

POWSTAWANIE SUBSTANCJI PARAHUMUSOWYCH Z PURPUROGALINY

M. Lipski

Zakład Radio- i Fotochemii, Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej,
Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska
ul. Piotrowo 3, 60-965 Poznań
e-mail: mlipski@sol.put.poznan.pl

Streszczenie. Na podstawie danych literaturowych można przypuszczać, że purpurogalina (2,3,4,6-tetrahydroksy-5H-benzocyklohepten-5-on, hydroksybenzotropolon) i jej analogi powstałe z polifenoli mogą być prekursorami najbardziej złożonych związków pochodzenia naturalnego – substancji humusowych. W celu potwierdzenia takiej ewentualności przeprowadzono autoutlenianie purpurogaliny do substancji parahumusowych. Proces utleniania był kontrolowany za pomocą spektroskopii: absorpcyjnej UV-VIS i EPR. Zaproponowano ogólny schemat przemian, jakim ulega purpurogalina.

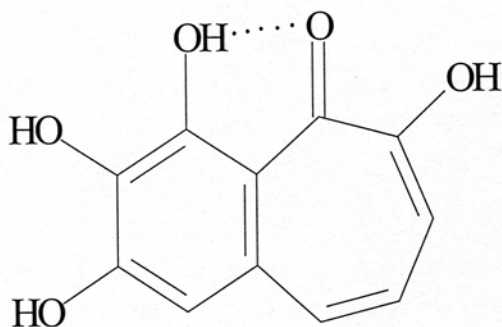
Słowa kluczowe: substancje parahumusowe, hydroksybenzotropolony, wolne rodniki.

WSTĘP

Cząsteczka purpurogaliny PPG (Rys. 1, PPG = 2,3,4,6-tetrahydroksy-5H-benzocyklohepten-5-on, hydroksybenzotropolon) zawiera niezwykle 7-członowy węglowy aromatyczny pierścień tropolonowy (liczba zdelokalizowanych elektronów = 6, czyli spełniona jest reguła Hückla $4n+2$) oraz pierścień benzenowy.

PPG cechuje silna absorpcja w zakresie UV-Vis, znana dla układu hydroksybenzotropolonowego. PPG jest słabym fluoroforem, po przejściu interkombinacyjnym ISC występuje fosforescencja, natomiast produkty utleniania PPG

w środowisku zasadowym są silnymi fluoroforami [10,12,13]. Rola fizjologiczna purpurogaliny związana jest z kancerogennością roślinną. PPG występuje jako purpurowy pigment w galasówkach (*Cecidia*, *Galla*) na liściach *Quercus pendunculata*, *Salix fragilis*, *Ciprinus betulus* oraz w korach w formie glukozydów i gra rolę aktywnego cytoprotektora [9]. PPG ma właściwości antyutleniające [3]. Jest zmiataczem wolnych rodników – reaktywnych form tlenu ROS generowanych przez różnopostaciowe leukocyty [6] oraz przez trzy typy ludzkich komórek tkanek narządów sercowo-naczyniowych [14]. PPG ma zdolności chelatujące kationy żelaza (II) i tłumiące powstawanie rodników OH^\cdot w reakcji Fentona.



Rys. 1. Struktura purpurogaliny (PPG) z wiązaniem wodorowym pomiędzy -OH i O=.

