

УДК 577.152.1.001:7+541.516:57.042.2+663.241+543

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА

© 2011 г. М. В. Потапович*, В. П. Курченко**, Д. И. Метелица*, О. И. Шадыро*

*НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, 220030
e-mail: pot-maxim@tut.by

**Биологический факультет Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, 220064
e-mail: kurchenko@tut.by

Поступила в редакцию 15.10.2010 г.

Изучена эффективность ингибирования (антиоксидантная активность) 26 кислородсодержащих ароматических соединений в псевдопероксидазной системе метгемальбумин– H_2O_2 –*o*-фенилендиамин (ФДА) или тетраметилбензидин (ТМБ) при 20°C в забуференном физиологическом растворе, pH 7.4, содержащем 6% диметилформамида (ДМФ) и 0.25% диметилсульфоксида (ДМСО). Эффективность ингибиторов количественно охарактеризована константами ингибирования K_i , мкМ или глубиной ингибирования в процентах. Величина K_i изменялась в интервале от 4 до 500 мкМ и зависела от субстрата, структуры ингибитора и наличия в них НО-групп, электронодонорных заместителей в ароматическом кольце и стерических препятствий. Тип ингибирования при сопряженном окислении 8 пар – бесконкурентный и 5 пар – смешанный и определялся природой субстрата и структурой ингибитора. Фенольные соединения лигнинового комплекса гваяцилового и сирингилового рядов проявили высокую антиоксидантную активность (величина K_i в пределах 10–300 мкМ) и располагаются в ряд по убывающей эффективности: кофейная кислота > синаповый альдегид > сиреневая кислота > кониферилловый альдегид > *para*-оксикумаровая кислота.

Системы, содержащие биокатализаторы: гемин, метмиоглобин, метгемоглобин и метгемальбумины (MetHa), H_2O_2 или органический гидропероксид в качестве окислителей, принято называть псевдопероксидазными. Ранее нами проведен цикл исследований по инициированию и ингибированию свободнорадикальных процессов в системах гемин(метгемальбумины)– H_2O_2 [1–6]. Псевдопероксидазные системы MetHa– H_2O_2 – $ArNH_2$, в которых $ArNH_2$ – ароматический амин (ФДА или ТМБ), успешно использованы нами для тестирования многочисленных антиоксидантов (ингибиторы) – замещенных фенолов, многоатомных фенолов и их полидисульфидов, аминифенолов и их производных, а также флавоноидов растительного происхождения [6, 7]. Метод конкурирующих реакций свободных радикалов, образующихся в гем-белковых пероксидных системах, с ФДА и ТМБ, с одной стороны, и с антиоксидантами фенольной природы, с другой стороны, использован для количественной характеристики и отбора многочисленных ингибиторов свободнорадикальных процессов [6, 7].

Псевдопероксидазная система MetHa– H_2O_2 –ФДА (ТМБ) представляет большой практический интерес для тестирования потенциальных антиоксидантов природного происхождения, в частности фено-

лов, содержащих в ароматическом кольце спиртовые, альдегидные и кислотные заместители. Такие соединения содержатся в эфирных маслах и экстрактах многих растений и широко используются на практике: например, коричный спирт и его производные известны как активные инсектициды, коричный альдегид применяется в парфюмерной промышленности, а коричная кислота – в фармацевтическом производстве. Особый интерес вызывают многочисленные продукты превращения лигнина древесины хвойных и лиственных растений. В химическом отношении лигнин неоднороден и представляет собой сложный комплекс, что не определяется большим числом различных мономерных блоков, которые являются производными фенолпропана, главным образом – кониферилового спирта. Сложность структуры лигнина обусловлена разнообразием связей, при помощи которых мономерные блоки соединяются друг с другом, что объясняет его нерегулярное строение и согласуется с тем, что при синтезе лигнина ферменты участвуют лишь в образовании радикалов кониферилового спирта, которые затем спонтанно образуют различные связи в зависимости от мезомерного состояния радикалов [8].

Среди многочисленных продуктов превращения лигнина древесины дуба особого внимания заслуживают ароматические соединения с одной метокси-группой в бензольном кольце (гваяциловый ряд) – кониферилловый альдегид, ванилин, ванилиновая кислота и с двумя метокси-группами – синаповый альдегид, сиреневый альдегид и сиреневая

Сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид, ДМФ – диметилформамид, ЗФР – забуференный физиологический раствор, pH 7.4, ТМБ – 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин, ФДА – *ortho*-фенилендиамин, K_i – константа ингибирования, мкМ, f – стехиометрический коэффициент ингибирования, InH – ароматические кислородсодержащие ингибиторы, MetHa – метгемальбумины.

кислота (сирингиловый ряд). Все перечисленные соединения образуются на начальных этапах выдерживания коньячного спирта в процессе этанолиза и гидролиза лигнинового комплекса [9]: содержание этих веществ при выдерживании закономерно возрастает и в существенной степени определяет качество коньяка или другого алкогольного продукта. Антиоксидантные свойства коньяков давно и хорошо известны [10]. Важно оценить антиоксидантную активность производных лигнина гваяцилового и сирингилового рядов.

В табл. 1 и 2 представлены структурные формулы 26 кислородсодержащих ароматических соединений, среди которых все упомянутые выше вещества лигнинового ряда — объекты изучения в данной работе.

Цель работы — использование псевдопероксидазной системы метгемальбумин- H_2O_2 -ФДА (ТМБ) для количественной характеристики и сравнения антиоксидантной активности 26 кислородсодержащих ароматических соединений.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Использовали бензиловый спирт, бензальдегид и бензойную кислоту (I–III), коричный спирт, коричный альдегид и коричную кислоту (IV–VI), фенол и его пара-замещенные производные — *p*-оксибензиловый спирт, *p*-оксибензальдегид, *p*-оксибензойную кислоту и *p*-оксикоричную (оксикумаровую) кислоту (VII–XI), пирокатехин и его производные — 3,4-диоксибензальдегид, 3,4-диоксибензойную кислоту и 3,4-диоксикоричную (кофейную) кислоту (XII–XV), гваякол и его производные — 3-метокси-4-оксибензиловый спирт, 3-метокси-4-оксибензальдегид (ванилин), 3-метокси-4-оксибензойную (ванилиновую) кислоту, 3-метокси-4-оксикоричный спирт, 3-метокси-4-оксикоричный (кониферилловый) альдегид и 3-метокси-4-оксикоричную кислоту (XXI–XXII), 3,5-диметокси-4-оксибензальдегид (сиреневый альдегид), 3,5-диметокси-4-оксибензойную (сиреневую) кислоту, 3,5-ди-метокси-4-оксикоричный (синаповый) альдегид, и 3,5-диметокси-4-оксикоричную кислоту (XXIII–XXVI).

