

УДК 577.152.192.31;547.99

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА С УЧАСТИЕМ БИЛИРУБИНОКСИДАЗЫ

© 2015 М.Е. Хлупова¹, И.С. Васильева¹, Г.П. Шумакович¹,
О.В. Морозова¹, В.А. Чертков², А.К. Шестакова³,
А.В. Кисин³, А.И. Ярополов^{1*}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071
Москва; факс: +7(495)954-2732,
электронная почта: yaropolov@inbi.ras.ru

² Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991
Москва; факс: +7(495)932-5846,
электронная почта: vchertkov@hotmail.com

³ Институт химии и технологии элементоорганических
соединений, 105118 Москва; факс: +7(495)913-2538,
электронная почта: alshestakova@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.07.14
После доработки 10.09.14

Дигидрокверцетин (или таксифолин) — один из важнейших представителей флавоноидов, в большом количестве присутствует в лиственнице сибирской. Исследована окислительная полимеризация дигидрокверцетина (ДГК) с участием билирубиноксидазы (БОД) в качестве биокатализатора и изучены некоторые физико-химические свойства полученных продуктов. При оптимальных условиях синтеза в результате ферментативной реакции образуются олигомеры ДГК (олигоДГК) с мол. массой 2800 и индексом полидисперсности 8,6. ОлигоДГК растворимы в диметилсульфоксиде (ДМСО), диметилформамиде (ДМФА) и метаноле. УФ-видимые спектры олигоДГК в ДМСО указывают на наличие системы сопряженных связей. Синтезированные олигоДГК были охарактеризованы методами ЯМР и ИК-спектроскопии. Сравнение спектров ЯМР олигоДГК с мономером и родственными флавоноидами показало, что полимер имеет нерегулярную структуру, образующуюся в результате ферментативного окисления ДГК с последующей неселективной радикальной полимеризацией. По сравнению с мономером олигоДГК имеют более высокую термостабильность и обладают высокой антиоксидантной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дигидрокверцетин, ферментативная полимеризация; билирубиноксидаза, олигомеры, спектры ЯМР ¹H и ¹³C.

Антиоксиданты осуществляют защиту клеток от повреждающего воздействия свободных радикалов. В последние годы несмотря на то, что антиоксидантные свойства природных фенольных соединений (флавоноидов и фитоалексинов) были известны давно, наблюдается большой интерес к их модификации [1–5]. Это обусловлено не только поиском новых соединений с

улучшенными антиоксидантными свойствами, но и появившимися сведениями о проявлении этими соединениями широкого спектра фармакологических эффектов, среди которых особый интерес представляют противоопухолевые, антивирусные, антимикробные, противовоспалительные, ангиопротекторные свойства [6–9]. Кроме того, в литературе приведены данные, которые свидетельствуют о том, что высокомолекулярные полифенольные природные соединения проявляют более выраженные биологические эффекты по сравнению с их мономерами [10–13]. Известно, что низкомолекулярные флавоноиды и фитоалексины разлагаются в организме в течение нескольких часов, в то время как их полимерные производные имеют более длительное время жизни [12].

Принятые сокращения: DPPH[•] – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил радикал; АБТС – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота); БОД – билирубин-оксидаза; ДГК – дигидрокверцетин; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМФА – диметилформамид, олигоДГК – олигомеры дигидрокверцетина; ТГА – термогравиметрический анализ.

* Адресат для корреспонденции.

Флавоноиды – это природные фенольные соединения с относительно низкой молекулярной массой [14]. Природный полифенол дигидрокверцетин (ДГК), близкий по химическому строению к кверцетину, относится к флавонолам. Структурная формула ДГК представлена на рис. 1. В отличие от кверцетина, ДГК не обладает генотоксичностью [15]. Ингибиторные свойства низкомолекулярных флавоноидов, включая ДГК, по отношению к образованию свободных радикалов интенсивно изучали во многих работах [16–19]. Этот флавоноид также укрепляет сосуды и капилляры, подавляет развитие артритов, аллергии, улучшает микроциркуляцию крови [20] и обладает высокой антиоксидантной активностью. ДГК включен в Государственный реестр лекарственных средств РФ и разрешен для применения в пищевой промышленности в качестве пищевого антиоксиданта. Однако в настоящее время в литературе нет данных о свойствах продуктов полимеризации ДГК.

Для окислительной полимеризации ДГК в качестве биокатализатора в работе была использована билирубиноксидаза (БОД, билирубин : кислород оксидоредуктаза, КФ 1.3.3.5). Этот фермент относится к медь-содержащим оксидазам и катализирует окисление различных органических соединений, включая фенольные, молекулярным кислородом с сопутствующим восстановлением его до воды по 4-электронному механизму [21]. БОД обладает высокой активностью в области нейтральных значений pH [22]. Эти свойства фермента делают его привлекательным биокатализатором для реализации принципов «зеленой» химии. Использование ферментов в тонком органическом синтезе имеет ряд преимуществ по сравнению с химическим синтезом: реакция протекает в «мягких» ус-

ловиях с высоким выходом целевого продукта и простым выделением его из реакционной среды; отсутствуют токсичные реагенты и побочные продукты; структуру и растворимость конечных продуктов можно контролировать, изменяя условия проведения реакции.

В настоящее время в литературе отсутствуют данные об окислении ДГК, катализируемого билирубиноксидазой, и характеристиках получаемых продуктов.

Целью настоящей работы являлось изучение ферментативной полимеризации дигидрокверцетина с участием билирубиноксидазы и сравнительная характеристика полученных олигомерных продуктов по отношению к мономеру.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дигидрокверцетин ($\geq 96\%$) получен от ЗАО «БиоХимМак-СТ» (Россия) и использован без дальнейшей очистки. Билирубиноксидаза «Аmano3» из *Myrothecium verrucaria* («Amano Enzyme Inc.», Япония) была дополнительно очищена методом колоночной хроматографии на носителе Toyopearl DEAE-650M («Tosoh bioscience», Япония). Удельная активность фермента составляла 130 МЕ/мг белка при использовании в качестве субстрата аммонийной соли 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС). Однозамещенный фосфат калия, гидроокись натрия, лимонная кислота безводная, диметилформамид, АБТС («Sigma-Aldrich», США), диметилсульфоксид («Марбиофарм», Россия), ферроцианид калия тригидрат (ICN) были использованы без очистки. Пирокатехин («Sigma-Aldrich», США) дополнительно очищали возгонкой в вакууме. Все растворы были пригото-