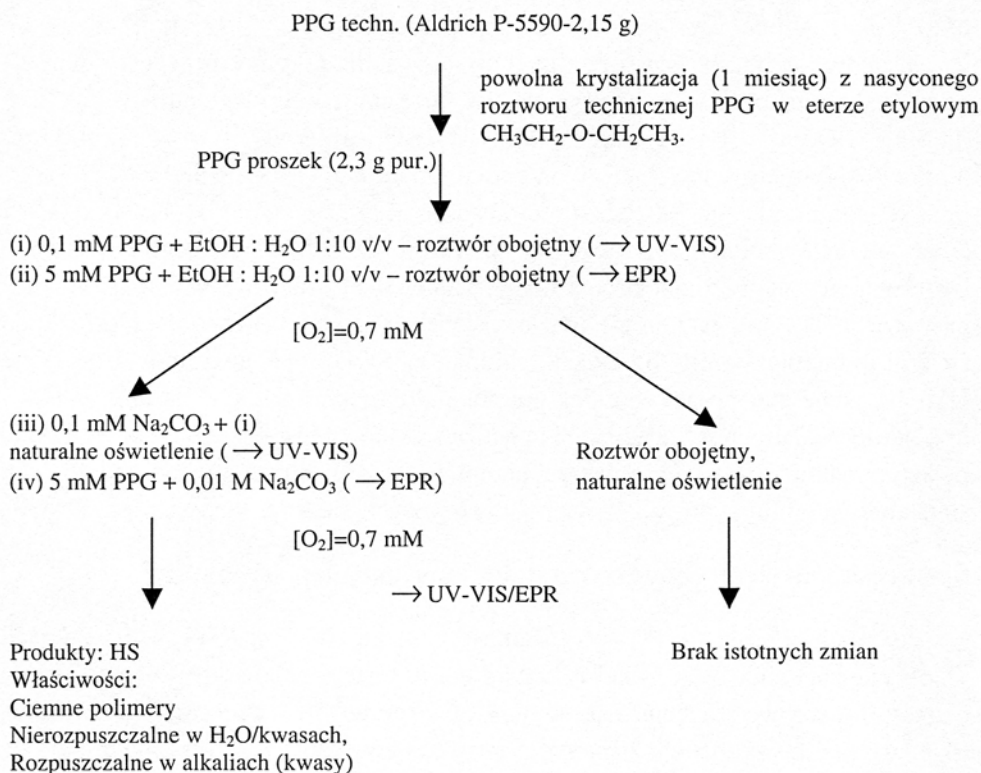
Fig. 1. The structure of purpurogallin (PPG) with hydrogen bond between -OH and O=.

Badanie reakcji skomplikowanych wielkocząsteczkowych naturalnych biopolimerów, takich jak substancje humusowe (HS), napotyka na poważne trudności zarówno metodyczne, jak i interpretacyjne [7]. O wiele łatwiej jest badać uproszczony układ modelowy (modelowe substancje parahumusowe), posiadający jednak podstawowe cechy HS. Takim układem mogą być parahumusowe polimery powstałe podczas utleniania/polikondensacji hydroksybenzotropolonów, których przykładem jest występująca w środowisku naturalnym PPG. Reakcje tego typu modelowych HS z czynnikami środowiskowymi (promieniowanie UV: A, B, C, tlen, ozon etc.) są zatem symulacjami procesów naturalnych, uzyskane wyniki dają obraz rzeczywistych oddziaływań, jakim ulegają podjednostki naturalnych HS.

Nie znamy jednak dotychczas odpowiedzi, czy i w jaki sposób, parahumusowe biopolimery- HS zawierające układ tropolonowy, tworzą się z PPG w środowisku naturalnym. Niniejsza praca stanowi próbę odpowiedzi na powyższe pytania.

MATERIAŁY I METODY

W celu potwierdzenia możliwości tworzenia modelowych HS z prekursora – PPG i zbadania przebiegu tej reakcji przeprowadzono autoutlenianie PPG (w środowisku zasadowym) do HS w warunkach laboratoryjnych. Do obserwacji i analizy przebiegu reakcji użyto następujących technik spektroskopii molekularnej: spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis (spektrofotometr Jasco V-530) oraz spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR (spektrometr Bruker 300E z rezonatorem mikrofal 9105TM274). Eksperyment przeprowadzono według z góry określonego schematu (Rys. 2). Użyte odczynniki pochodziły z POCh Gliwice, Poland (puriss.), poza PPG⁻ (Aldrich P-5590-2, techn.).



Rys. 2. Schemat eksperymentu.

Fig. 2. The scheme of experiment.

WYNIKI I DYSKUSJA

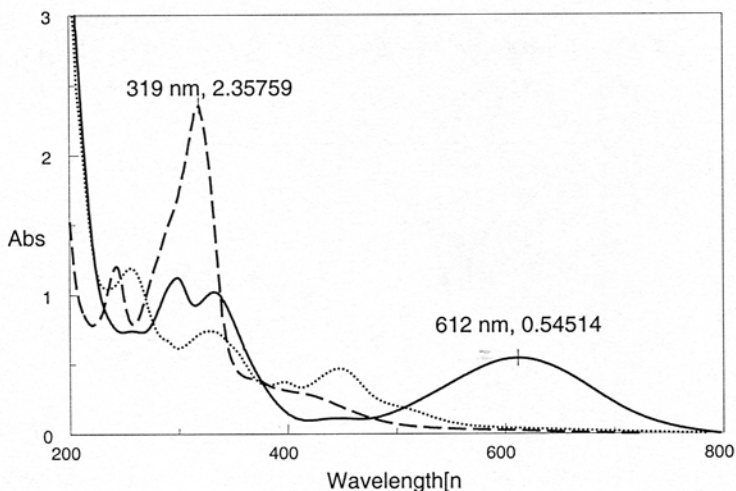
Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS

W widmie absorpcyjnym UV-Vis PPG (obojętny roztwór 0,1 mM PPG w EtOH : H₂O 1:10 v/v) można zaobserwować dwa maksima absorpcyjne (Rys. 3.1). Najsilniejsze maksimum występuje przy $\lambda_{max} = 319$ nm, absorbancja $A = 2,36$. Odpowiada to następującej interpretacji: wskutek koniugacji i sprzężenia chromoforów z π - elektronami pierścieni: benzenowego i tropolonowego mamy do czynienia z przesunięciem batochromowym w stronę fal dłuższych, i wówczas najsilniejsza absorbcja przy $\lambda = 319$ nm odpowiada przejściu $\pi \rightarrow \pi^*$ dla C=O - chromoforu sprzężonego z π - elektronami pierścieni: benzenowego i tropolonowego. Normalnie, bez sprzężenia, absorbcja $\pi \rightarrow \pi^*$ C=O występuje przy λ ok. 250 nm. Występują też słabsze pasmo absorpcji ~ 243 nm, jednak nie jest jasne, z powodu złożonej koniugacji i sprzężenia chromoforów z π - elektronami, jakiemu przejściu odpowiada. W trakcie reakcji autoutleniania PPG (0,1 mM PPG w 0,1 mM Na₂CO₃, EtOH : H₂O = 1:10 v/v, [O₂] = 0,7 mM) po 3 min. obserwujemy (Rys. 3.2) tworzenie intermediatu o barwie niebieskiej – rodnika semichinonowego SQ, najsilniej absorbującego przy $\lambda = 612$ nm, $A = 0,545$ (stąd wynika niebieska barwa SQ jako odpowiednia barwa dopełniająca). Obserwujemy wtedy zmniejszenie maksymalnej absorbancji z $A = 2,36$ do $A = 1,0$ przy $\lambda_{max} = 319$ nm. W miarę postępu reakcji (Rys. 3.3) barwa z niebieskiej staje się żółto-brunatna, wolny rodnik semichinonowy SQ zanika, a widmo absorpcyjne UV-VIS staje się coraz bardziej podobne do monotonicznych widm UV-Vis uprzednio badanych HS [2,6,7,11]. Można zatem przypuszczać, że w trakcie postępu reakcji SQ ulega dalszym przemianom prowadzącym do modelowych substancji parahumusowych, zawierających pierścienie tropolonowe.

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR

Jak nadmieniono, PPG ulega autoutlenianiu w zasadowych roztworach w obecności tlenu. Taki układ (5 mM PPG w 0,01 M Na₂CO₃, [O₂] = 0,7 mM) cechuje niezerowa koncentracja spinów elektronowych i widoczny sygnał EPR (Rys. 4), ponieważ reakcja zachodzi poprzez intermediat - rodnik semichinonowy SQ, co potwierdzają także widma absorpcyjne UV-VIS (Rys. 3.2).

Otrzymane widmo EPR (Rys. 4) autoutlenianej PPG odpowiada semichinonom [1,4]. Obserwujemy charakterystyczne rozszczepienia będące wynikiem oddziaływania niesparowanego spinu elektronowego na SQ z protonami -H.



Rys. 3.

1. Widmo absorpcyjne UV-Vis PPG, obojętny roztwór 0,1 mM PPG w EtOH : H₂O 1:10 v/v (linia przerywana).
2. Roztwór PPG + 0,7 mM [O₂] + 0,1 mM Na₂CO₃, po 3 min. od rozpoczęcia reakcji autoutleniania PPG. Maksimum absorpcji przy 612 nm odpowiada wolnemu rodnikowi semichinonowemu SQ[•] o barwie ciemnoniebieskiej (linia ciągła).
3. Widmo absorpcyjne po 60 min od rozpoczęcia reakcji autoutleniania PPG, ogólnie przypominające widma kwasów humusowych (linia wykropkowana).

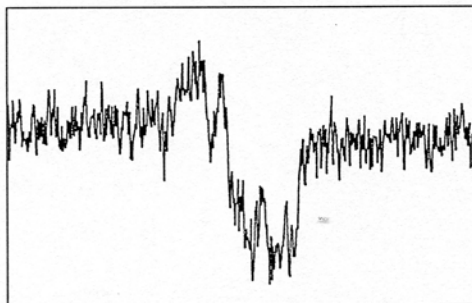
Fig. 3.