Реагенты. Использовали гемин фирмы “Serva” (Германия), раствор которого готовили в ДМСО и определяли концентрацию спектрофотометрически, используя коэффициент молярного поглощения $174000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 405 нм [11]. Применяли БСА фирмы “Sigma” (США) без дополнительной очистки, используя для его спектрофотометрического определения ϵ (280 нм) $35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [12]. Метгемальбумин получали по методике, описанной ранее [13], с соотношением компонентов 10 мкМ гема/5 мкМ БСА. В качестве субстратов-восстановителей применяли ФДА фирмы “Fluka” (Швейцария) и ТМБ (“Serva”, Германия), а в качестве субстрата-

окислителя — разбавленный пероксид водорода, определяя концентрацию H_2O_2 с использованием ϵ (230 нм) $72.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14]. Органические соразтворители ДМСО и ДМФ перед употреблением перегоняли. Для приготовления ЗФР, pH 7.4, использовали соли производства “Реахим” (Россия). В качестве потенциальных ингибиторов окисления ФДА и ТМБ применяли 26 соединений, представленных в табл. 1 и 2: фенол (VII) и пирокатехин (XII) производства “Реахим” (Россия) предварительно очищали; гваякол (XVI) фирмы “Fluka” (Швейцария), бензойную кислоту (III) фирмы “Serva” (Германия) и соединения I, II, IV–VI, VIII–XV, XVII–XXVI (“Sigma-Aldrich”, США) использовали без очистки.

При расчете начальных скоростей расходования синапового альдегида (XXV) использовали молярный коэффициент поглощения ϵ (345 нм), равный $19600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в ЗФР, pH 7.4, содержащем 6% ДМФ и 0.25% ДМСО.

Окисление ФДА и ТМБ в системе MetHa- H_2O_2 . Окисление без ингибиторов и в их присутствии проводили при 20°C в термостатированных кюветках фотометра КФК-3 (Россия), в среде ЗФР, pH 7.4, содержащем 6% ДМФ и 0.25% ДМСО, что обеспечивало полную гомогенность реакционной смеси. Реакцию окисления ФДА вели при концентрации H_2O_2 6 мМ и регистрировали поглощение света продуктом окисления ФДА A_{455} . При расчете начальной скорости реакции V_0 использовали молярный коэффициент поглощения продукта 2,3-диаминофеназина, равный при pH 7.4 $16200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [15]. За реакцией окисления ТМБ без ингибиторов и в присутствии соединений VII, XII, XVI и XXV с участием MetHa и 0.5 мМ H_2O_2 следили по поглощению света продуктом окисления ТМБ в его максимуме A_{655} . При расчете скоростей реакции применяли ϵ (655 нм) продукта окисления, равный $39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [16]. При расчете скоростей окисления ТМБ из-за наличия периода индукции в накоплении продукта реакции использовали строго линейные участки кинетических кривых роста A_{655} после окончания лаг-периода.

Спектрофотометрическое исследование систем. Исследование систем MetHa- H_2O_2 -ФДА-синаповый альдегид (XXV) и MetHa- H_2O_2 -ФДА проводили при 20°C в кюветках (1 см) спектрофотометра Cary-50 (“Varian”, США) в среде ЗФР, pH 7.4, содержащей 6% ДМФ и 0.25% ДМСО.

Ингибирование окисления ФДА и ТМБ соединениями I-XXVI в псевдопероксидазной системе. Для определения типа ингибирования строили кривые зависимости V_0 от начальной концентрации субстрата в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера–Берка [17]). В наших работах по сопряженному окислению ароматических аминов и многочисленных фенольных соединений доказано, что адекватной количественной характеристикой ингибирования окисления аминов является константа

Таблица 1. Характеристика ингибирования окисления ФДА и ТМБ в системе гемин–БСА (10 мкМ : 5 мкМ)–H₂O₂ кислородсодержащими ароматическими соединениями: 20°C, 3ФР, рН 7.4, 6 мМ H₂O₂ (0.5 мМ H₂O₂ при окислении ТМБ), 6% ДМФ и 0.25% ДМСО, а также 300 мкМ соединений I–X. Типы ингибирования: бк – бесконкурентный и см – смешанный

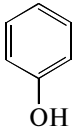
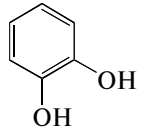
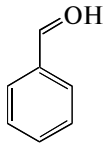
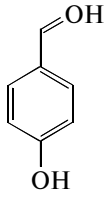
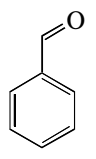
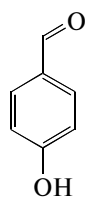
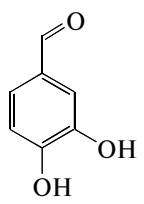
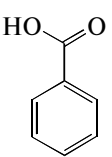
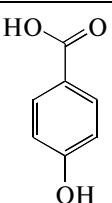
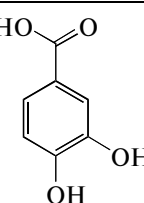
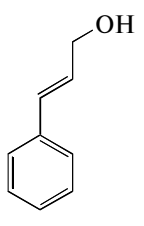
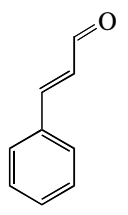
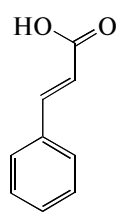
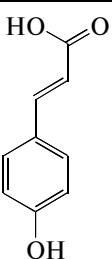
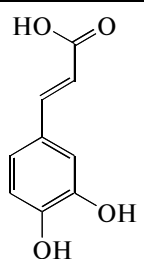
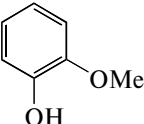
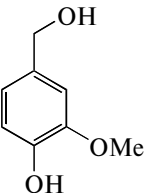
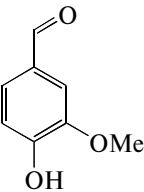
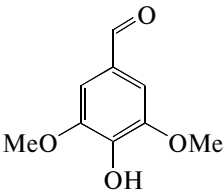
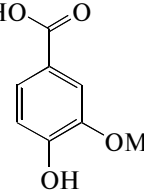
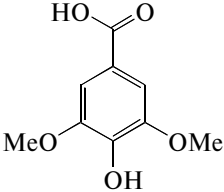
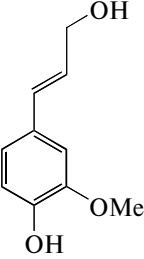
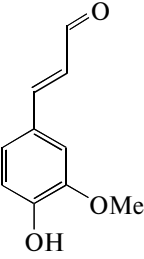
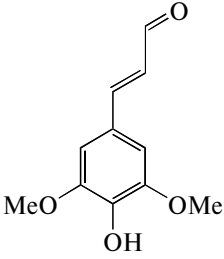
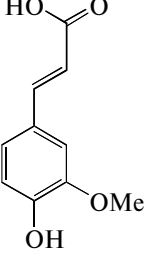
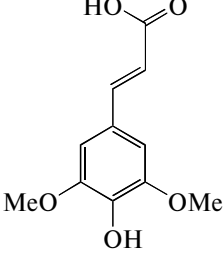
Структура и номер InH	Ингибирование, %	Структура и номер InH	K _i , % ингибирования	Структура и номер InH	[InH], мкМ	K _i , % ингибирования	Тип ингибирования
		VII 	ТМБ: 4 мкМ	XII 	25	ТМБ: 5 мкМ, 35%	бк
I 	2	VIII 	2%				
II 	~0, ТМБ: 3	IX 	~0%	XIII 	160	150 мкМ, 42%	бк
III 	7	X 	~0%	XIV 	300	~0%	–
IV 	6						
V 	8						
VI 	15	XI 	75 мкМ, 36%	XV 	17.5	10 мкМ, 21%	см

