

УДК 577.152.1.01:7+541.516:57.042.2+663.241+543

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА

© 2012 г. М. В. Потапович, Д. И. Метелица, О. И. Шадыро

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

Поступила в редакцию 19.09.2011 г.

Изучена эффективность ингибиторов (антиоксидантная активность) оксипроизводных кумарина — эскулетина, дикумарола и фраксетина в псевдопероксидазной системе метгемальбумин— H_2O_2 —тетраметилбензидин при $20^\circ C$ в забуференном физиологическом растворе, pH 7.4, содержащем 6% диметилсульфоксида. Эффективность ингибиторов количественно охарактеризована константами ингибирования K_i , мкМ и величиной ингибирования в процентах. Величины K_i равны 9.5; 15 и 26 мкМ для эскулетина, дикумарола и фраксетина соответственно. Эскулетин и фраксетин ингибируют псевдопероксидазное окисление ТМБ по бесконкурентному типу, а дикумарол — по смешанному. Ингибирующая активность эскулетина при окислении ТМБ в пероксидазной системе характеризуется при pH 6.4 величиной K_i , равной 1.15 мкМ, а ингибирование носит конкурентный характер. Эскулетин — самый эффективный антиоксидант растительного происхождения из всех ранее исследованных в биохимических модельных системах.

Реакции свободнорадикального окисления являются важной составной частью нормального клеточного метаболизма и постоянно протекают в организме человека и животных. В биохимических процессах образуются и играют важную роль кислородсодержащие радикалы $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} (RO^{\cdot}), HO_2^{\cdot} (RO_2^{\cdot}) и пероксид водорода H_2O_2 [1–3]. В физиологических условиях клетки и ткани имеют вполне адекватную внутри- и внеклеточную защиту, противостоящую повышенному генерированию и разрушающему действию активных радикалов. Ухудшение экологической обстановки, химизация различных отраслей промышленности, сельского хозяйства и быта, пролонгированные стрессовые ситуации, злоупотребление алкоголем и курением приводят к тому, что в организме человека под влиянием этих факторов и радиоактивных загрязнений в несравненно большем количестве, чем в нормальных условиях, образуются активные радикалы и другие реакционноспособные вещества, существенно нарушающие нормальный ход обменных процессов [3–5].

По этим причинам актуальными проблемами современной биохимии и биотехнологии остаются следующие направления: оценка и измерение концентрации активных радикалов и скорости их

инициирования *in vivo* и в адекватных модельных системах *in vitro*; количественная характеристика антиоксидантного статуса организма человека и животных, в частности общей антиоксидантной активности (ОАА) биологических жидкостей (плазма и сыворотка крови, моча, слюна и др.); синтез новых высокоэффективных ингибиторов свободнорадикальных процессов, включающих не только функциональные группы, ответственные за антирадикальную активность, но и группы с направленным специфическим действием на мембраны, мезофазные переходы в них, на клеточные рецепторы, установление связи структуры синтетических и природных антиоксидантов (ингибиторы) с их активностью в широком интервале концентраций от 10^{-18} до 10^{-2} М, часто определяющих механизм действия ингибиторов. Решением перечисленных задач мы с коллегами занимаемся более 20 лет.

Прямое измерение концентрации свободных радикалов *in vitro* (и особенно *in vivo*), как правило, сильно затруднено. По этой причине до сих пор главным инструментом изучения инициирования свободнорадикальных жидкофазных процессов остается метод ингибиторов, основы которого созданы академиком Н.М. Эмануэлем и его учениками еще в 50–60-х годах XX века [6, 7]. Необходимость количественной характеристики инициирования радикалов в реальных условиях и потребность в быстром отборе потенциальных ингибиторов (антиоксиданты) в сравнительно простых условиях (20 – $36^\circ C$, водные растворы) обусловили интенсивное изучение многочисленных пар гемсодержащий биокатализатор — H_2O_2 ($ROOH$), где $ROOH$ — органические гидроперок-

Сокращения. БСА — бычий сывороточный альбумин, ДМСО — диметилсульфоксид, ДМФ — диметилформамид, ЗФР — забуференный физиологический раствор, pH 7.4, ОАА — общая антиоксидантная активность, ПХ — пероксидаза корней хрена, ТМБ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ФДА — о-фенилендиамин, ФЦБ — фосфат-цитратный буфер, ИнН — ингибиторы свободнорадикальных процессов, f — стехиометрический коэффициент ингибирования, K_i — константа ингибирования, MetHa — метгемальбумины.

