



УДК 577.152.1.042 + 577.152.3

ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ АЛКИЛЗАМЕЩЕННЫМИ ДИФЕНОЛАМИ

© 2004 г. И. В. Наумчик*, Е. И. Карасева*, Д. И. Метелица**,
Г. И. Полозов**, О. И. Шадыро**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2, Беларусь;

**Белорусский государственный университет, химический факультет, Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 23.04.2003 г. Принята к печати 08.09.2003 г.

Проведено сравнительное кинетическое исследование ингибирования пероксидазного окисления хромогенных субстратов – 2,2'-азино-бис(3-этил-2,3-дигидробензтиазолин-6-сульфоновой кислоты), *o*-фенилендиамина (PDA) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина – триметилгидрохиноном и шестью *трет*-бутилзамещенными пирокатехинами (InH) при 20°C в 0.015 М фосфатно-цитратном буфере, pH 6.0, содержащем органические соразтворители (0–10% этанола или DMF). В качестве количественных характеристик ингибиторов использованы константа ингибирования K_i , продолжительность периодов индукции в образовании продуктов окисления Δt и стехиометрический коэффициент ингибирования f , означающий число радикалов, гибнущих на одной молекуле InH. В зависимости от природы и структуры пар хромогенный субстрат–дифенол, тип ингибирования может быть конкурентным, неконкурентным, смешанным или бесконкурентным. Для разных пар величины K_i меняются в диапазоне 11–240 мкМ, а величины f – от 0.7 до 2.6. Окисление пар PDA–замещенные пирокатехины отличается отсутствием периодов индукции. По совокупности кинетических параметров и свойств компонентов предложены шесть пар хромогенный субстрат–замещенный дифенол для использования в тест-системах общей антиоксидантной активности биологических жидкостей человека, природных биопрепаратов и продуктов.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, ингибирование; триметилгидрохинон; *трет*-бутилзамещенные пирокатехины; ингибиторы-калибраторы.

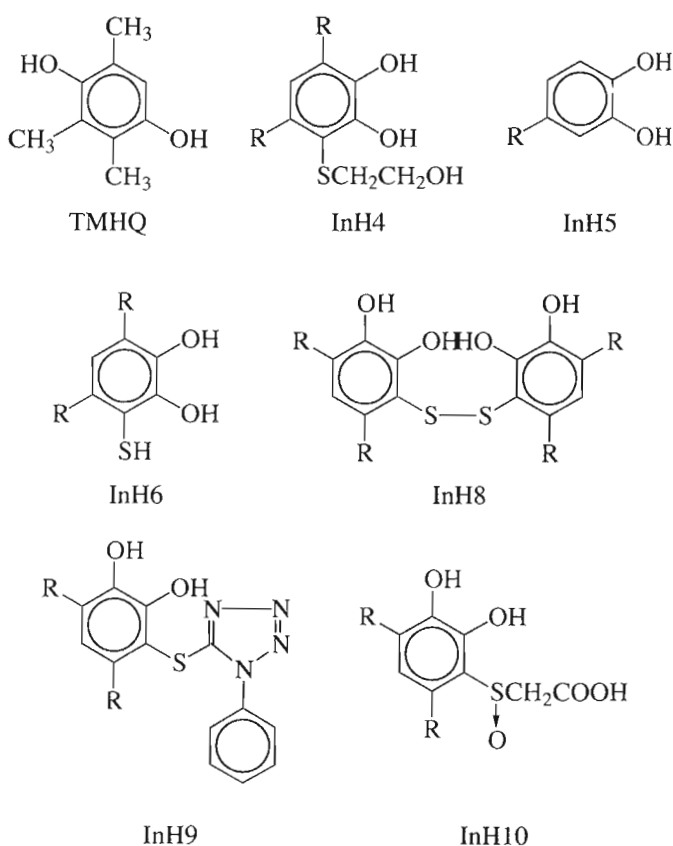
ВВЕДЕНИЕ

Важной проблемой биомедицинской химии и биотехнологии является количественная характеристика общей антиоксидантной активности (ОАА) биологических жидкостей человека и животных и общего антиоксидантного статуса природных биопрепаратов, продуктов питания, соков, вин и напитков. Эта задача решается самыми разнообразными методами, среди которых оценка ОАА с определением отдельных компонентов антиокислительных систем (витамины А, Е, С, глутатионпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутазы и др.) и продуктов перекисного окисления липидов, использование флуоресцентных, хими-