Таблица 2. Характеристика ингибирования окисления ФДА и ТМБ в системе гемин–БСА (10 мкМ : 5 мкМ)–H₂O₂ кислородсодержащими ароматическими соединениями XVI–XXVI: 20°C, ЗФР, pH 7.4, 6 мМ H₂O₂ (0.5 мМ при окислении ТМБ), 6% ДМФ и 0.25% ДМСО. Типы ингибирования: бк – бесконкурентный и см – смешанный

Структура и номер InH	[InH], мкМ	K _i , % ингибирования	Тип ингибирования	Структура и номер InH	[InH], мкМ	K _i , % ингибирования	Тип ингибирования
XVI 	16	ТМБ: 10 мкМ, 28%	см				
XVII 	300	11%	–				
XVIII 	200	300, 27%	бк	XXIII 	300	500 мкМ, 15%	бк
XIX 	300	12%	–	XXIV 	150	50 мкМ, 38%	см
XX 	120	77 мкМ, 37%	см				
XXI 	120	63 мкМ, 30%	бк	XXV 	12.5	ТМБ: 15.5 мкМ, 48%	бк
XXII 	70	15 мкМ, 34%	бк	XXVI 	35	13 мкМ, 45%	бк

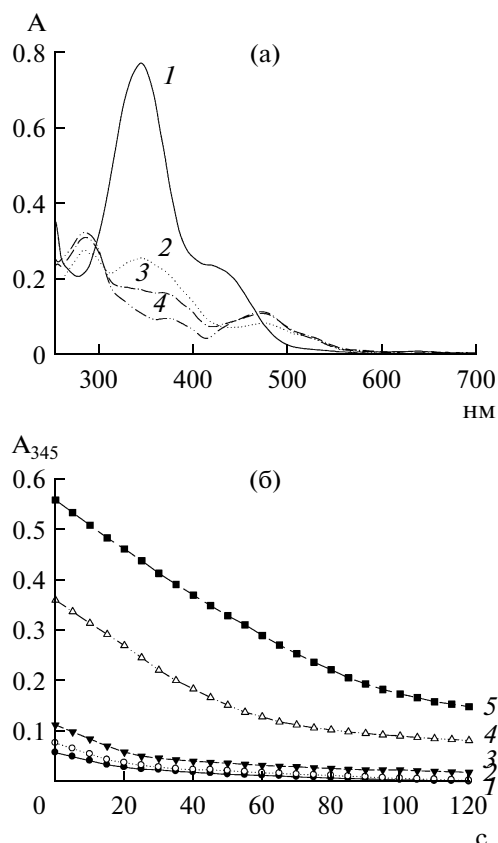


Рис. 1. Спектры поглощения и кинетика окисления синапового альдегида в системе гемин–БСА– H_2O_2 . Спектры поглощения синапового альдегида (50 мкМ) и продуктов его окисления в системе гемин–БСА (а) (10–5 мкМ)– H_2O_2 (6.0 мМ) во времени: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 с при 20°C в ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 1 см кювета. Кинетика расходования синапового альдегида (б) (1 – 2, 2 – 6, 3 – 10, 4 – 30, 5 – 50 мкМ) в единицах его оптической плотности A_{345} в системе гемин–БСА (10–5 мкМ)– H_2O_2 (6.0 мМ) при 20°C в ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 см кювета.

ингибирования K_i в мкМ [6, 7]. Для определения K_i применяли метод Диксона, строя кривые зависимости V_0^{-1} от $[\text{InH}]_0$ [17], или метод Корниш–Бодена [18], строя кривые зависимости $[\text{S}]_0/V_0$ от растущей концентрации $[\text{InH}]_0$, где $[\text{S}]_0$ – начальная концентрация субстрата (ФДА или ТМБ). Для определения стехиометрического коэффициента ингибирования f использовали теорию метода ингибиторов свободнорадикальных реакций Н.М. Эмануэля и сотр. [19] и уравнения (1) и (2):

$$\Delta\tau = f[\text{InH}]_0/V_i, \quad (1)$$

$$V_0 \approx V_i = f(V_i/f), \quad (2)$$

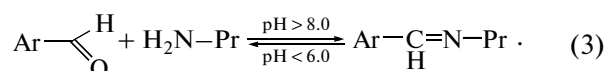
где $\Delta\tau$ – продолжительность периода индукции в накоплении продуктов окисления ТМБ, V_i – скорость иницирования радикалов, приближенно равная скорости окисления ТМБ в отсутствие ингибитора.

Детали метода подробно описаны в работах [3–6]. Эффективные константы ингибирования K_i определены графическим методом с ошибкой, не превышающей 7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сопряженное окисление ФДА с ароматическими соединениями, содержащими альдегидные группы, в псевдопероксидазной системе отличается некоторыми особенностями и методическими осложнениями, связанными с разными путями превращения бензальдегида (II) и его паразамещенных IX, XIII, коричневого альдегида (V) и его замещенных производных XXI и XXV. Перечисленные альдегиды взаимодействуют с радикалами HO^\bullet , генерируемыми в псевдопероксидазной системе, по связи $-\text{C}(\text{H})=\text{O}$ по гомолитическому радикальноцепному механизму, который детально изучен при жидкофазном окислении алифатических и ароматических альдегидов, инициированном свободными радикалами или катализированном солями многих переходных металлов, с образованием в качестве продуктов соответствующих кислот [20]. Гомолитическое окисление алифатических фрагментов соединений радикалами HO^\bullet может приводить к известной последовательности в гваяциловом ряду: кониферилловый альдегид (XXI) \rightarrow ванилин (XVIII) \rightarrow ванилиновая кислота (XIX); и в сирингиловом ряду: синаповый альдегид (XXV) \rightarrow сиреневый альдегид (XXIII) \rightarrow сиреневая кислота (XXIV) [9].