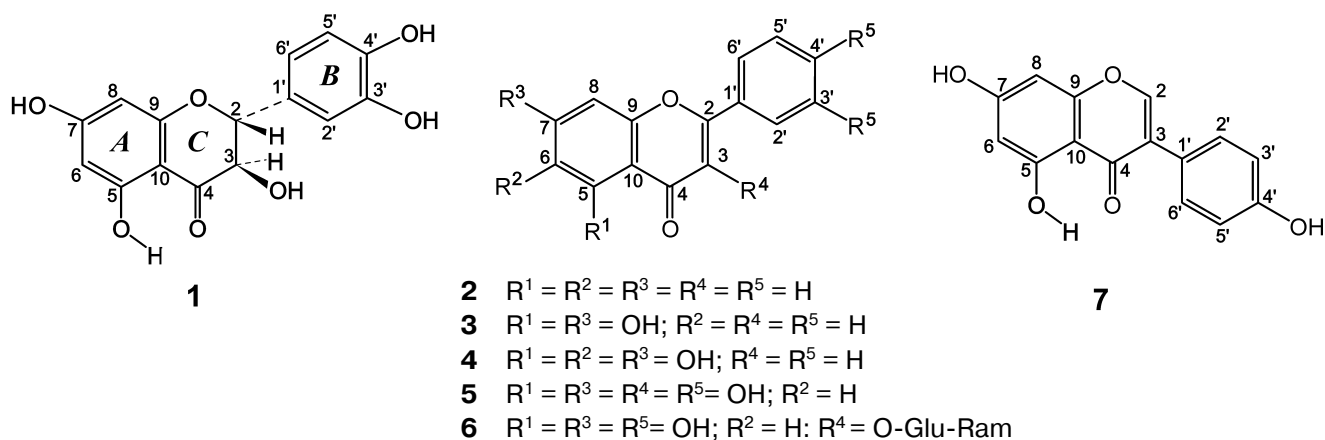


Рис. 1. Молекулярная структура дигидрокверцетина (1) и родственных флавоноидов (2–7)

лены с использованием воды, очищенной на Milli Q-system («Millipore», США).

Полимеризация дигидрокверцетина. ДГК слабо растворим в воде, однако хорошо растворим в этиловом спирте. Поэтому реакцию полимеризации ДГК проводили в водно-спиртовых растворах при комнатной температуре (20–22°) и атмосферном давлении. В типичном эксперименте 10 мг ДГК растворяли в 0,3 мл перегнанного этилового спирта и рассчитанный объем спиртового раствора флавоноида добавляли к 10 мл 0,1 М К-фосфатного буфера, pH 7,0, таким образом, чтобы концентрация ДГК в полученном водно-спиртовом растворе составляла 3 мМ, а концентрация этилового спирта не превышала 3 об.%. Полученный раствор ДГК интенсивно перемешивали в течение 15–20 мин. Реакцию полимеризации ДГК инициировали добавлением БОД в том же буферном растворе. Удельная активность фермента в реакционной смеси составляла 0,4 МЕ/мл. В отдельном эксперименте было показано, что присутствие 3 об.% этилового спирта уменьшало активность БОД, измеренную по окислению АБТС, на 2–3%. Полимеризацию ДГК проводили в течение 24 ч в аэробных условиях при перемешивании на магнитной мешалке. Активность БОД за время реакции уменьшалась в два раза. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, многократно промывали деионизированной водой, содержащей 3 об.% этилового спирта для удаления непрореагировавшего мономера ДГК, высушивали и использовали в дальнейших экспериментах.

Характеризация продуктов реакции. Мол. массу синтезированных олигомеров ДГК определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе высокого давления Waters Alliance GPCV 2000 («Waters», США), оснащенный колонкой PL Gel MIXED-C 300 × 7,8 мм фирмы «Agilent» (США) рефрактометрическим детектором, программным обеспечением Empower Pro version 5.0. В качестве растворителя использовали *N*-метилпирролидон. Калибровку системы проводили по полистирольным стандартам.

УФ-видимые спектры олигомеров ДГК записывали на спектрофотометре Shimadzu UV1240 mini (Япония) в растворах ДМСО и ДМФА, а ИК-спектры образцов в таблетках KBr — на спектрометре Frontier FT-IR/FIR («PerkinElmer Inc.», США). Термогравиметрический анализ образцов проводили с использованием термоанализатора NETZSCH STA 409 PC/PG в потоке азота со скоростью изменения температуры 10°/мин.

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C мономера и олигоДГК были зарегистрированы для растворов в ДМСО-*d*₆

на спектрометре Bruker AVANCE 600 с рабочей частотой для ядер ¹H 600,03 МГц.

Антиоксидантную активность измеряли с использованием 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил радикала (DPPH·) по модифицированному методу [23, 24]. Этот радикал имеет максимум поглощения в метаноле при 515 нм [25], которое уменьшается при восстановлении антиоксидантом. Изменение поглощения в ходе реакции детектировали спектрофотометрически и рассчитывали антиоксидантную активность соединения [23, 24]. К 2,5 мл свежеприготовленного DPPH· в метаноле (60 мкМ) добавляли различные объемы метанольного раствора исследуемого образца антиоксиданта с известной концентрацией. Регистрировали уменьшение поглощения при 515 нм до выхода на стационарные значения при инкубации в темноте. Ингибирующую активность соединения по отношению к свободным радикалам DPPH· рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{A_0 - A_{25}}{A_0} \cdot 100\%,$$

где A_0 — оптическое поглощение в начальный момент времени, A_{25} — поглощение через 25 мин после добавления антиоксиданта.

В качестве контроля использовали эквивалентный исследуемому образцу объем метанола, добавленного к раствору DPPH·. Каждое измерение повторяли трижды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ферментативная полимеризация ДГК. В предварительных экспериментах были определены pH-профили активности БОД по различным субстратам (рис. 2): донорам электронов (АБТС и феррицианид) и донору атомов водорода пирокатехину, который является структурной частью молекулы ДГК.