сиды, а в качестве биокатализаторов использованы пероксидаза хрена и так называемые псевдопероксидазы — гемин, метмиоглобин, метгемоглобин и метгемальбумины (MetHa) [2, 8–10]. В качестве акцепторов радикальных частиц использованы известные субстраты пероксидаз — АБТС (2,2'-азино-ди-(3-этил-2,3-дигидробензтиазолин-6-сульфоная кислота)), ФДА и ТМБ, при окислении которых образуются детально изученные продукты, что обеспечивает надежный и быстрый спектрофотометрический мониторинг свободнорадикального процесса. В качестве ингибиторов пероксидазного и псевдопероксидазного окисления АБТС, ФДА и ТМБ нами изучены синтетические соединения из ряда замещенных фенолов и пирокатехинов, производных замещенных о-аминофенолов, многоатомных фенолов, полифенолов и антиоксидантов нового поколения — полидисульфидов замещенных фенолов [8, 9].

Для количественной характеристики процессов сопряженного окисления ароматических аминов (ФДА и ТМБ) и многочисленных соединений фенольной природы использованы эффективные величины констант ингибирования K_i , мкМ, продолжительность периодов индукции в накоплении продуктов окисления ФДА или ТМБ, Δt , если они обнаруживаются, и коэффициенты ингибирования f , означающих число радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле фенольного ингибитора. Многократно показано, что величины K_i адекватно отражают эффективность ингибиторов, меняются в широких пределах от нескольких до сотен мкМ и сильно зависят от типа субстрата и природы ингибитора [8–10].

Для практики очень важна не только активность ингибирующего действия антиоксиданта, но и другие характеристики, в частности его токсические свойства. В этой связи особый интерес приобретают антиоксиданты природного происхождения — токоферолы и их многочисленные аналоги [11], флавоноиды растительного происхождения — кверцетин, морин, силибин, кэмпферол, катехин и др. [8], производные лигнина гваяцилового и сирингилового ряда [10].

По нашему мнению, в качестве потенциальных нетоксичных антиоксидантов растительного происхождения большой интерес представляют оксипроизводные кумарина — эскулетин, фраксетин и дикумарол, антиоксидантные свойства которых до сих пор не охарактеризованы. В растительном мире широко распространены эскулетин и умбеллиферон, которые как и сам кумарин определяют запах цветов донника и поэтому применяются в парфюмерных композициях при изготовлении духов и одеколонов. Дикумарол давно известен и используется в медицине как антикоагулянт при терапии заболеваний, сопровождаю-

щихся образованием тромбов. Структурные формулы кумарина и его трех оксипроизводных представлены в таблице.

Цель работы — использование псевдопероксидазной системы метгемальбумин— H_2O_2 —ТМБ для количественной характеристики и сравнения антиоксидантной активности кумарина и его оксипроизводных, а также сопоставление сопряженного окисления эскулетина и ТМБ в псевдопероксидазной и пероксидазной системах для обоснованного выбора наиболее эффективного антиоксиданта кумаринового ряда.

МЕТОДИКА

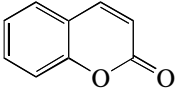
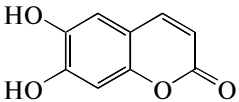
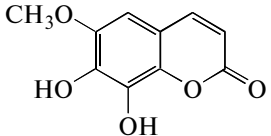
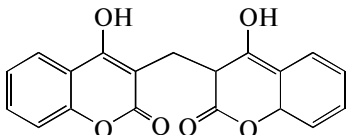
Объекты исследования. В работе использовали кумарин, 6,7-ди-окси-кумарин (эскулетин), 7,8-ди-окси-6-метокси-кумарин (фраксетин) и (3,3'-метилден-бис)4-окси-кумарин (дикумарол) фирмы "Sigma-Aldrich", США без дополнительной очистки.