К сожалению, нельзя исключить также возможность реакции ароматических альдегидов с аминокгруппами белковой глобулы биокатализатора MetHa с образованием азометиновых связей [21]:



Продукты конденсации amino- и альдегидсодержащих соединений – основания Шиффа – образуются легко только в щелочных средах и в этих условиях весьма стабильны, а в кислых средах они легко разрушаются с регенерацией исходных веществ реакции [22]. Поскольку все реакции сопряженного окисления аминов и фенолов проведены нами в строго стандартных условиях (20°C, ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО), то при рН 7.4 нельзя полностью исключить возможность реакции (3).

Для проверки такой версии проведено спектрофотометрическое изучение окисления синапового альдегида в псевдопероксидазной системе в отсутствие акцептора радикалов ФДА в стандартных условиях. На рис. 1а представлены спектральные изменения исходного соединения XXV в ходе его окисления и спектры образующихся продуктов: видно, что альдегид XXV быстро расходует, что сопровождается резким уменьшением поглощения

света в максимуме при 345 нм по кинетическому закону первого порядка (рис. 1б). По данным рис. 1б определена начальная скорость расходования XXV, равная при его исходной концентрации 6 мкМ $2.25 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$. На рис. 1а видно, что один из продуктов окисления имеет полосу поглощения с максимумом 470 нм и значением $A \sim 0.1$. Эта полоса поглощения может принадлежать основанию Шиффа, образованному по реакции (3) с аминогруппой биокатализатора MetHa. Альдегиды XVIII и XXIII не вступали в реакцию (3) в условиях эксперимента, альдегид XXI быстро взаимодействовал с MetHa, так что оптическая плотность A_{470} была невелика и постоянна в ходе окисления XXI.

Ингибированное окисление ТМБ в системе MetHa–H₂O₂–ТМБ. На рис. 2а показаны кинетические кривые накопления продукта окисления ТМБ в терминах оптической плотности A_{655} без ингибитора (1) и в присутствии синапового альдегида (XXV) (2–4): как видим, кинетика роста A_{655} характеризуется периодами индукции. Продолжительность периода индукции Δt линейно зависит от возрастающей концентрации XXV (рис. 2б) в полном соответствии с теорией метода ингибиторов свободнорадикальных процессов при их стационарном режиме [19]. С использованием уравнений (1) и (2) и с учетом того, что скорость инициирования $V_i \approx 2V_0$, так как на образование спектрально регистрируемого продукта реакции расходуется два катион-радикала ТМБ^{•+}, по данным рис. 2б вычислен коэффициент f , равный 2.7: т.е. одна молекула XXV акцептирует ~ 3 радикала. Зависимости в координатах Лайнуивера–Берка (не приводятся) подтвердили бесконкурентный характер ингибирования при окислении пары ТМБ–XXV, а из зависимостей в координатах Корниш–Бодуена определена K_i , равная 15.5 мкМ, т.е. синаповый альдегид – сильный ингибитор окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

Напомним, что начальная скорость расходования XXV (6 мкМ) в отсутствие ТМБ равна $2.25 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$ (рис. 1б). При концентрации XXV 6 мкМ скорость расходования ТМБ (0.5 мМ) равна $0.8 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$, т.е. в 2.7 раза ниже скорости окисления ингибитора XXV в абсолютно аналогичных условиях. С ростом концентрации XXV > 6 мкМ скорость расходования альдегида, естественно, будет возрастать, а скорость окисления ТМБ – снижаться.

На рис. 3а представлены кинетические кривые роста A_{655} при окислении ТМБ в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии возрастающих концентраций пирокатехина (2–8), характеризующиеся периодами индукции, продолжительность которых линейно зависит от начальной концентрации пирокатехина (рис. 3б). По данным рис. 3б, вычислена величина f , равная 2.2. На рис. 4а показаны зависимости в координатах Лайнуивера–Берка, подтверждающие бесконкурентный тип ингибирования. По данным

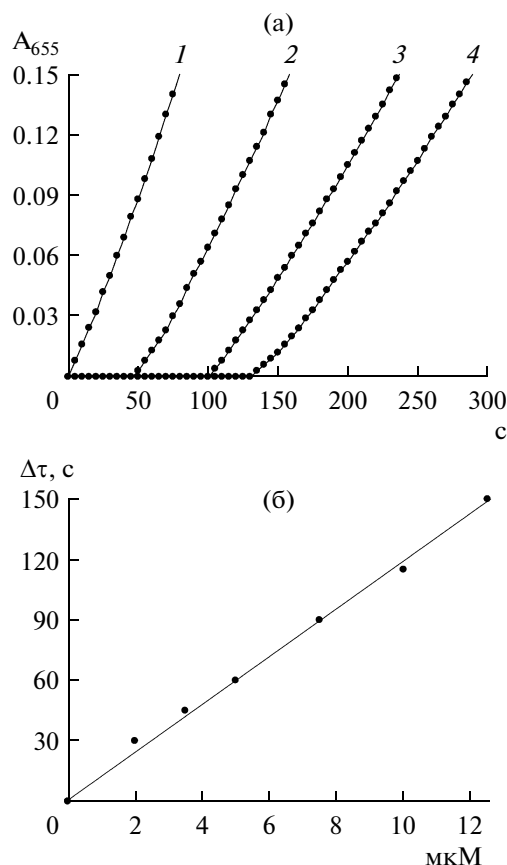


Рис. 2. Сопряженное окисление ТМБ и синапового альдегида в системе гемин–БСА–H₂O₂. Кинетические кривые (а) роста оптической плотности продукта окисления ТМБ (0.5 мМ) в системе гемин–БСА–H₂O₂ без ингибитора (1) и в присутствии синапового альдегида в концентрациях 5 (2), 10 (3), 12.5 мкМ (4). Зависимость продолжительности периода индукции (б) в накоплении продукта окисления ТМБ от концентрации синапового альдегида в системе гемин–БСА–H₂O₂: 20°C, 3ФР, рН 7.4, [H₂O₂] = 0.5 мМ, [DMF] = 6%, [DMSO] = 0.25%.

рис. 4б, в координатах Диксона определена величина K_i , равная 5 мкМ, т.е. пирокатехин является высокоэффективным ингибитором окисления ТМБ в системе MetHa–H₂O₂.