В реакциях с субстратами донорами электронов фермент проявляет максимальную каталитическую активность в области кислых значений pH 4,0 для АБТС и pH 3,0 для ферроцианида калия. При увеличении pH происходит падение каталитической активности и фермент полностью неактивен при pH >9,5. В области нейтральных значений pH фермент сохраняет ~50% от максимальной активности в реакции окисления обоих субстратов. В реакции с субстратом донором атомов водорода (пирокатехином) pH-профиль активности БОД смещен в щелочную

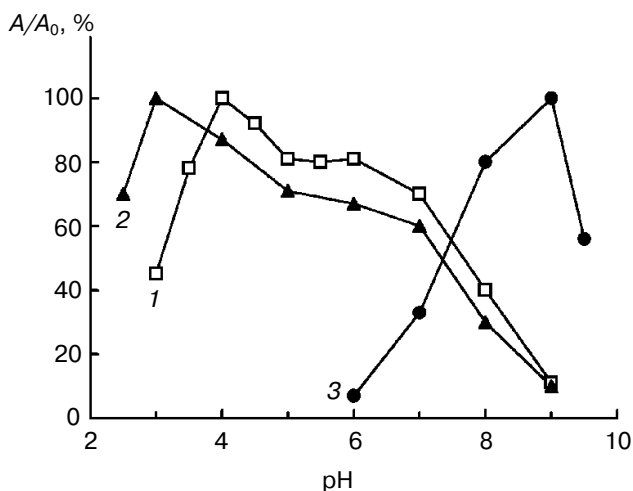


Рис. 2. Зависимость относительной активности БОД от pH реакционной среды в реакциях окисления: 1 – АБТС, 2 – $K_4[Fe(CN)_6]$, 3 – пирокатехина

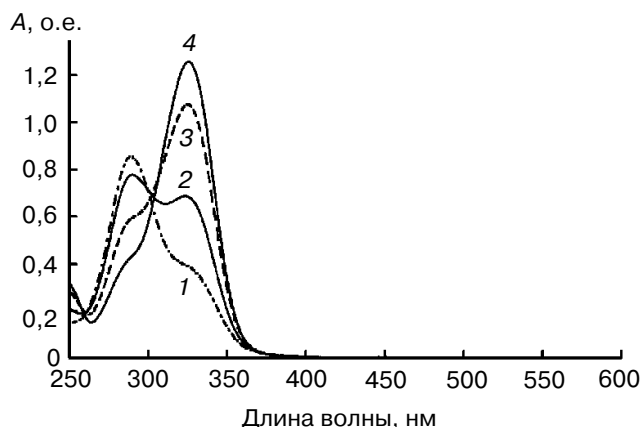


Рис. 3. Электронные спектры ДГК в 0,1 М К-фосфатном буферном растворе при различных значениях pH: 1 – 6,0, 2 – 6,5, 3 – 7,0, 4 – 7,5

область. Ферментативная активность не проявляется при $pH < 6,0$. Вероятнее всего это связано с большей реакционной способностью субстрата в виде фенолят-иона, концентрация которого увеличивается при снижении кислотности раствора ($pK_{a_{\text{пирокатехин}}} = 9,5$).

Ферментативную полимеризацию ДГК с участием БОД изучали в интервале pH от 5,0 до 7,5. ДГК обладает интенсивными полосами поглощения в области 290 и 328 нм, соответствующими $\pi-\pi^*$ -переходу ароматических сегментов молекулы. Соотношение интенсивности этих двух полос зависело от pH раствора, что свидетельствует об ионизации фенольных групп флавоноида с изменением кислотности среды. Полоса с максимумом 290 нм соответствует неионизованному ДГК, а при 328 нм – его депротонированной форме (рис. 3).

При ферментативном окислении ДГК в водно-спиртовых растворах (до 3 об.% этанола) при $pH > 6,0$ через 2,5 ч протекания реакции на спектрах продуктов полимеризации ДГК появлялся длинноволновый «хвост» (360–550 нм) с выраженной полосой поглощения в интервале 380–415 нм (рис. 4). Интенсивность поглощения в области 390–600 нм возрастала с увеличением pH реакционной среды. С увеличением времени полимеризации реакционные растворы при $pH > 6,0$ мутнели в результате образования нерастворимых олигомеров ДГК. При $pH < 6,0$ полимеризация ДГК не происходила. Синтезированные продукты были растворимы в ДМФА, ДМСО и метаноле, частично растворимы в этаноле и тетрагидрофуране. Выход олигоДГК сос-

тавлял 36 вес.%. После окончания ферментативной реакции (24 ч) полученные образцы многократно промывали, высушивали, растворяли в ДМСО и записывали УФ-видимые спектры. Электронные спектры олигоДГК, синтезированных при разных значениях pH, представлены на рис. 5. По сравнению с мономером на спектрах олигоДГК в ДМСО появлялся длинноволновый «хвост» (360–550 нм) с выраженным плечом в области 325–360 нм и максимумом поглощения при 420–440 нм. По-видимому,

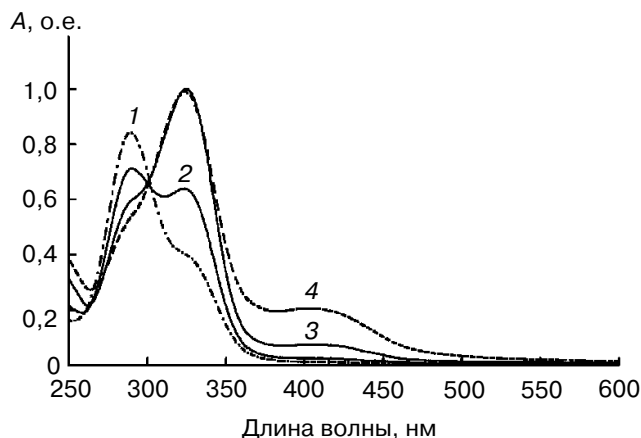


Рис. 4. Электронные спектры продуктов ферментативной полимеризации ДГК с участием БОД в 0,1 М К-фосфатном буферном растворе с различными значениями pH реакционной среды, записанные через 2,5 ч протекания реакции: 1 – 6,0; 2 – 6,5; 3 – 7,0; 4 – 7,5

этот длинноволновый «хвост» обусловлен конъюгированием молекул ДГК [26].

По данным гель-проникающей хроматографии ферментативно синтезированный образец олигоДГК имел среднечисленную мол. массу 2800 и индекс полидисперсности 8,6.