люминесцентных, вольтамперометрических и других методик, обсужденных в большом количестве обзоров и оригинальных статей, в том числе [3–7]. Как правило, большинство способов определения ОАА биологических объектов слишком трудоемки, дорогостоящи и поэтому мало пригодны для массового лабораторного скрининга. На наш взгляд, наиболее перспективны методы интегральной оценки ОАА биологических жидкостей, предложенные фирмой “Randox” (Великобритания) [5] на основе тест-системы “метмиоглобин– H_2O_2 –ABTS–Тролокс”, в которой при каталитическом разложении H_2O_2 метмиоглобин инициирует активные радикалы, окисляющие хромогенный субстрат ABTS, а водорастворимый аналог токоферола Тролокс замедляет этот процесс. Сыворотка крови человека и другие биологические жидкости проявляют антиоксидантную активность и также в разной степени замедляют окисление ABTS, что позволяет выражать их ОАА в виде эквивалентной концентрации ингибитора-калибратора Тролокса (тролоксный эквивалент – количество соединения(й) в молях или микрограммах, равное по

Сокращения: InH – ингибиторы пероксидазного окисления – *трет*-бутилзамещенные пирокатехины, нумерацию соединений см. в наших предыдущих публикациях [1–3]; ПХ – пероксидаза хрена; ABTS – диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этил-2,3-дигидробензтиазолин-6-сульфоновой кислоты); PDA – *o*-фенилендиамин; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ТМНҚ – триметилгидрохинон; Тролокс – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота; ОАА – общая антиоксидантная активность.

Автор для переписки (факс: (375)-(172) 63-7274; эл. почта: metelitz@iboch.bas-net.by).

Структурные формулы замещенных дифенолов (R – *трет*-бутил).

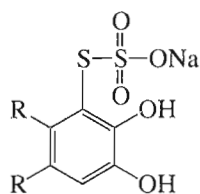
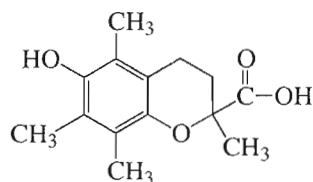
антирадикальной активности 1 моль (мкг) Тролокса) [2–7].

В качестве биокатализаторов кроме метмиоглобина [5, 6] могут быть использованы пероксидазы, микропероксидазы и псевдопероксидазы (метгемальбумины [3] и метгемоглобин [6]). Лучшими хромогенными субстратами являются ABTS, PDA и TMB [8], так как продукты их пероксидного окисления характеризуются полосами поглощения, как правило, не перекрывающимися с поглощением ингибиторов-калибраторов (Тролокса [5, 7] или синтезированного нами ранее (2,3-дигидрокси-4,6-ди-*трет*-бутилфенил)-*S*-тиосульфата натрия, InH1, [3]) и компонентов анализируемой сыворотки крови человека [5–7]. Это обеспечивает корректность спектрофотометрического мониторинга продуктов окисления ABTS, TMB или PDA.

В большой степени надежность и качество ОАА-тест-систем зависит от соответствия антирадикальной активности биологических объектов и ингибирующей способности калибратора [3, 6, 7]. По этой причине совершенно необходимо изучение характера пероксидазного окисления пар амин (субстрат)–фенол (ингибитор), который зависит от природы биокатализатора, аминной и фенольной компонент и условий проведения про-

цесса. Вполне понятны попытки связать характер окисления и его количественные параметры с физико-химическими свойствами аминов и фенолов: показано [9], что при окислении аминов бензидинового ряда в присутствии замещенных фенолов при участии пероксидазы арахиса использованные фенолы можно разделить по их окислительно-восстановительному потенциалу на ингибиторы и вторые субстраты, хотя и те и другие замедляют окисление TMB и *o*-дианизидина. Изучены корреляции кинетических характеристик реакций многочисленных аналогов токоферолов с электрохимическими потенциалами их окисления [10]. Однако взаимодействие аминов и фенолов с биокатализатором (пероксидаза, метмиоглобин, метгемальбумины и др.), как правило, существенно меняет их физико-химические параметры. Поэтому обоснованный выбор пар амин–фенол, подходящих для тест-систем определения ОАА, может быть реализован только экспериментально при кинетическом изучении их сопряженного ферментативного окисления.