По аналогичной схеме охарактеризовано сопряженное окисление пары ТМБ–гваякол (XVI): – кинетическими кривыми роста A_{655} без ингибитора и в его присутствии (рис. 5а), зависимостью продолжительности периода индукции от начальной концентрации гваякола (рис. 5б), из которой определена величина f , равная 2.2, зависимостями в координатах Лайнуивера–Берка (не показаны), подтверждающими смешанный тип ингибирования и зависимостями в координатах Диксона (рис. 5в), по данным которого определена величина K_i для гваякола, равная 10 мкМ, т.е. блокирование одной из НО-групп ее метилированием приводит к росту K_i в 2 раза по

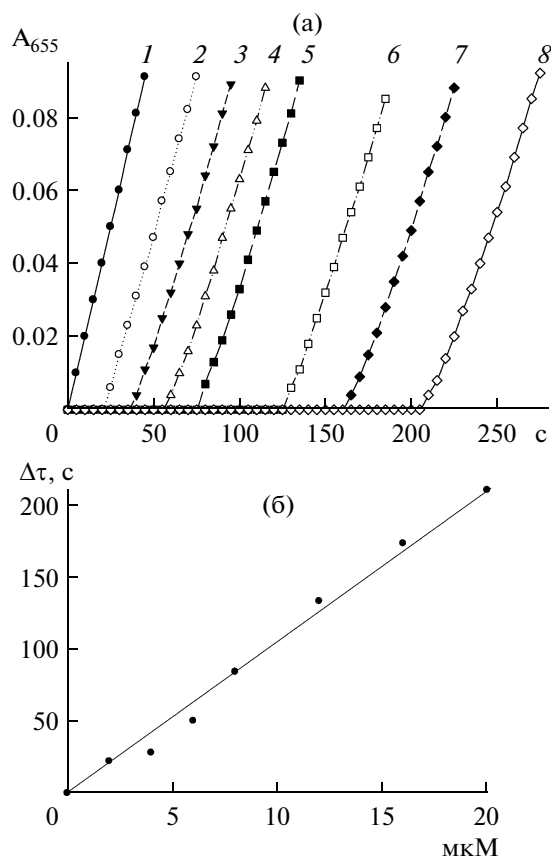


Рис. 3. Сопряженное окисление ТМБ и пирокатехина в системе гемин–БСА– H_2O_2 . Кинетика роста оптической плотности (а) продукта окисления ТМБ (0.5 мМ) в системе гемин–БСА– H_2O_2 в присутствии 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 12 (6), 16 (7), 20 (8) мкМ пирокатехина. Зависимость продолжительности периода индукции (б) в окислении ТМБ (0.25 мМ) от концентрации пирокатехина: 20°C, ЗФР, рН 7.4, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5$ мМ, $[\text{ДМФ}] = 6\%$, $[\text{ДМСО}] = 0.25\%$.

сравнению с ее значением для пирокатехина, имеющего 2 радикалацептирующих центра. Величина K_i определена также для пары ТМБ–фенол (VII): она равна 4 мкМ.

В табл. 1 и 2 представлены количественные характеристики ингибированного окисления ТМБ в сопоставлении со структурой использованных ингибиторов. По эффективности ингибирующего действия в соответствии с величинами K_i в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$ -ТМБ исследованные соединения могут быть расположены в ряд по убывающей антиоксидантной активности: фенол (VII) > пирокатехин (XII) > гваякол (XVI) > синаповый альдегид (XXV) \gg бензальдегид (II). Ясно, что ингибирующая активность связана, в первую очередь, с наличием фенольных HO -групп в ароматическом кольце и практически отсутствует у бензальдегида.

Общей отличительной чертой окисления всех пар ТМБ–InН является проявление продолжитель-

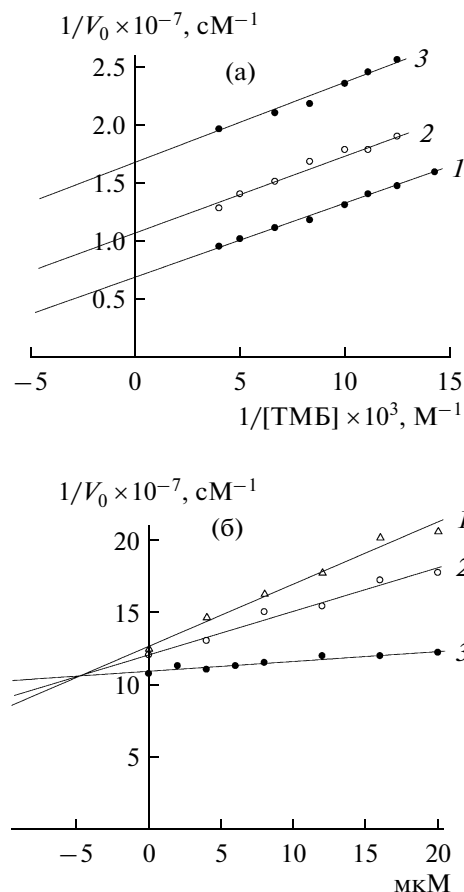


Рис. 4. Ингибирование окисления ТМБ пирокатехином в системе гемин–БСА– H_2O_2 . Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной начальной концентрации (а) и от концентрации пирокатехина (б) в системе гемин–БСА– H_2O_2 в ЗФР, рН 7.4, при 20°C, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5$ мМ, $[\text{ДМФ}] = 6\%$, $[\text{ДМСО}] = 0.25\%$: а – 1 – 0, 2 – 8 и 3 – 16 мкМ пирокатехина; б – 1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.5 мМ ТМБ.

ных периодов индукции в накоплении продукта окисления ТМБ, что объясняется обменной реакцией катион-радикалов $\text{ТМБ}^{\bullet+}$ с фенольными ингибиторами:



Обменная реакция (4) была открыта Н.М. Эмануэлем и сотр. при исследовании жидкофазного ингибированного окисления углеводов смесями амин–фенол [23, 24] и в нашем случае протекает в одном направлении слева направо, обеспечивая регенерацию исходного субстрата ТМБ и, как следствие, лаг-фазу в накоплении $\text{ТМБ}^{\bullet+}$ [6, 7]. Значения коэффициента f , полученные для пирокатехина, гваякола и синапового альдегида (2.2–2.7), свидетельствуют, что эти соединения реагируют с 2–3 радикальными частицами до полного израсходования, после чего окисление ТМБ продолжается с пониженными скоростями (рис. 2а, 3а, 5а). Фенол, пирокатехин, гваякол и синаповый альдегид – эф-