Реагенты. Использовали пероксидазу корней хрена (КФ 1.11.1.7), изоэнзим С с оптическим показателем чистоты $RZ = 3.25$ производства "Bioenzyme Laboratories", Blaenavon, Gwent (Великобритания). Концентрацию ПХ определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярного поглощения в максимуме полосы Сорс (403 нм), равный $102000 M^{-1} cm^{-1}$ [12]. Применяли гемин фирмы "Serva" (Германия), раствор которого готовили в ДМСО и определяли концентрацию спектрофотометрически с использованием коэффициента молярного поглощения $174000 M^{-1} cm^{-1}$ при 405 нм [13]. Концентрацию БСА фирмы "Sigma" (США) без дополнительной очистки определяли с использованием коэффициента ϵ (280 нм) $35000 M^{-1} cm^{-1}$ [14]. Метгемальбумин получали по методике, описанной ранее [15], с соотношением компонентов 10 мкМ гемина/5 мкМ БСА.

В качестве субстрата-восстановителя применяли ТМБ ("Serva", Германия), а в качестве субстрата окислителя — разбавленный пероксид водорода, определяя концентрацию H_2O_2 с использованием ϵ (230 нм) $72.4 M^{-1} cm^{-1}$ [16]. Органические соразтворители ДМСО и ДМФ перед употреблением перегоняли. Для приготовления ЗФР, рН 7.4 и ФЦБ, рН 6.4 использовали соли и лимонную кислоту производства "Реахим" (Россия).

Окисление ТМБ в системе MetHa— H_2O_2 . Окисление без ингибиторов и в их присутствии проводили при 20°C в термостатируемых кюветах фотометра КФК-3 (Россия) в среде ЗФР, рН 7.4, содержащем 6% ДМФ и 0.25% ДМСО, что обеспечивало полную гомогенность реакционной смеси. Реакцию начинали добавлением раствора H_2O_2 и следили за образованием продукта окисления ТМБ по поглощению света в его миниму-

Ингибирование окисления ТМБ (0.09–0.25 мМ) в системе MetNa–H₂O₂ оксипроизводными соединениями кумарина, 20°C, 3ФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, гемин-БСА (10 мкМ, 5 мкМ), 0.5 мМ H₂O₂

InH	Структурная формула	[InH] _{макс} , мкМ	Ингибирование, %	K _i , мкМ	Тип ингибирования**
Кумарин		300	0	–	–
Эскулетин		6 3*	33 12*	9.5 1.15*	бк к*
Фраксетин		24	23	26	бк
Дикумарол		12	37	15	см

* Система ПХ–H₂O₂: 20°C, 15 мМ ЦФБ, рН 6.4, 6% ДМФ, 2 мМ H₂O₂, 0.3 нМ ПХ, 0.02–0.4 мМ ТМБ.

** Тип ингибирования: к – конкурентный, бк – бесконкурентный, см – смешанный.

ме A₆₅₅. При расчете скорости реакции использовали ε (655 нм) продукта окисления, равный 39000 М⁻¹ см⁻¹ [12]. При наличии периодов индукции в накоплении продукта окисления ТМБ совместно с ингибиторами для расчета скоростей реакции использовали строго линейные участки кинетических кривых роста A₆₅₅ после окончания лаг-периода.

Окисление ТМБ в системе ПХ–H₂O₂. Окисление без ингибиторов и в присутствии эскулетина проводили при 20°C в термостатируемой ячейке спектрофотометра “Spekol-211” (“Carl Zeiss”, Германия) в среде ФЦБ, рН 6.4, содержащего 6% ДМФ, 0.3 нМ ПХ, 2 мМ H₂O₂, 0.02–0.4 мМ ТМБ и разные концентрации эскулетина. Реакцию начинали добавлением H₂O₂ и следили за ней, как описано выше.

Ингибирование окисления ТМБ в псевдопероксидазной и пероксидазной системах. Для определения типа ингибирования строили кривые зависимости V₀ от начальной концентрации субстрата в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера–Берка [17]). Эффективность ингибиторов характеризовали константами ингибирования K_i в мкМ [8–10]. Для определения K_i применяли метод Диксона, строя кривые зависимости V₀⁻¹ от [InH]₀, или метод Корниш–Боудена [18], строя кривые зависимости [S]₀/V₀ от растущей концен-

трации [InH]₀, где [S]₀ – начальная концентрация субстрата ТМБ. Для определения стехиометрического коэффициента ингибирования f использовали теорию метода ингибиторов свободнорадикальных реакций Н.М. Эмануэля и сотр. [6] и уравнения (1) и (2):