Особенно важно при сопряженном окислении пар амин–фенол использовать строгие количественные параметры процесса – константу ингибирования K_i для каждого из фенолов, продолжительность периодов индукции Δt в накоплении продуктов окисления аминов и стехиометричес-

InH1 – (2,3-дигидрокси-4,6-ди-*трет*-бутилфенил)-*S*-тиосульфат натрия.

Тролокс – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота

кий коэффициент ингибирования f , определяющий число радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле фенола (ингибитора).

Ранее нами показано, что пероксидазное окисление ТМВ с разной эффективностью ингибируют галловая кислота [11] и ее полидисульфид [12, 13], 2-аминонитрофенол и его полидисульфид [14, 15], 4,4'-дигидроксибензилсульфон и его полидисульфид [15], 1-амино-2-нафтол-4-сульфоукснота и ее полидисульфид [16], поли(дисульфид резорцина) [17] и поли(3-аминодисульфидфенол) [18]. Пероксидазное окисление PDA ингибируют поли(дисульфид галловой кислоты) [12] и поли(1-аминодисульфид-2-нафтол-4-сульфоукснота) [16]. В большинстве случаев перечисленные фенольные ингибиторы в пероксидажном окислении ТМВ обнаружили конкурентный характер действия и реже – смешанный тип ингибирования. Самыми эффективными ингибиторами оказались поли(дисульфид резорцина) (K_i 0.78 мкМ, f 76) [17] и поли(дисульфид галловой кислоты) (K_i 1.33 мкМ, f 36) [12, 13], которые могут быть использованы как стоп-реагенты для полной остановки пероксидажного окисления ТМВ.

Практика определения ОАА биологических жидкостей человека, однако, показала, что для успешного решения задачи необходимы ингибиторы-калибраторы умеренной эффективности ($K_i \approx 10^{-5}$ – 10^{-4} М), сравнимые по своей антирадикальной активности с Тролоксом [5–7] или InH1 [3].

Цель данной работы – сравнительное кинетическое изучение характера и параметров ингибированного пероксидажного окисления трех хромогенных субстратов – АВТС, PDA и ТМВ в присутствии алкилзамещенных дифенолов (структура соединений приведена на схеме) для выбора оптимальных ингибиторов-калибраторов в тест-системах определения ОАА биологических жидкостей человека и животных и оценки антиоксидантного статуса природных биопрепаратов, продуктов пи-

тания, соков, вин и напитков. Выбор дифенолов как потенциальных ингибиторов определялся следующими соображениями: ТМНҚ взят как аналог водорастворимого производного токоферола – Тролокса, а алкилзамещенные пирокатехины InH4–InH6 и InH8–InH10 представляют собой структурные аналоги InH1, успешно использованного нами ранее при определении ОАА сывороток крови человека [3]. Особый интерес представлял InH6, содержащий три радикалацептирующие группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика ингибирования пероксидажного окисления АВТС

Кинетические кривые образования продукта окисления АВТС в терминах его оптического поглощения (A_{414}) в присутствии возрастающих концентраций ТМНҚ показаны на рис. 1а: четко выражены периоды индукции в накоплении продукта окисления Δt , продолжительность которых пропорциональна концентрации ТМНҚ в диапазоне 10–200 мкМ (рис. 1б) в полном соответствии с теорией метода ингибиторов, разработанной Н.М. Эмануэлем и сотр. [19]. Вычисленная по данным рис. 1б величина коэффициента ингибирования f составляет 0.7. Это означает, что с одной молекулой ТМНҚ в условиях эксперимента реагирует не более одной радикальной частицы. Зависимости начальной скорости окисления АВТС от его концентрации в двойных обратных координатах (рис. 2а) свидетельствуют о смешанном типе ингибирования пероксидажного окисления АВТС в присутствии ТМНҚ. Построение полученных данных в координатах Диксона (рис. 2б), согласно работе [20], позволило определить константу ингибирования K_i , которая по своей величине (78 мкМ) попадает в интервал значений, тре-