Исследования методом ИК-спектроскопии. Химическая структура мономера ДГК и ферментативно синтезированных олигоДГК были исследованы методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Оба спектра достаточно похожи, однако пики поглощения на спектре олигоДГК более широкие и сглаженные по сравнению со спектром мономера. Кроме того, на спектре олигомеров отсутствовали пики при частотах $1360\text{--}775\text{ см}^{-1}$. Широкий пик с максимумом 3400 см^{-1} соответствует колебаниям O—H-связи фенольных гидроксидов [27], сигнал при 1640 см^{-1} можно отнести к карбонильным группам [11, 28]. Адсорбция при 1150 см^{-1} обусловлена колебаниями C_{арил}—O-связи [29], слабые сигналы в области $780\text{--}810\text{ см}^{-1}$ можно отнести к связям C=C и C—H ароматического кольца [28]. На ИК-спектрах олигоДГК отсутствовали полосы поглощения в области $870, 1200, 1240\text{ см}^{-1}$, соответствующие коллективным колебаниям C_{арил}—O—C_{арил}-связей [30]. Однако достоверную информацию о структуре олигоДГК из этих данных получить затруднительно. Для более подробной характеристики ферментативно синтезированных олигоДГК был использован метод спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C .

Сравнительный анализ спектров ЯМР ^1H и ^{13}C мономера и олигоДГК. Сравнительный анализ спектров ЯМР ^1H (рис. 6) и ^{13}C (рис. 7) олигоДГК и мономера проводили, исходя из предположения, что при ферментативной олигомеризации не происходит разрыва углерод-углеродных связей.

Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР олигоДГК провели расшифровку спектров ЯМР ^1H и ^{13}C мономера ДГК (1), кверцетина (5), рутина (6) и генистеина (7) (рис. 1; табл. 1) с использованием корреляционных экспериментов COSY, HSQC и HMBC. При этом полученные значения для ДГК в целом коррелируют с литературными данными [31]. Отнесение сигналов OH-групп в протонном спектре выполнено впервые. На рис. 6, в показано отнесение OH-групп ДГК.

Для выявления сигналов гидроксильных протонов олигоДГК был проведен дополнительный эксперимент с добавлением 10 мкл D₂O (тяжелой воды) к разбавленному в 30 раз, по сравнению с исходным, раствору олигоДГК. В результате в протонном спектре (рис. 6, б) практически исчезли сигналы гидроксильных групп,

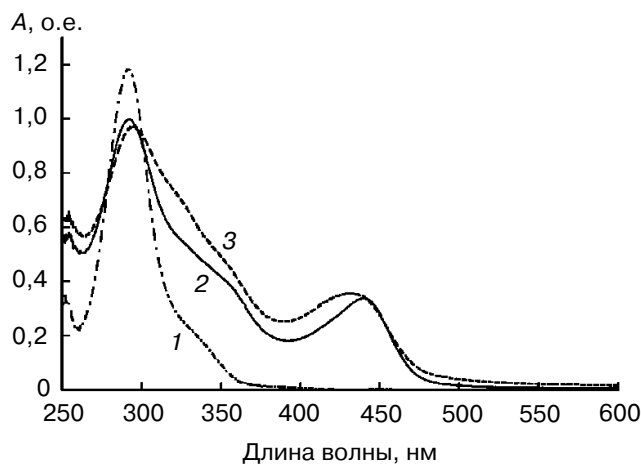


Рис. 5. Электронные спектры мономера ДГК (кривая 1) и продуктов ферментативной полимеризации ДГК в ДМСО через 24 ч протекания реакции при различных pH: 2 – 7,0; 3 – 7,5

так как произошло замещение протонов атомами дейтерия. Этот эксперимент позволил выделить в протонном спектре олигомера сигналы, относящиеся к OH-группам. Сравнивая области $8,3\text{--}14,0$ м.д. в спектрах рис. 6, а, б и в можно заключить, что все фенольные гидроксиды присутствуют в олигоДГК, при этом протоны гидроксильных групп 7-OH, 3'-OH и 4'-OH (рис. 1, 1) вовлечены в обменные процессы. Скорее всего, это именно внутримолекулярный обмен, так как молекулы олигоДГК могут иметь достаточно сложную пространственную структуру. В то же время в олигоДГК, как и в мономере, группа 5-OH участвует в образовании водородной связи с карбонильным кислородом, о чем свидетельствует наличие нескольких относительно слабо уширенных и четко различающихся сигналов в области $11,5\text{--}14,0$ м.д. (рис. 6, а). Сравнивая все три спектра (рис. 6), можно заключить, что в спектре олигоДГК отсутствует сигнал гидроксильной группы в положении 3. Это позволяет сделать вывод, что процесс ферментативной олигомеризации ДГК начинается с окисления (отщепления водорода) гидроксильной группы в положении 3.

Сравнительное исследование областей $4,0\text{--}5,8$ м.д. в спектрах (рис. 6, а, б и в) показывает, что в спектре олигоДГК в области протонов H2 и H3 присутствуют сигналы, но их общая интегральная интенсивность заметно снижена по сравнению с сигналами ароматических протонов. Таким образом, в олигоДГК присутствуют алифатические группы, но их меньше, чем должно быть, если полагать, что углероды C2 и

С3 не меняют свою гибридизацию в процессе олигомеризации.

В спектре олигоДГК в областях 6,0–6,6 и 7,0–8,1 м.д. наблюдаются сигналы, которые отсутствуют в спектре мономера. Эти сигналы, наиболее вероятно, можно отнести к фенильным протонам, поскольку при замещении протонов в кольцах *A* и *B* (рис. 1, **1**) на радикал через кислород, сигналы оставшихся протонов сдвигаются в слабое поле. При этом в спектре олигоДГК наблюдаются уширенные сигналы с высокой интегральной интенсивностью, соответствующие сигналам фенильных протонов мономера Н2', Н5', Н6', Н6 и Н8. Это позволяет предположить, что образовавшийся на первой стадии алкоксильный радикал атакует вторую молекулу ДГК с замещением атомов водорода по всем пяти возможным положениям в кольцах *A* и *B*.