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

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

где Δτ – продолжительность периода индукции в накоплении продуктов окисления ТМБ, V_i – скорость иницирования радикалов, приблизительно равная скорости окисления ТМБ в отсутствие ингибитора. Эффективные константы ингибирования K_i определены графическим методом с ошибкой, не превышающей 7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Совместное окисление ТМБ (0.09–0.25 мМ) в присутствии разных концентраций кумарина вплоть до 0.3 мМ в системе MetNa–H₂O₂ в стандартных условиях (20°C, 0.5 мМ H₂O₂, 3ФР, рН 7.4) показало, что кумарин не обнаружил ингибирующего влияния на превращения ТМБ: это объясняется отсутствием в его молекуле фенольных НО-групп.

На рис. 1а показаны кинетические кривые накопления продукта окисления ТМБ в терминах

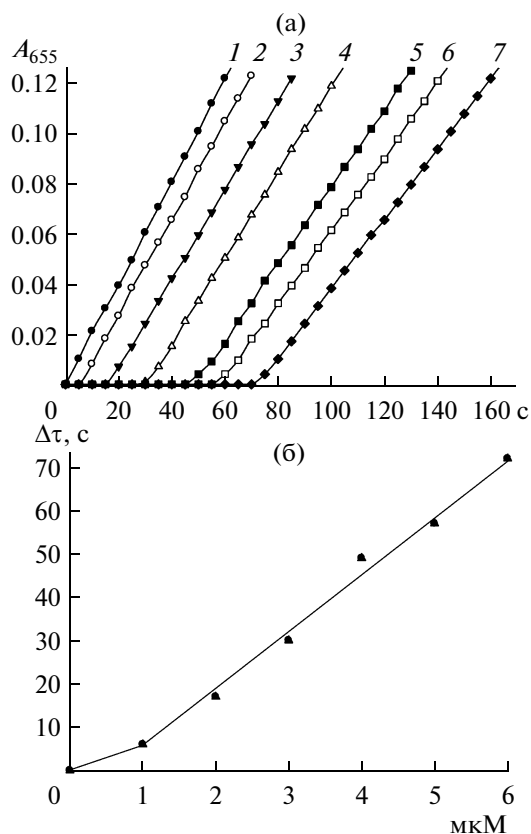


Рис. 1. Сопряженное окисление ТМБ и эскулетина в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$. Кинетические кривые (а) роста оптической плотности (A_{655}) продукта окисления ТМБ (0.25 мМ) 1 – без ингибитора и в его присутствии (мкМ): 2 – 1, 3 – 2, 4 – 3, 5 – 4, 6 – 5, 7 – 6.

Зависимость продолжительности периода индукции (б) в накоплении продукта окисления ТМБ ($\Delta\tau$, с) от концентрации эскулетина (мкМ) в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$: 3ФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H_2O_2 .

оптической плотности A_{655} без ингибитора (1) и в присутствии эскулетина (2–7). Как видим, кинетика роста A_{655} характеризуется периодом индукции. Продолжительность периода индукции $\Delta\tau$ линейно зависит от возрастающей концентрации эскулетина (рис. 1б) в полном соответствии с теорией методов ингибирования свободнорадикальных процессов в жидкой фазе при их стационарном режиме [6]. С использованием уравнений (1) и (2) и с учетом того, что скорость иницирования $V_i \approx 2V_0$, так как на образование спектрально регистрируемого продукта реакции расходуется два катион-радикала $\text{TMB}^{\bullet+}$, по данным рис. 2б вычислен коэффициент f , равный до 1 мкМ эскулетина 1.3, а при концентрациях ингибитора 2–6 мкМ – 2.2. При малых концентрациях ингибитора на нем гибнет одна радикальная частица, а при больших в среднем – два катион-радикала $\text{TMB}^{\bullet+}$.