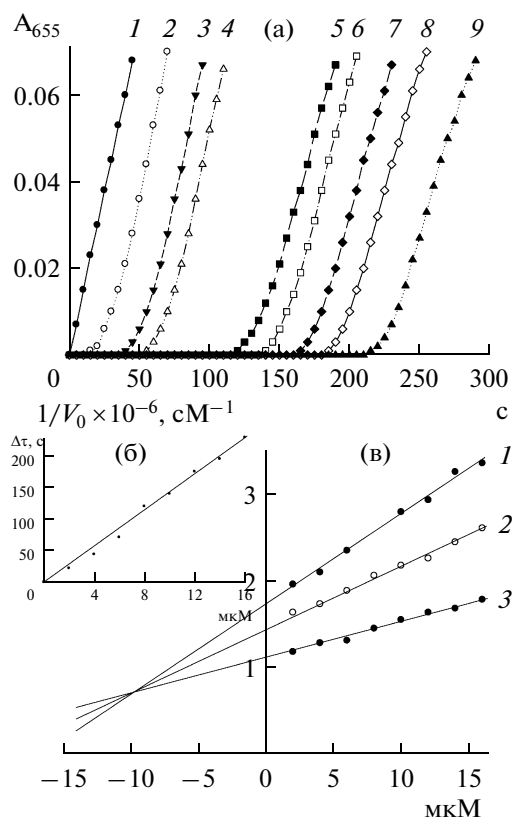


Рис. 5. Сопряженное окисление ТМБ и гваякола в системе гемин–БСА– H_2O_2 . Кинетика роста оптической плотности (а) продукта окисления ТМБ (0.25 мМ) в системе гемин–БСА– H_2O_2 в присутствии 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6), 12 (7), 14 (8) и 16 (9) мкМ гваякола. Зависимость продолжительности периода индукции (б) в окислении ТМБ (0.25 мМ) от концентрации гваякола. Зависимость обратной начальной скорости (в) окисления ТМБ (1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ) от концентрации гваякола. 20°C, ЗФР, pH 7.4, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5$ мМ, $[\text{ДМФ}] = 6\%$, $[\text{ДМСО}] = 0.25\%$.

эффективные ингибиторы окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе, так как величины их K_i равны 4, 5, 10 и 15.5 мкМ соответственно.

Ингибированное окисление ФДА в системе MetHa– H_2O_2 –ФДА. Сопряженное окисление ФДА с использованными ароматическими соединениями отличается от окисления пар ТМБ–InH тем, что на кинетических кривых роста оптической плотности A_{455} продукта окисления ФДА полностью отсутствуют периоды индукции, т.е. реакция (4) аминильного радикала ФДА \cdot с PhOH слева направо не идет. Во многих случаях глубина ингибирования окисления ФДА мала даже при концентрациях InH до 300 мкМ, сопоставимых с концентрацией субстрата (0.25 мМ). При незначительном ингибировании его уровень характеризовали в процентах при концентрации InH 300 мкМ.

В табл. 1 представлены количественные характеристики ингибирования окисления ФДА в системе

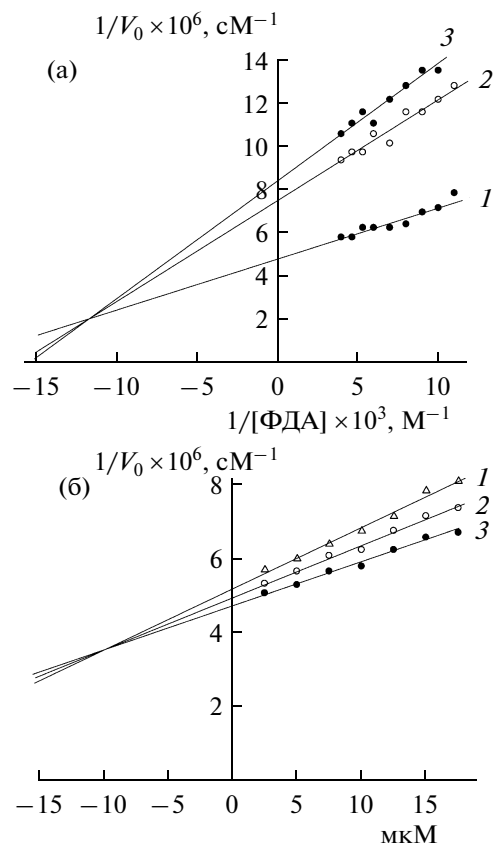


Рис. 6. Ингибирование окисления ФДА кофейной кислотой в системе гемин–БСА– H_2O_2 . Зависимости обратной начальной скорости (а) окисления ФДА от его обратной начальной концентрации и от концентрации кофейной кислоты (б) в системе гемин–БСА– H_2O_2 в ЗФР, pH 7.4 при 20°C. 6.0 мМ H_2O_2 , 6% ДМФ, 0.25% ДМСО: 1 – 0, 2 – 70 и 3 – 150 мкМ кофейной кислоты (а); 1 – 0.12, 2 – 0.17 и 3 – 0.25 мМ ФДА (б).

MetHa– H_2O_2 соединениями I–VI, не имеющими в ароматическом кольце фенольных HO-групп, но содержащих спиртовые, альдегидные и кислотные заместители: уровень ингибирования окисления ФДА такими соединениями низок (2–15% при концентрации InH 300 мкМ), но повышается в последовательности спирт < альдегид < кислота, как для бензилового спирта (I) и продуктов его окисления (II, III), так и для коричневого спирта (IV) и его продуктов (V, VI). Введение в соединения I–III и VI HO-групп в пара-положение мало сказывается на ингибирующей активности п-оксипроизводных бензилового спирта (VIII), бензальдегида (IX) и бензойной кислоты (X), но резко увеличивает активность п-оксикоричной кислоты (XI), для которой определена K_i , равная 75 мкМ, свидетельствующая о высокой ингибирующей эффективности.