Анализ спектров ЯМР ^{13}C дает дополнительную информацию о структуре образующихся в процессе ферментативной полимеризации олигоДГК. На рис. 7 приведены спектры ЯМР ^{13}C

олигоДГК и мономера. В табл. 1 приведены химические сдвиги ядер ^{13}C ДГК (**1**) и родственных флавоноидов (**2–7**). Сравнивая спектры ЯМР ^{13}C олигоДГК и мономера (рис. 7), можно заключить, что всем сигналам атомов углерода в спектре мономера (рис. 7, *в*) соответствуют группы сигналов в спектре олигоДГК. Например, сигнал карбонильного углерода в спектре олигомера в области 195–197 м.д. представляет собой группу из нескольких сигналов и соответствует положению карбонильной группы в мономере (197,7 м.д.). Однако наибольший интерес представляют те сигналы в спектре олигоДГК, которых нет в спектре мономера. Прежде всего, это группа сигналов четвертичных углеродов в области 176,0–177,5 м.д. После анализа литературных данных (табл. 1) было сделано предположение, что они относятся к карбонильной группе С4, а изменение химического сдвига обусловлено появлением двойной связи С2=С3 такой же, как во флавоне **2** и его производных **3–7**. Образование двойной связи также

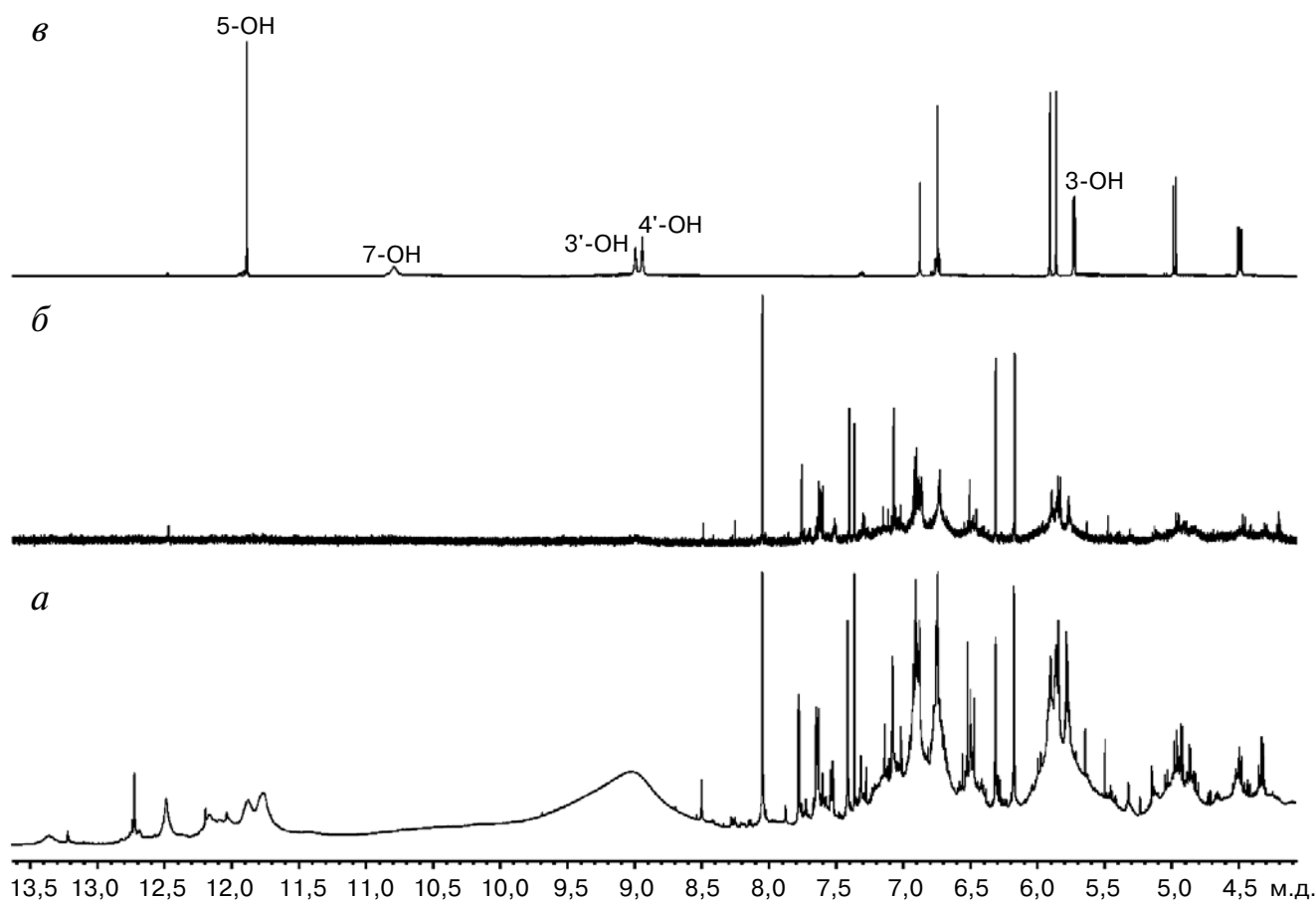


Рис. 6. Спектры ЯМР ^1H : *a* – олигоДГК; *б* – разбавленного раствора олигоДГК с добавлением D_2O ; *в* – мономера ДГК

Таблица 1. Химические сдвиги ЯМР ^{13}C дигидрокверцетина (1) и родственных флавоноидов (2–7) (м.д., ДМСО- D_6)

Номера атомов	Соединение*						
	1 ^а	2 ^б	3 ^б	4 ^б	5 ^а кверцетин	6 ^а рутин	7 ^а генистеин
2	83,0	163,2	163,7	163,7	146,9	156,6	154,0
3	71,5	107,5	105,7	105,0	135,8	133,4	122,3
4	197,7	177,6	182,3	182,9	175,9	177,4	180,2
5	163,3	125,2	162,0	150,6	160,8	161,3	162,0
6	95,9	126,0	99,6	129,8	98,2	98,7	99,0
7	166,7	134,7	164,9	147,8	163,9	164,1	164,3
8	94,9	118,9	94,6	94,5	93,4	93,6	93,7
9	162,5	156,2	158,0	154,5	156,2	156,5	157,6
10	100,4	123,8	104,5	104,8	103,1	104,0	104,5
1'	128,0	131,7	131,3	131,5	122,0	121,2	121,3
2'	115,1	126,8	126,9	126,8	115,1	116,3	130,2
3'	144,9	129,5	129,6	129,5	145,1	148,4	115,1
4'	145,7	132,2	132,4	132,2	144,8	144,8	157,5
5'	115,3	129,5	129,6	129,5	115,7	115,3	115,1
6'	119,3	126,8	126,9	126,8	120,0	121,6	130,2

* Структурные формулы соединений 1–7 представлены на рис. 1.