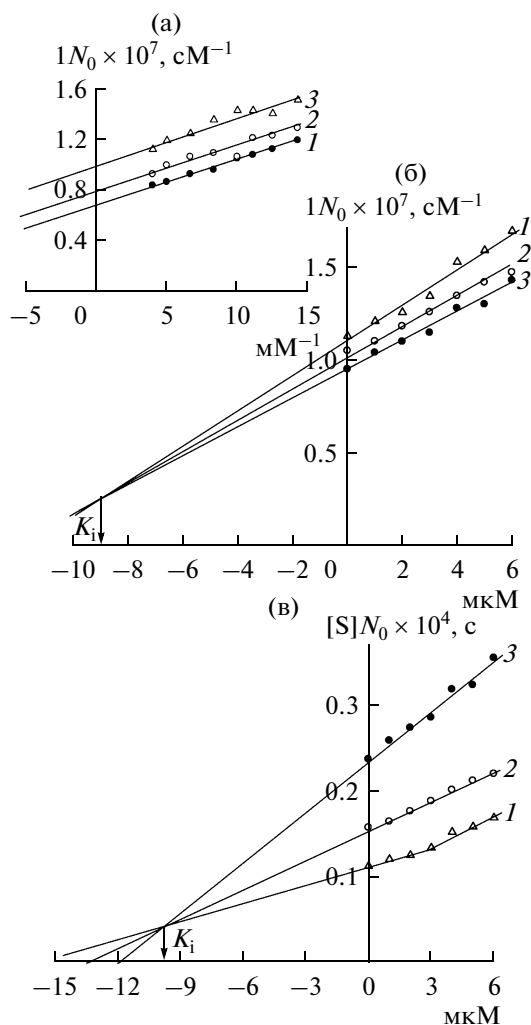


Рис. 2. Ингибирование окисления ТМБ эскулетинном в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$.

Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации, мМ^{-1} (а), концентрации (мкМ) эскулетина (б), величины $[\text{TMB}]/V_0$ от концентрации (мкМ) эскулетина (в) в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$: 3ФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H_2O_2 .

(а) 1 – 0, 2 – 3, 3 – 6 мкМ эскулетина; (б) 1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ ТМБ; (в) 1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ ТМБ.

Зависимости в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 2а) подтвердили бесконкурентный характер ингибирования при псевдопероксидазном окислении пары ТМБ–эскулетин. Из зависимостей в координатах Диксона (рис. 2б) и координатах Корниш–Бодена (рис. 2в) определены величины константы ингибирования K_i , равные 9 и 10 мкМ соответственно, т.е. средняя величина $K_i = 9.5 \pm 0.5$ мкМ. Это означает, что эскулетин является высокоэффективным ингибитором окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

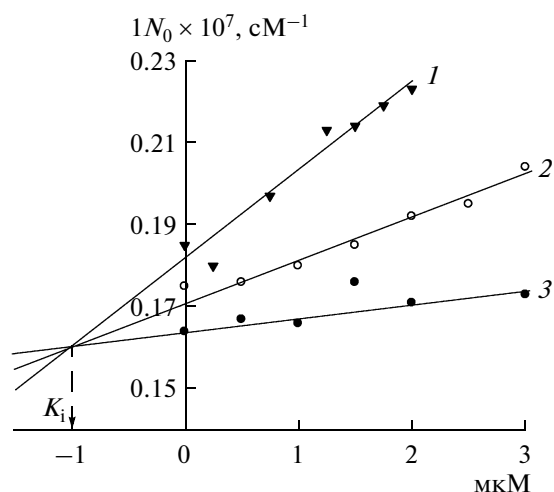


Рис. 3. Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от концентрации эскулетина (мкМ) в системе MetHa–H₂O₂: ФЦБ, рН 6.4, 6% ДМФ, 0.3 нМ ПХ, 2 мМ H₂O₂; 1–0.1, 2–0.2, 3–0.4 мМ ТМБ.