1. Absorption spectrum of purpurogallin (PPG) in EtOH : H₂O = 1:10 v/v solution [PPG]=0.1 mM (dash line).
2. PPG + 0.7 mM O₂ + 0.1 mM Na₂CO₃ solution 3 min after the redox reaction initiation. The absorption maximum at 612 nm corresponds to the deep-blue PPG-semiquinones (solid line).
3. Absorption spectrum 60 min after the reaction initiation, resembling that of humic acids or melanins (dots).

Należy zaznaczyć, że oddziałujące protony –H są nierównocenne. Protony –H z pierścieni (C–H) oddziałują bez przeszkód z niesparowanym spinem elektronowym na SQ[•]. Protony –H z grup –O–H oddziałują z niesparowanym spinem elektronowym na SQ[•], jednak oddziaływanie to ogranicza wiązanie wodorowe z tlenem (H^{•••}O=C) [1,4,12].

Po dłuższym czasie autoutleniania PPG otrzymujemy uśredniony, bez rozszczepień, singlet EPR zbliżony do widm EPR HS, które posiadają wewnętrzne wolne rodniki [5-7,11]. Podobieństwo widm substancji parahumusowych

powstałych w wyniku autoutleniania PPG z naturalnymi HS potwierdzają następujące parametry: wartości czynnika rozszczepienia giromagnetycznego g dla autoutlenianej PPG (0,1 mM PPG w 0,1 mM Na_2CO_3 , EtOH : $\text{H}_2\text{O} = 1:10$ v/v, $[\text{O}_2] = 0,7$ mM): 2,003-2,004.



Rys. 4. Widmo EPR PPG-semichinononu SQ^{\cdot} powstającego w reakcji 5 mM PPG z $[\text{O}_2] = 0,7$ mM w 0,01 M roztworze Na_2CO_3 , 4 min. po zmieszaniu. Zakres: 336,5-334 mT. "Gain": $2 \cdot 10^4$. Stała czasowa.: 20,48 ms, modulacja amplitudy: 1,013 G.

Fig. 4. The EPR spectrum of PPG-semiquinone formed during the reaction of 5 mM PPG with $[\text{O}_2] = 0.7$ mM in 0.01 M Na_2CO_3 solution, 4 min after mixing. Range: 336.5-334 mT. Gain: $2 \cdot 10^4$. Time const.: 20.48 ms, mod. amplitude: 1.013 G.

Dla porównania: wartość czynnika rozszczepienia giromagnetycznego g dla swobodnego elektronu wynosi 2,0023. Różnice w wartości g dla SQ^{\cdot} z PPG od wartości g dla swobodnego elektronu wynikają z wpływu magnetycznego orbitalnego momentu pędu elektronu na SQ^{\cdot} z PPG oraz z oddziaływania rozpuszczalnika.

Szerokość linii $\Delta B_{pp} = (0,1 - 0,2)$ mT przy nieprzemodulowanym sygnale EPR, co świadczy o delokalizacji elektronów w SQ^{\cdot} .

Dla HS, uprzednio wyznaczone wartości $g = 2,0039 \pm 0,0002$, $\Delta B_{pp} = 0,11 \pm 0,01$ mT [2,5-7,11].

Wartości g zostały obliczone z podstawowego warunku rezonansu: $h\nu = g \mu_B B$ (h - stała Plancka, ν - stała częstość mikrofal, g - czynnik rozszczepienia giromagnetycznego, μ_B - magneton Bohra, B - natężenie pola magnetycznego zmieniane w granicach 334,0 – 336,5 mT).

Porównanie widm EPR autoutlenianej PPG z HS i ich charakterystycznych parametrów wskazuje na powstawanie paramagnetycznych modelowych HS (zawierających siedmioczłonowe aromatyczne struktury tropolonowe) z utlenianej PPG. Wynika z tego wniosek, iż naturalne HS mogłyby także zawierać struktury tropolonowe.

Należy zauważyć, że czysta, stała PPG charakteryzuje się brakiem własnego sygnału pochodzącego od wolnych rodników semichinonowych. Wynika to również z przesłanek teoretycznych, bowiem struktura PPG wskazuje na układ typu diamagnetycznego, ze wszystkimi elektronami w pełni sparowanymi.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można zaproponować następujący ogólny mechanizm przemian PPG do substancji parahumusowych:

I. Wytworzenie rodników semichinonowych SQ \cdot z PPG – poprzez utlenianie PPG w środowisku alkalicznym, w obecności tlenu.