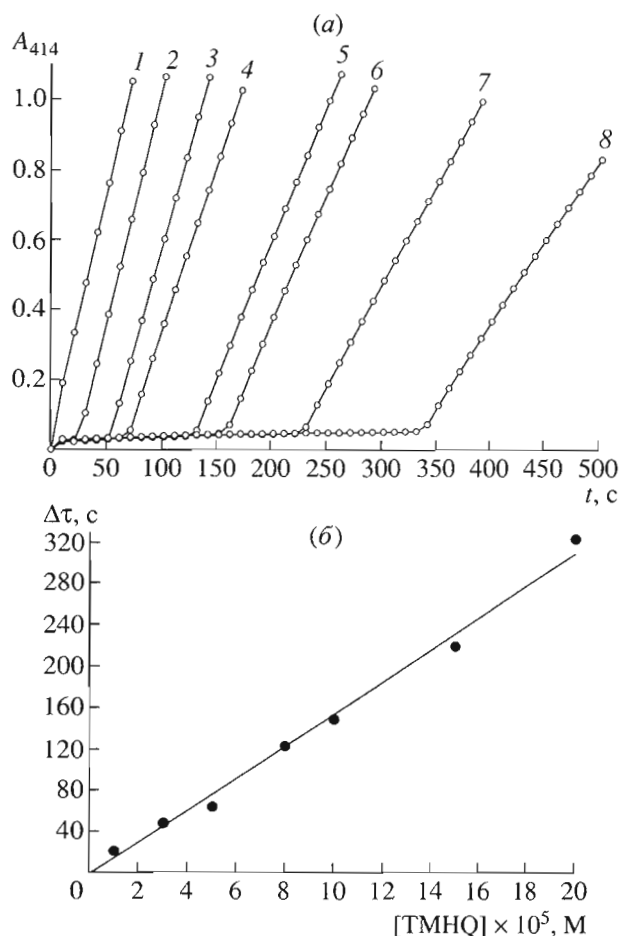


Рис. 1. Кинетические кривые роста оптического поглощения продукта окисления 5 мМ АВТS в отсутствие (1) и в присутствии 10 (2), 30 (3), 50 (4), 80 (5), 100 (6), 150 (7) и 200 мкМ ТМНQ (8) (а) и зависимость периода индукции Δt от начальной концентрации ТМНQ (б).

буемый для типичных ингибиторов-калибраторов ОАА (10^{-5} – 10^{-4} М [3–7]).

Аналогичные экспериментальные схемы применяли при изучении окисления АВТS в присутствии других дифенолов. Во всех случаях кинетические кривые накопления продукта реакции демонстрируют наличие периодов индукции, пропорциональных $[\text{InH}]_0$ (данные не приведены, рассчитанные величины f представлены в таблице). Однако характер ингибирования зависит от природы дифенола. Так, для пары АВТS–InH8, как и для пары АВТS–ТМНQ, ингибирование носит смешанный характер (K_i 32 мкМ попадает в диапазон оптимальных значений для ингибиторов-калибраторов). Зависимости v_0 от $[\text{ABTS}]_0$ в двойных обратных координатах при окислении пары АВТS–InH6 (рис. 3) характерны для неконкурентного типа ингибирования. В то же время для пар АВТS–InH9 и АВТS–InH10 в условиях эксперимента ингибирование пероксидазного окисления АВТS не наблю-