Представляет интерес сравнение ингибирующего действия эскулетина на окисление одного и того же субстрата ТМБ в псевдопероксидазной (MetHa–H₂O₂) и пероксидазной (ПХ–H₂O₂) системе, которые отличаются природой окисляющих агентов – радикалы HO· в первом случае и активированные комплексы I и II пероксидазы – во втором, а также структурой гидрофобных активных центров [8, 19]. Изучение совместного окисления пары ТМБ–эскулетин в системе ПХ (0.3 нМ) – H₂O₂ (2 мМ) проведено при 20°C в среде ФЦБ, рН 6.4, содержащей 6% ДМФ: выбор рН связан с резким падением активности ПХ с увеличением рН, а максимальная активность в окислении ТМБ обычно наблюдается при рН 5.5 [8, 12, 19]. Нами показано, что при пероксидазном окислении пары эскулетин–ТМБ в указанных выше условиях отсутствуют периоды индукции в накоплении продукта окисления ТМБ, а характер зависимости скорости окисления от концентрации ТМБ в двойных обратных координатах доказывает конкурентный тип ингибирования. На рис. 3 представлены кривые зависимости пероксидазного окисления пары ТМБ–эскулетин в координатах Диксона, которые подтверждают конкурентный тип ингибирования. По данным рис. 3 рассчитана константа ингибирования K_i , равная 1.0 мкМ. Величина K_i , найденная из зависимостей Лайнуивера–Берка, равна 1.3 мкМ, т.е. средняя величина в пероксидазном окислении пары ТМБ–эскулетин составляет $K_i = 1.15$ мкМ. Таким образом, ингибирующая активность эскулетина в окислении ТМБ в пероксидазной системе в 8.7 раза выше, чем в псевдопероксидазной. Эта разница увеличится при рН 7.4, так как ранее нами показано, что величины K_i сильно снижаются

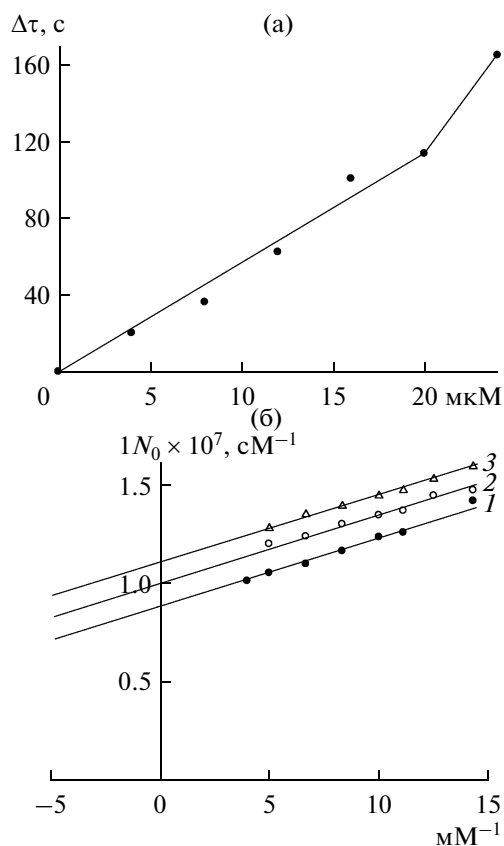


Рис. 4. Ингибирование окисления ТМБ фраксетинем в системе MetHa–H₂O₂. Зависимость продолжительности периода индукции, Δτ, с (а) в накоплении продукта окисления ТМБ (0.25 мМ) от концентрации фраксетина (мкМ) в системе MetHa–H₂O₂, зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации (б) в системе MetHa–H₂O₂: ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H₂O₂; 1–0, 2–12, 3–24 мкМ фраксетина.

с ростом рН при пероксидазном окислении пары ТМБ–кверцетин [20].

Алгоритм изучения пары ТМБ–ингибитор в системе MetHa–H₂O₂, использованный ранее, применен для пары ТМБ–фраксетин, при окислении которой обнаружены периоды индукции на кинетических кривых накопления продукта окисления ТМБ. На рис. 4а показана зависимость продолжительности периода индукции от концентрации фраксетина: по данным этой зависимости вычислены коэффициенты f , равные 1.3 до 8 мкМ и 1.7 от 8 до 24 мкМ ингибитора, т.е. на одной молекуле фраксетина гибнет 1–2 катион-радикала ТМБ^{•+}.

На рис. 4б в двойных обратных координатах представлены кривые зависимости скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации, доказывающие бесконкурентный тип ингибирования. По данным зависимостей в координатах Диксона

(не приводятся) определена константа ингибирования $K_i = 26$ мкМ.