На рис. 6а показаны кривые зависимости начальной скорости окисления ФДА от его концентрации

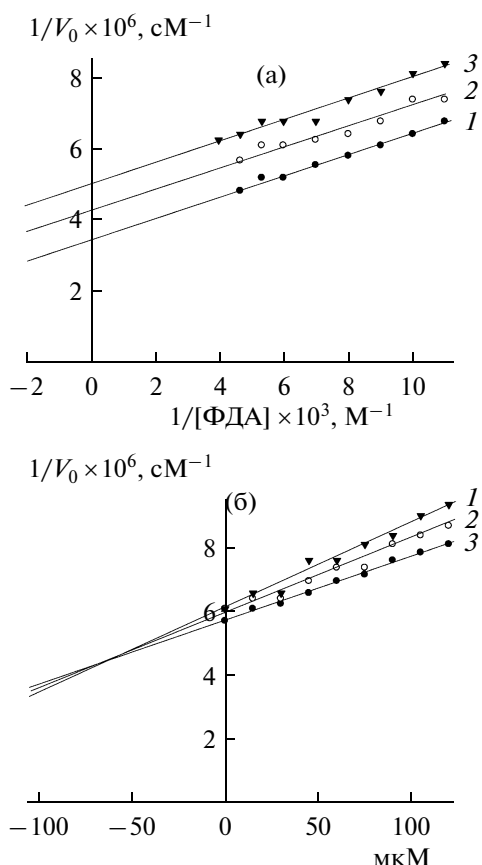


Рис. 7. Ингибирование окисления ФДА кониферильным альдегидом в системе гемин–БСА– H_2O_2 . Зависимости обратной начальной скорости (а) окисления ФДА от его обратной начальной концентрации и от концентрации кониферильного альдегида (б) в системе гемин–БСА– H_2O_2 в ЗФР, рН 7.4 при 20°C , 6.0 мМ H_2O_2 , 6% ДМФ, 0.25% ДМСО: 1 – 0, 2 – 45 и 3 – 90 мкМ кониферильного альдегида (а); 1 – 0.12, 2 – 0.17 и 3 – 0.25 мМ ФДА (б).

в двойных обратных координатах в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии кофейной кислоты (XV): как видно, XV сильно замедляет окисление ФДА, а прямые 1–3 пересекаются в одной точке в верхнем левом квадранте, что свидетельствует о смешанном типе ингибирования. Из зависимостей в координатах Диксона (рис. 6б) определена величина K_i , равная 10 мкМ, т.е. кофейная кислота является сильным ингибитором окисления ФДА.

Аналогичные зависимости в координатах Лайнуивера–Берка и Диксона получены для пары ФДА–кониферильный альдегид (XXI) (рис. 7а, 7б), подтверждающие бесконкурентный тип ингибирования; по данным рис. 7б, определена величина K_i , равная 63 мкМ, т.е. кониферильный альдегид является довольно эффективным ингибитором окисления ФДА в системе MetNa– H_2O_2 .

По аналогичной схеме изучено сопряженное окисление ФДА с соединениями гваяцилового ряда

XVII–XX, XXII и соединениями сиригилового ряда XXIII, XXIV и XXVI. Все количественные характеристики ингибированного окисления ФДА представлены в табл. 1 и 2, которые построены по следующему принципу: первая графа в табл. 1 представляет собой структуры кислородсодержащих ароматических соединений, не имеющих фенольной HO–группы, и их ингибирующая активность в процентах; вторая графа табл. 1 включает фенол и его паразамещенные производные VIII–XI и их ингибирующие характеристики; третья графа табл. 1 содержит пирокатехин (XII) и его производные XIII–XV, максимальные концентрации InH, ингибирующие параметры и типы ингибирования; в табл. 2 первая графа содержит гваякол (XVI) и соединения гваяцилового ряда XVII–XXII, а также характеристики ингибирования и его типы; вторая графа табл. 2 включает соединения сиригилового ряда XXIII–XXVI, количественные характеристики и типы ингибирования. Такое представление полученных результатов дает возможность сравнения характеристик ингибирования между собой и их соотношения со структурными особенностями изученных InH.

Для 13 пар субстрат–ингибитор определены типы ингибирования: бесконкурентный (XII, XIII, XVIII, XXI–XXIII, XXV, XXVI) в 8 случаях и смешанный (XI, XV, XVI, XX, XXIV) в 5 случаях. При бесконкурентном типе ингибирования ингибиторы взаимодействуют только с комплексами биокатализатор–субстрат, но не с самим метгемальбумином; при смешанном типе ингибиторы частично конкурируют с субстратом за связывание в активном центре биокатализатора. Тип ингибирования зависит от субстрата и структуры ингибитора, даже незначительные изменения которой влияют на характер ингибирования: например, при окислении ФДА ингибирование 3–метокси–4–оксикоричным спиртом (XX) смешанное, а 3–метокси–4–оксикоричным альдегидом (XXI) – бесконкурентное, т.е. соединения XX и XXI связываются по разным местам белковой глобулы MetNa; при окислении ТМБ пирокатехином (XII) – бесконкурентное, а при ингибировании гваяколом (XVI) – смешанное, т.е. более гидрофильный пирокатехин связывается только с комплексом MetNa–ТМБ, а более гидрофобный гваякол частично конкурирует с гидрофобным ТМБ за связывание с биокатализатором.

Ингибирующая активность изученных соединений в окислении ФДА и ТМБ, в первую очередь, определяется наличием HO–группы в ароматическом кольце. Ее отсутствие объясняет низкий уровень ингибирования соединениями I–VI (табл. 1), отражая малое участие кислородсодержащих функциональных групп в ингибировании окисления ФДА. Уровень ингибирования окисления ФДА для пара-замещенных соединений фенола (VIII–X) незначителен, но возрастает для п–оксикоричной кислоты (XI) ($K_i = 75$ мкМ), а сам фенол является высоко-

коэффициентным ингибитором (при окислении ТМБ $K_i = 4$ мкМ).

Пирокатехин (XII) – высокоэффективный ингибитор окисления ТМБ ($K_i = 5$ мкМ), а его производное – кофейная кислота (XV) – сильный ингибитор окисления ФДА ($K_i = 10$ мкМ), в то время как активность другого производного пирокатехина – 3-метоксибензальдегида (XIII) много ниже ($K_i = 150$ мкМ).

Как следует из табл. 2, гваякол (XVI) – высокоэффективный ингибитор окисления ТМБ ($K_i = 10$ мкМ), а его производные – XX, XXI и XXII – активные ингибиторы окисления ФДА (K_i равна 77, 63 и 15 мкМ соответственно). Из 4 изученных соединений ирингилового ряда (XXIII–XXVI) 3 обнаружили ингибирующую активность высокого уровня: синаповый альдегид (XXV) – сильный ингибитор окисления ТМБ ($K_i = 15.5$ мкМ), а сиреневая кислота (XXIV) и 3,5-диметокси-4-оксикоричная кислота (XXVI) эффективно ингибировали окисление ФДА (K_i равны 50 и 13 мкМ соответственно).