^а Данные настоящей работы.

^б Данные работы [32].

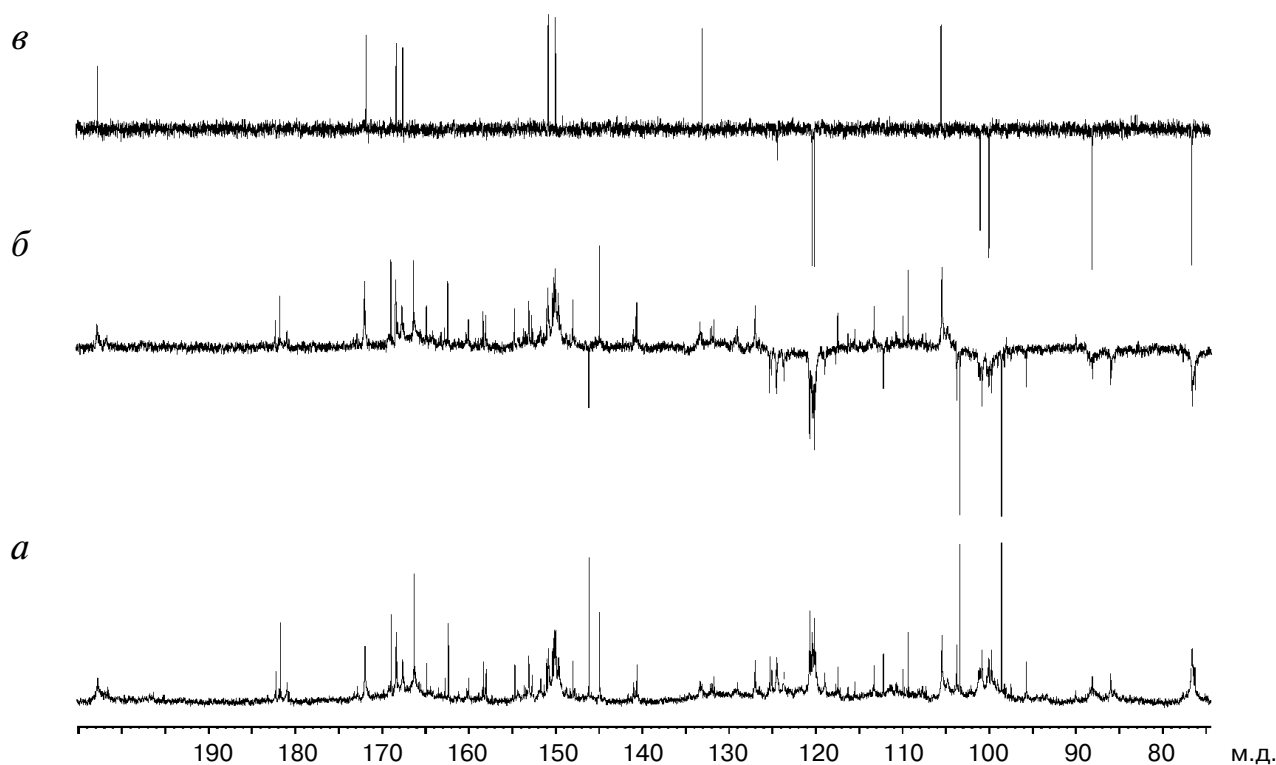


Рис. 7. Спектры ЯМР: *а* – ^{13}C – $\{^1\text{H}\}$ олигоДГК; *б* – ^{13}C -АРТ олигоДГК (сигналы четвертичных атомов углерода направлены вверх, сигналы СН-групп – вниз); *в* – ^{13}C -АРТ мономера ДГК

подтверждается наличием сигналов четвертичных атомов углерода в области 135,5–136,0 м.д. (атом С3 в кверцетине **5** и рутине **6**) и в области 146,7–162,0 м.д. (атом С2 во флавоне **2** и его производных **3–7** (табл. 1)).

Сигналы четвертичных и СН углеродов из кольца **B** мономера (рис. 1, **1**) полностью находят свое подтверждение в уширенных сигналах спектра олигоДГК. В области сигнала мономера С6' в кольце **B** при 119,3 м.д. в спектре олигоДГК присутствуют несколько сигналов СН атомов углерода в области 115,6–120,3 м.д., среди которых наибольший интерес представляет уширенный интенсивный сигнал с центром при 119,5 м.д. С сигналами мономера С2' и С5' при 115,1 и 115,3 м.д. соответственно соотносится компактная группа интенсивных уширенных сигналов в области 114,9–115,7 м.д. В области сигнала мономера С1' при 128 м.д. в спектре олигоДГК присутствуют четыре группы сигналов четвертичных атомов углерода в области 121,9–128,4 м.д. Это может свидетельствовать о том, что на положение сигнала углерода С1' оказало заметное влияние изменение статуса ближайших соседей этого углерода в кольце **C** – образование двойной связи С2=С3 (табл. 1, данные по кверцетину **5** и рутину **6**). Таким образом, можно сделать вывод, что в процессе ферментативной олигомеризации происходит также образование двойной связи С2=С3. Этот факт свидетельствует о том, что стабилизация промежуточно образовавшихся алкоксильных радикалов может проходить за счет отщепления одного из атомов водорода при С2.

Сигналы четвертичных атомов углерода при 162,5 (С9), 163,3 (С5), 166,7 (С7), 128,0 (С10) м.д. и СН углеродов при 94,9 (С8) и 95,9 (С6) м.д. в спектре мономера практически сохраняют свое положение в спектре олигоДГК, но уширяются. Наблюдаемые в спектре олигоДГК многочисленные узкие сигналы четвертичных углеродов в области 145,0–164,0 м.д. (наиболее заметные 164,0, 161,3, 159,8, 157,3, 153,3, 153,0, 149,7, 148,1, 148,0 м.д.) соответствуют углеродам С5 и С7 (табл. 1). Также в спектре олигоДГК появляются заметные сигналы СН-групп при 90,7, 93,6, 98,4 и 98,7 м.д. Эти значения химических сдвигов прекрасно согласуются с данными для замещенных флавонов **3** и **4**, кверцетина **5** и рутин **6** (табл. 1). В олигоДГК присутствуют фрагменты кольца **A**, аналогичные мономеру.