При совместном окислении пары ТМБ-дикумарол в системе MetNa–H₂O₂ в стандартных условиях кинетические кривые накопления продукта окисления ТМБ не обнаружили периода индукции. На рис. 5а показаны зависимости начальной скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации в двойных обратных координатах, доказывающие смешанный тип ингибирования. По данным рис. 5б в координатах Диксона определена величина K_i при окислении пары ТМБ-дикумарол, равная 15 мкМ, т.е. дикумарол – эффективный ингибитор окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

В таблице сопоставлены количественные данные окисления кумарина и его трех оксипроизводных совместно с одним и тем же субстратом ТМБ в строго стандартных условиях. Из таблицы следует, что тип ингибирования зависит от природы биокатализатора и структуры ингибитора. Один и тот же ингибитор эскулетин характеризуется бесконкурентным характером ингибирования окисления ТМБ в системе MetNa–H₂O₂ и конкурентным типом ингибирования в системе ПХ–H₂O₂. Бесконкурентный тип ингибирования означает взаимодействие ингибитора только с фермент-субстратным комплексом MetNa–ТМБ, в то время как конкурентный тип ингибирования в пероксидазной системе означает взаимодействие ТМБ и эскулетина за связывание с активным центром ПХ и конкуренцию за активные формы ПХ – соединения I и II. При окислении пары ТМБ-кумарол в псевдопероксидазной системе смешанный тип ингибирования означает частичную конкуренцию ТМБ и дикумарола за связывание с MetNa и активные радикалы HO• – главные окисляющие агенты в системе MetNa–H₂O₂ [8].

При окислении пар ТМБ-эскулетин и ТМБ-фраксетин в псевдопероксидазной системе четко проявляются периоды индукции в накоплении продукта окисления ТМБ-катион-радикала ТМБ^{•+}, что связано с неферментативной обменной реакцией (3), протекающей слева направо:



Это означает, что акцептирующие радикалы HO-группы эскулетина и фраксетина в условиях эксперимента достаточно реакционноспособны, чтобы восстанавливать катион-радикал ТМБ^{•+} до исходного состояния, в то время как в тех же условиях HO-группы дикумарола неспособны к реакции (3), что подтверждается отсутствием периодов индукции при окислении пары ТМБ-дикумарол в системе MetNa–H₂O₂. Снижение реакционной способности HO-групп дикумарола может быть связано с неароматической природой гетероциклического фрагмента дикумарола.

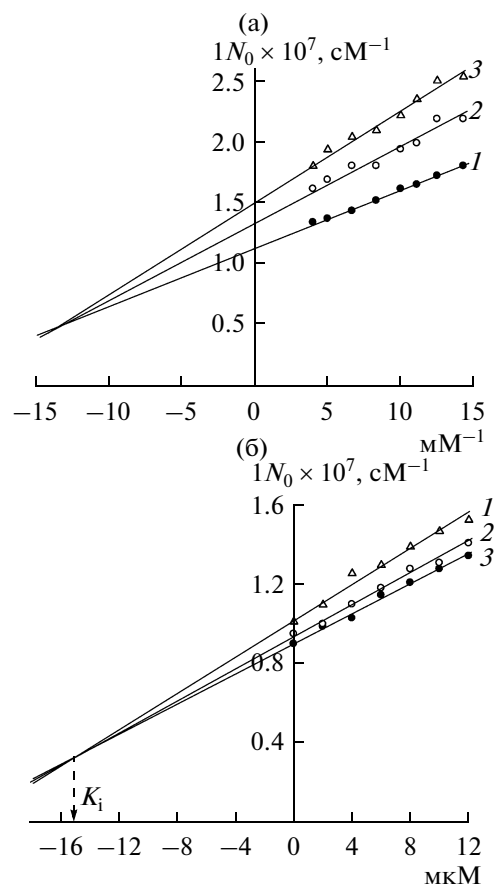


Рис. 5. Ингибирование окисления ТМБ дикумаролом в системе MetNa–H₂O₂. Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации, mM⁻¹ (а) и от концентрации (мкМ) дикумарола (б) в системе MetNa–H₂O₂: 3ФР, pH 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H₂O₂; 1 – 0, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ ТМБ.

Отсутствие периода индукции в образовании продукта окисления ТМБ в системе ПХ–H₂O₂–эскулетин объясняется значением pH 6.4, при котором окислялась пара ТМБ-эскулетин: в этих условиях акцепторы радикалов HO-группы эскулетина протонированы, что сильно снижает их реакционную способность в обменном процессе (3) [20].