Представляет большой интерес сравнение ингибирующей активности InH не только по графам табл. 1 и 2, но и в строках. В верхней строке фенол, пирокатехин и гваякол проявили высокую активность в ингибировании окисления ТМБ, которая минимальна у гваякола из-за метилирования одной из HO-групп. Во второй строке бензиловый спирт и его производные оказались малоактивными в ингибировании окисления ФДА. В третьей строке в окислении ФДА были слабыми ингибиторами бензальдегид (II) и п-оксибензальдегид (IX), но замещенные бензальдегида XIII, XVIII и XXIII обнаружили умеренную ингибирующую активность (K_i равна 150, 300 и 500 мкМ соответственно). В четвертой строке бензойная кислота (III) и ее производные X, XIV и XIX обнаружили слабое ингибирующее влияние на окисление ФДА, но сиреневая кислота (XXIV) оказалась довольно эффективным ингибитором в псевдопероксидажном процессе ($K_i = 50$ мкМ). Коричный спирт (IV) незначительно замедлял окисление ФДА, но 3-метокси-4-оксикоричный спирт (XX) – эффективный ингибитор окисления ФДА ($K_i = 77$ мкМ). Коричный альдегид (V) слабо тормозил окисление ФДА, а кониферилловый альдегид (XXI) – активный ингибитор этого процесса ($K_i = 63$ мкМ). Еще более эффективным ингибитором оказался синаповый альдегид ($K_i = 15.5$ мкМ при окислении ТМБ). В седьмой строке слабое ингибирование обнаружила в окислении ФДА коричная кислота (VI), но все ее производные оказались эффективными ингибиторами, которые можно расположить в ряд по возрастающей антиоксидантной активности: оксикумаровая кислота (XI) < 3-метокси-4-оксикоричная кислота (XXII) < 3,5-диметокси-4-оксикоричная кислота (XXVI) < кофейная кислота (XV). Соединения седьмой строки хорошо отражают влияние на величину K_i заместителей в ароматиче-

ском кольце коричной кислоты: минимальная K_i (10 мкМ) у XV с двумя радикалацептирующими HO-группами; K_i возрастает до 13 мкМ у XXVI, где одна HO-группа метилирована, но в орто-положении к другой HO-группе находится электродонорная 5-метокси-группа, снижающая прочность Н–О-связи фенольной группы; удаление 5-метокси-группы у соединения XXII приводит к росту K_i до 15 мкМ; удаление обеих метокси-групп приводит у соединения XI к росту K_i до 75 мкМ. Таким образом, наличие электронодонорных заместителей в ароматическом кольце и их число существенно сказывается на реакционной способности фенольной HO-группы по отношению к активным свободным радикалам.

Практическое значение полученных результатов заключается в том, что на количественном уровне сравнена антиоксидантная активность компонентов лигнинового комплекса гваяцилового и сирингилового ряда в строго идентичных условиях окисления ароматических аминов в псевдопероксидажной системе. Все компоненты являются носителями антиоксидантных свойств, а отдельные из них отличаются высокой антиоксидантной активностью и характеризуются константами ингибирования от 10 до 150 мкМ. Величины эффективных констант ингибирования K_i отражают реакционную способность фенольных HO-групп в реакциях со свободными радикалами, влияние электронодонорных заместителей в ароматическом кольце ингибитора и стерические препятствия с ростом числа заместителей. Наиболее эффективными антиоксидантами природного происхождения оказались производные коричной кислоты.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Международного научного центра (МНТЦ) по проекту В-1746.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В. // Журн. прикл. химии. 1997. Т. 70. № 10. С. 1713–1720.
2. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 10. С. 1813–1824.
3. Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В., Шадыро О.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. № 3. С. 323–333.
4. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Ж. прикл. химии. 1998. Т. 71. № 5. С. 842–848.
5. Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышиников В.С. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 5. С. 628–639.
6. Метелица Д.И., Карасева Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 537–564.
7. Метелица Д.И., Пивень Н.В., Шадыро О.И., Григоренко Ю.А., Лухверчик Л.Н., Денисевич Н.П. // Тр. Белорус. гос. ун-та. 2008. Т. 3. Часть 1. С. 7–21.
8. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. С. 415–417.

9. Урсул О.Н., Курченко В.П., Власова Т.М., Гавриленко Н.В., Матюшина М.В. // Тр. Белорус. гос. ун-та. 2008. Т. 3. Часть 1. С. 210–220.
10. Скурухин И.М. Химия коньяка и бренди. М.: ДеЛи-Принт, 2005. 296 с.
11. Collier G.S., Praut J.M., De Wet C.R., Tschalala C.F. // Biochem. J. 1979. V. 179. № 2. P. 281–289.
12. Chmelíč I., Kadleček I., Kalons N. // J. Electroanal. Chem. 1979. V. 99. № 2. P. 245–250.
13. Русь О.Б., Метелица Д.И. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 4. С. 75–82.
14. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Л.: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
15. Карасева Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 6. С. 713–721.
16. Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 1. С. 116–124.
17. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–203.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2. С. 507.
19. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. // Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
20. Денисов Е.Т., Мицкевич Н.И., Агабеков В.Е. // Механизм жидкофазного окисления кислородсодержащих соединений. Минск: Наука и техника, 1975. С. 104–161.
21. Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А. Начала органической химии. Книга вторая. М.: Химия, 1970, С. 145.
22. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можяев В.В., Хмельницкий Ю.Л. // Иммуобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987. С. 92–93.
23. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1963. Т. 152. № 1. С. 110–114.
24. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1965. Т. 160. № 1. С. 158–162.

Antioxidant Activity of Oxygen-Containing Aromatic Compounds

M. V. Potapovich^a, V. P. Kurchenko^b, D. I. Metelitz^a, and O. I. Shadyro^a

^a Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

e-mail: pot-maxim@tut.by

^b Biological Faculty, Belarusian State University, Minsk, 220064 Belarus

e-mail: kurchenko@tut.by

Received October 15, 2010

Abstract—Inhibition efficiency (antioxidant activity) of 26 oxygen-containing aromatic compounds was studied in methemalbumin–H₂O₂–*o*-phenylenediamine (PDA) or tetramethylbenzidine (TMB) pseudoperoxidase system at 20°C in buffered physiological solution (pH 7.4) containing 6% DMF and 0.25% DMSO. The inhibitor's efficiency was quantitatively characterized by the inhibition constants (K_i , μM) or the inhibition degree (%). K_i values varied in the range of 4 to 500 μM and were influenced by a substrate, the structure of an inhibitor, hydroxyl groups, electron-donating substituents in aromatic ring, and steric hindrances. The type of inhibition at cooxidation of eight pairs was noncompetitive, and that of five pairs was mixed and determined by the substrate nature and the inhibitor structure. Lignin phenolic compounds of guaiacyl and syringal series exhibited high antioxidant activity (K_i in the range of 10–300 μM), and their efficiency decreased in the following order: caffeic acid > synaldehyde > syringic acid > coniferyl aldehyde > *para*-hydroxycoumaric acid.