II. Następuje rekombinacja, przy czym są prawdopodobne dwie możliwości :

1. możliwość SQ \cdot + SQ \cdot $\xrightarrow{\text{rekombinacja}}$ dimer (SQ-SQ), bez powstania HS,
2. możliwość SQ \cdot + SQ \cdot $\xrightarrow{\text{dysmutacja}}$ PPG + chinon PPG.

III. Dalej następuje polimeryzacja:

chinon PPG \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow substancje parahumusowe (polimery PPG).

Prawdopodobnie taki mechanizm przebiega z udziałem reakcji enzymatycznych i katalitycznych (powierzchnie minerałów) w środowisku naturalnym, wymaga to jednakże dalszych badań.

PIŚMIENNICTWO

1. **Głębska J., Gwoździński K.:** Rodniki semichinonowe jako produkty pośrednie reakcji w układach biologicznych. *Curr. Topics Biophys.*, 22 suppl. C, 27-55, 1998.
2. **Górski Z., Lipski M., Sławińska D., Sławiński J.:** UV-C induced photodegradation of humic acids. XVIIIth International Conference on Photochemistry, 3P37, Warszawa, 1997.
3. **Jovanovic S. V., Hara Y., Steenken S., Simic M. G.:** Antioxidant potential of theaflavins. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5337-5343, 1997.
4. **Kirmse R., Stach J.:** Spektroskopia EPR. Zastosowania w chemi. UJ Kraków, 1994.
5. **Lipski M., Manikowski H., Sławiński J.:** Changes in the EPR signal of UV-C-irradiated humic acids, Application of magnetic resonance in chemistry and related areas. Warszawa, C-10, 1997.
6. **Lipski M., Sławiński J., Manikowski H., Górski Z.:** Chemiluminescence and spectroscopic properties of oxidated humic acids. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 9: A 87, 1997.
7. **Lipski M., Sławiński J., Zych D.:** Changes in the Luminescent Properties of Humic Acids - Induced by UV-Radiation. *J. Fluoresc.*, 9, 133-138, 1999.
8. **Prasad K., Kapoor R., Lee P.:** Purpurogallin, a scavenger of polymorphonuclear leukocyte-derived oxyradicals. *Mol. Cell. Biochem.*, 139, 27-32, 1994.

9. **Rootman D. S., Bindish R., Zeng L. H., Hasany S. M., Wu T. W.:** Purpurogallin as a cytoprotector of cultured rabbit corneal endothelium. *Can. J. OptHSImol.*, 29, 220-223, 1994.
10. **Ślawińska D., Lichszeld K., Michalska T.:** Singlet Oxygen and Chemiluminescence in Autooxidation of Pyrogallol. *Polish. J. Chem.*, 52, 1729-1740. 1978.
11. **Ślawiński J., Lipski M., Górski Z.:** Fotoliza substancji humusowych i melanin inicjowana promieniowaniem UV i jej skutki ekologiczne. XI Zjazd P. Tow. Badań Radiacyjnych, Siedlce, PN13, 153-156, 1998.
12. **Ślawiński J., Szczodrowska B., Włodarczyk-Graetzer M.:** Studies on the chemiluminescence of the system: purpurogalline-peroxidase-hydrogen peroxide. *Acta Biochim. Polon.*, 20, No 2, 119-132, 1973.
13. **Ślawiński J.:** Chemiluminescence in the process of oxidative ring-opening of purpurogallinoquinones. *Photochem. Photobiol.*, 13, 489-497, 1971.
14. **Wu T., Zeng L., Wu J., Fung K., Weisel R., Hempel A., Camerman N.:** Molecular Structure and antioxidant specificity of purpurogallin in three types of human cardiovascular cells. *Biochem. Pharm.*, 52, 1073-1080, 1996.

THE FORMATION OF PARAHUMUS SUBSTANCES FROM PURPUROGALLIN

M. Lipski

Department of Radio- & Photochemistry, Institute of Chemistry and Technical Electrochemistry,
Faculty of Chemical Technology, Poznań University of Technology
Piotrowo 3, 60-965 Poznań
e-mail: mlipski@sol.put.poznan.pl

Summary. There are literature data suggesting that the purpurogallin (2,3,4,6-tetrahydroxy-5H-benzocyclohepten-5-one, hydroxybenzotropolone) and its analogues formed from the polyphenols can be precursors of the most complex natural compounds - humus substances. In order to verify this possibility the autooxidation of purpurogallin to parahumus substances has been performed. The oxidation process has been assayed by means of UV-VIS absorption and EPR spectroscopy. The general scheme of the complex transformation of purpurogallin has been projected.

Key words: parahumus substances, tropolones, free radicals.