Из таблицы следует, что в соответствии с величинами константы ингибирования K_i оксипроизводные кумарина могут быть расположены в ряд по убывающей ингибирующей активности в окислении ТМБ: эскулетин > дикумарол > фраксетин (величины K_i – 9.5; 15 и 26 мкМ соответственно). Отметим, что активность эскулетина в системе ПХ–H₂O₂ еще выше ($K_i = 1.15$ мкМ). Снижение ингибирующей активности у дикумарола может быть связано с “внеароматическим” расположением обеих HO-групп, а у фраксетина – с метилированием одной из активных HO-групп. Наи-

более оптимальной для взаимодействия с радикальными частицами оказалась структура эскулетина с 6,7-ди-окси-группами в сравнении с фраксетином с 7,8-ди-окси-группами, т.е. 8-НО-группа, вероятно, малоактивна в реакциях с радикалами в белок-содержащих биохимических системах.

В системе ПХ–H₂O₂ при pH 6.4 среди многочисленных изученных нами фенольных ингибиторов [8, 9] эскулетин обнаружил рекордную ингибирующую активность ($K_i = 1.15$ мкМ) и превосходит флавоноиды растительного происхождения, самые активные из которых в пероксидазной системе при pH 6.3 кверцетин и морин характеризуются величинами K_i , равными 11.5 и 22.5 мкМ [20]. Таким образом, поиск и характеристика эффективных антиоксидантов растительного происхождения являются необходимыми и должны быть продолжены.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Метелица Д.И.* Активация кислорода ферментными системами. М.: Наука, 1982. 255 с.
2. *Метелица Д.И.* Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. М.: Наука и техника, 1984. 293 с.
3. *Halliwel B., Gutteridge J.M.C.* Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 1999.
4. Free radicals: from Basic Science to Medicine / Eds. G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag, 1993. P. 365–523.
5. Oxygen Radicals and the Diseases Process / Eds. C.E. Thomas, B. Kalyanaraman. Wisconsin: Harwood Acad. Publ., 1998. 296 p.
6. *Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л.* Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
7. *Денисов Е.Т.* Ингибирование цепных реакций. М.: Наука, 1997. 420 с.
8. *Метелица Д.И., Карасева Е.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 537–564.
9. *Метелица Д.И., Пивень Н.В., Шадыро О.И., Григоренко Ю.А., Лухверчик Л.Н., Денисевич Н.П.* // Труды Белорус. гос. ун-та. 2008. Т. 3. Часть 1. С. 7–21.
10. *Потапович М.В., Курченко В.П., Метелица Д.И., Шадыро О.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 386–396.
11. *Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г.* // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 2. С. 137–162.
12. *Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 1. С. 116–124.
13. *Collier G.S., Praut J.M., De Wet C.R., Tschalala C.F.* // Biochem. J. 1979. V. 179. № 2. P. 281–289.
14. *Chmelič I., Kadleček I., Kalons N.* // J. Electroanal. Chem. 1979. V. 99. № 2. P. 245–250.
15. *Русь О.Б., Метелица Д.И.* // Вестні НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 4. С. 75–82.
16. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Л.: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
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. Биотехнология пероксидаз растений и грибов / Ред. А.М. Егоров. М.: ВИНТИ, Итоги науки и техники. Серия-Биотехнология. Том 36. 1992. 171 с.
20. *Григоренко Ю.А., Карасева Е.И., Метелица Д.И.* // Вестник Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь. 2007. № 4. С. 66–83.

Antioxidant Activity of Hydroxy Derivatives of Coumarin

M. V. Potapovich, D. I. Metelitsa, and O. I. Shadyro

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

e-mail: pot-maxim@tut.by

Received September 19, 2011

Abstract—The inhibition efficiency (antioxidant activity) of hydroxy derivatives of coumarin, such as esculetin, dicumarol, and fraxetin, was studied in the methemalbumin–H₂O₂–tetramethylbenzidine (TMB) pseudoperoxidase system at 20°C in a 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) and the inhibition degree (%). The K_i values for esculetin, dicumarol, and fraxetin were 9.5, 15, and 26 μM, respectively. Esculetin and fraxetin inhibited pseudoperoxidase oxidation of TMB in a noncompetitive manner; dicumarol, in a mixed manner. The inhibiting activity of esculetin in peroxidase-catalyzed TMB oxidation at pH 6.4 is characterized by a K_i value equal to 1.15 μM, and the inhibition process is competitive. Esculetin was found to be the most effective antioxidant of plant origin among all derivatives previously studied in model biochemical systems.