестве измерения поляризационной флюоресценции для определения ККМ ПАВ и изучения взаимодействия между ними.