В спектре олигоДГК в области 104,4–112,4 м.д. присутствуют сигналы четвертичных атомов углерода, значения химических сдвигов которых согласуются со сдвигами углерода С10 в кверцетине **5**, рутине **6** и генистеине **7** (табл. 1). Сигнал СН-группы при 107,2 м.д. может соответство-

вать атому углерода С3 во флавонах **2–4**, и это означает, что произошло отщепление воды по связи С2–С3. В области алифатических углеродов мономера С2 (83,0 м.д.) и С3 (71,5 м.д.) в спектре олигоДГК наблюдаются уширенные сигналы примерно на тех же значениях сдвигов.

Суммируя результаты сравнительного анализа спектров ЯМР ¹H и ¹³C мономера ДГК и олигоДГК и литературных данных для родственных соединений, можно сделать следующие выводы. При ферментативном окислении ДГК происходит отрыв атома водорода от гидроксильной группы в положении 3 с образованием активного радикала, который (а) может статистически присоединяется к фенильным углеродам в положения 6, 8, 2', 5' и 6' или (б) может приводить к отрыву водородов Н2 и Н3 с образованием двойной связи С2=С3, сохраняя при этом связь С3–О или (в) может приводить к образованию двойной связи С2=С3 без сохранения связи С3–О в результате дегидрирования по связи С2–С3. Видимо, в олигоДГК присутствуют все возможные варианты фрагментов, и при этом различные молекулы олигомеров могут содержать разные сочетания этих фрагментов. Таким образом, полученные результаты позволяют охарактеризовать отдельные фрагменты молекул олигомеров, но этих данных недостаточно для однозначного вывода о том, каким именно образом эти фрагменты связаны между собой в молекулах олигоДГК, т.е. полученные в результате ферментативной полимеризации ДГК олигомеры имеют нерегулярную структуру.

Антиоксидантная активность. Антиоксидантную активность ферментативно синтезированных олигоДГК и мономера определяли как концентрацию антиоксиданта, необходимую для

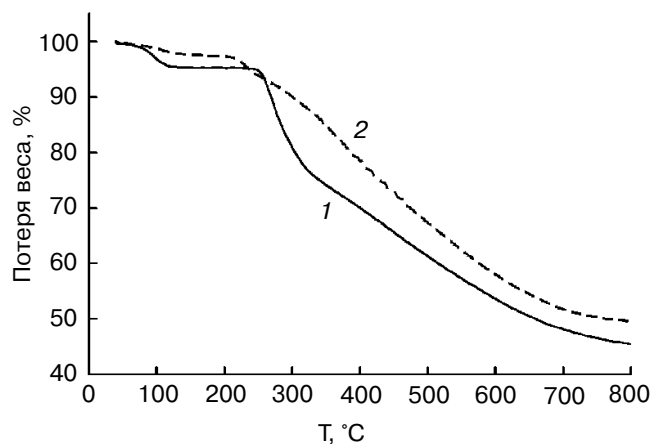


Рис. 8. Термостабильность мономера ДГК (1) и олигоДГК (2)

Таблица 2. Температура при различных процентах потери веса, °С

Вещество	Потеря веса, %					
	10	15	20	30	40	50
ДГК	270	286	306	400	515	660
ОлигоДГК	300	346	385	475	574	764

уменьшения начальной концентрации ДРРН[•] на 50%. Сначала измеряли кинетику восстановления ДРРН[•] для различных концентраций антиоксидантов до выхода на стационарные значения концентраций радикала. Выход на стационарные значения оптической плотности происходил через 25 мин после добавления каждого из антиоксидантов. Для олигоДГК антиоксидантная активность составляла 4 мкг/мл, а для мономера ДГК – 7 мкг/мл. Таким образом, олигоДГК обладает более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с мономером.

Термическая стабильность. Термическую стабильность продуктов ферментативной полимеризации ДГК изучали с использованием термogravиметрического метода (ТГА). На рис. 8 приведены результаты анализа термостабильности

олигоДГК и мономера ДГК. По сравнению с мономером, олигоДГК обладают меньшей гигроскопичностью, на что указывает потеря веса образцов в результате удаления связанной воды при нагревании до 100°. Из данных ТГА видно, что до температуры 250° олигоДГК и мономер имеют приблизительно одинаковую стабильность. При более высоких температурах происходит резкая потеря веса обоих образцов, причем термостабильность олигоДГК значительно выше, чем у мономера (табл. 2). Образец олигоДГК теряет 20% веса при 385°, в то время как мономер ДГК – при 306°.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-00403 а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., and Burton, S. (2011) Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review, *Enzyme Microb. Technol.*, **48**, 195–208.
- Hollmann, F., and Arends, I.W.C.E. (2012) Enzyme Initiated Radical Polymerizations: Review, *Polymers*, **4**, 759–793.
- Роговский В.С., Матюшин А.И., Шимановский Н.Л., Семейкин А.В., Кухарева Т.С., Коротеев А.М., Коротеев М.П., Нифантьев Э.Е. (2010) Антипролиферативная и антиоксидантная активность новых производных дигидрокверцетина, *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **73**, 39–42.
- Desentis-Mendoza, R.M., Hernandez-Sanchez, H., Moreno, A., Rojas del C.E., Chel-Guerrero, L., Tamariz, J., and Jaramillo-Flores, M.E. (2006) Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*, *Biomacromolecules*, **7**, 1845–1854.
- Nicotra, S., Cramarossa, M.R., Mucci, A., Pagnoni, U.M., Riva, S., and Forti, L. (2004) Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*, *Tetrahedron*, **60**, 595–600.
- Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R., and Skrzypczak-Jankun, E. (1997) Why drinking green tea could prevent cancer, *Nature*, **387**, 561.
- Bordoni, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Giordano, E., Guarnieri, C., Calderara, C.M., and Bia, P.L. (2002) Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells, *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 103–111.
- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., Takats, P.G., Anderson, D., Baker, J., and Kerr, D.J. (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition, *Clin. Cancer Res.*, **2**, 659–668.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.-C., and Barre-Sinoussi, F. (1990) Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases, *Eur. J. Biochem.*, **190**, 469–476.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., and Riechel, T.L. (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1887–1892.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., and Kobayashi, S. (2003) Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin), *Biomacromolecules*, **4**, 1394–1399.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., and Kobayashi, S. (2003) Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin), *Macromol. Biosci.*, **3**, 758–764.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., and Agarwa, R. (1999) Antitumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent, *Carcinogenesis*, **20**, 1737–1745.

14. Hollman, P.C., and Katan, M.B. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man, *Biomed. Pharmacother.*, **51**, 305–310.
15. Makena, P.S., Pierce, S.C., Chung, K.-T., and Sinclair, S.E. (2009) Comparative mutagenic effects of structurally similar flavonoids quercetin and taxifolin on tester strains *Salmonella typhimurium* TA102 and *Escherichia coli* WP-2 uvrA, *Environ. Mol. Mutagen.*, **50**, 451–459.
16. Теселкин Ю.О., Жамбалова Б.А., Бабенкова И.В., Клебанов Т.И., Тюкавкина Н.А. (1996) Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина, *Биофизика*, **41**, 620–623.
17. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С., Любичкий О.Б., Новиков А.А., Измайлов Д.Ю., Осипов А.Н., Тихонов В.П., Каган В.Е. (2009) Дигидрокверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза, *Биохимия*, **74**, 372–379.
18. Wang, Y.-H., Wang, W.-Y., Liao, J.-F., Chen, C.-F., Hou, Y.-C., Liou, K.-T., Chou, Y.-C., Tien, J.-H., and Shen, Y.-C. (2004) Prevention of macrophage adhesion molecule-1 (Mac-1)-dependent neutrophil firm adhesion by taxifolin through impairment of protein kinase-dependent NADPH oxidase activation and antagonism of G protein-mediated calcium influx, *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 2251–2262.
19. Бронников Г.Е., Кулагина Т.П., Ариповский А.В. (2009) Добавка дигидрокверцетина в пищу старым мышам приводит к восстановлению активности митохондриальных ферментов скелетной мускулатуры, *Биологические мембраны*, **26**, 387–393.
20. Middleton, E.Jr., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C. (2000) The Effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673–751.
21. Mizutani, K., Toyoda, M., Sagara, K., Takahashi, N., Sato, A., Kamitaka, Y., Tsujimura S., Nakanishi, Y., Sugiura, T., Yamaguchi, S., Kano, K., and Mikami, B. (2010) X-ray analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 Å resolution using a twinned crystal, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **66**, 765–770.
22. Guo, J., Liang, X.X., Mo, P.S., and Li, G.X. (1991) Purification and properties of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **31**, 135–143.
23. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., and van Beek, T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chem.*, **85**, 231–237.
24. Aquino, R., Caceres, A., Morelli, S., and Rastrelli, L. (2002) An Extract of *Tagetes lucida* and Its Phenolic Constituents as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **65**, 1773–1776.
25. Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., Cascio, R.L., Princi, P., Uccella, N., Bonina, F., and Castelli, F. (1998) «*In vitro*» evaluation of the antioxidant activity and bio-membrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol, *Int. J. Pharm.*, **166**, 123–133.
26. Bruno, F.F., Trotta, A., Fossey, S., Nagarajan, S., Nagarajan, R., Samuelson, L.A., and Kumar, J. (2010) Enzymatic synthesis and characterization of polyquercetin, *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, **47**, 1191–1196.
27. Park, S.Y., Kim, Y.H., Won, K., and Song, B.K. (2009) Enzymatic synthesis and curing of polycardol from renewable resources, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **57**, 312–316.
28. Mejias, L., Reihmann, M.H., Sepulveda-Boza, S., Ritter, H. (2002) New polymers from natural phenols using horseradish or soybean peroxidase, *Macromol. Biosci.*, **2**, 24–32.
29. Won, K., Kim, Y.H., An, E.S., Lee, Y.S., and Song, B.K. (2004) Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of cardanol in the presence of redox mediators, *Biomacromolecules*, **5**, 1–4.
30. Шиманко Н.А., Шишкина М.В. (1987) Атлас спектров поглощения ароматических эфиров в Инфракрасной и ультрафиолетовой областях, Наука, Москва.
31. Kolesnik, Y.A., Titova, E.V., Chertkov, V.A., Tashlitskiy, V.N., Tichonov, V.P., and Shmatkov, D.A. (2011) Stereoisomeric composition of two bioflavonoids from *Larix sibirica*, *Planta Med.*, **77**, 1266.
32. Sinha, R., Joshi, A., Joshi, U.J., Srivastava, S., and Govil, G. (2014) Localization and interaction of hydroxyflavones with lipid bilayer model membranes: A study using DSC and multinuclear NMR, *Eur. J. Med. Chem.*, **80**, 285–294.

ENZYMATIC POLYMERIZATION OF DIHYDROQUERCETIN USING BILIRUBIN OXIDASE AS BIOCATALYST

M. E. Khlupova¹, I. S. Vasil'yeva¹, G. P. Shumakovich¹,
O. V. Morozova¹, V. A. Chertkov², A. K. Shestakova³,
A. V. Kisin³, A. I. Yaropolov^{1*}

¹ A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy
of Sciences, Moscow 119071, Russia; fax: +7(495)954-2732,
E-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)932-5846,
E-mail: vchertkov@hotmail.com

³ State Research Institute of Chemistry and Technology
of Organoelement Compounds, 105118, Russia;
fax: +7(495)913-2538, E-mail: alshestakova@yandex.ru

Received July 14, 2014

Revision received September 10, 2014

Dihydroquercetin (or taxifolin) belongs to the most famous flavonoids, and it can be isolated from the Siberian larch tree (*Larix sibirica* ledeb.) in large amounts. In the present work, the oxidative polymerization of dihydroquercetin (DHQ) using bilirubin oxidase as biocatalyst was investigated and some physicochemical properties of the products were studied. Under optimal conditions, oligomers of dihydroquercetin (oligoDHQ) with number-average molecular weight of 2800 and a polydispersity index of 8.6 were obtained using an enzymatic synthesis reaction. The resulting oligomers were soluble in dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF), and methanol. UV-vis measurements of the oligoDHQ in DMSO indicated the presence of extended conjugation. Enzymatically synthesized oligoDHQ was also characterized by FTIR and ¹H and ¹³C NMR spectroscopies. Comparison of NMR spectra of oligo DHQ with monoDHQ and parent flavonoids revealed irregular structure of the polymer formed via enzymatic oxidation of DHQ, followed by nonselective radical polymerization. Compared with the monomer, oligoDHQ has higher thermal stability and higher antioxidant activity.

Key words: dihydroquercetin, enzymatic polymerization, bilirubin oxidase, oligomers, ¹H and ¹³C NMR spectra