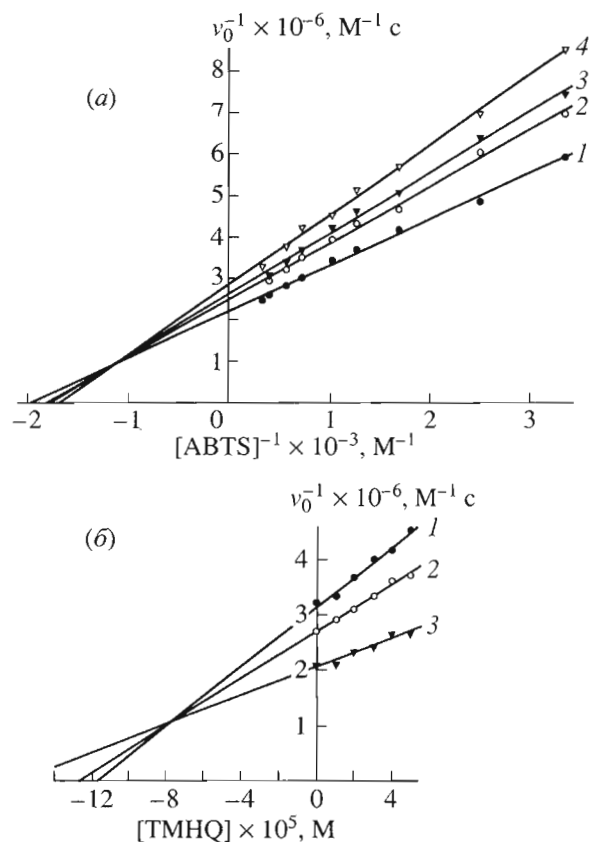


Рис. 2. Зависимости обратной начальной скорости пероксидазного окисления АВТS (а) от обратной концентрации субстрата в присутствии 0 (1), 9 (2), 18 (3) и 30 мкМ ТМНQ (4) и (б) от концентрации ТМНQ в присутствии 1 (1), 1.5 (2) и 3 мМ АВТS (3).

дается, т.е. фермент не меняет своей каталитической активности, несмотря на очевидное расходование ингибитора.

Полученные кинетические параметры и характер ингибирования АВТS для разных дифенолов сопоставлены в таблице.

Кинетика ингибирования пероксидазного окисления PDA

На рис. 4а в двойных обратных координатах представлены зависимости v_0 от $[\text{PDA}]_0$ в присутствии ТМНQ в разных концентрациях (5% DMF). Из рисунка следует, что ТМНQ конкурентным образом ингибирует окисление PDA, связываясь по двум сайтам активного центра ПХ. Два сайта связывания ТМНQ подтверждает и рис. 4б: излом прямой в координатах Диксона приходится на концентрацию ТМНQ 0.3 мМ. Продолжительность периода индукции Δt на кинетических кривых накопления продукта реакции нелинейно зависит от $[\text{TMHQ}]_0$ (рис. 4в) и резко возрастает при концентрации ингибитора 0.3 мМ, соответствующей излому на зависимости Диксона (рис. 4б).

Параметры ингибирования пероксидазного окисления хромогенных субстратов алкилзамещенными дифенолами

InH	Органический соразтворитель	Характер ингибирования*	K_i , мкМ	Наличие Δt	f
ABTS					
TMHQ	–	с	78	+	0.7
InH6	этанол, 5%	нк	118	+	1.3
InH8	этанол, 10%	с	32	+	1.4
InH9	этанол, 10%	–	–	+	0.8
InH10	этанол, 5%	–	–	+	1.1
PDA					
TMHQ	–	к	40	+	–(**)
TMHQ	DMF, 5%	к	53	+	–(**)
InH5	–	к	200	–	–
InH6	этанол, 5%	к	11	–	–
InH9	этанол, 10%	–	–	–	–
InH10	этанол, 5%	–	–	–	–
TMB					
TMHQ	–	к	63	+	1.3–2.6
InH4	DMF, 10% (***)	нк	240	+	1.4–1.8
InH6	этанол, 5%	нк	16	+	1.4
InH8	этанол, 5%	с	20	+	1.6
InH9	этанол, 10%	бк	53	+	1.0
InH10	этанол, 5%	–	–	+	1.3

* к – конкурентный, нк – неконкурентный, с – смешанный, бк – бесконкурентный, прочерк – отсутствие ингибирования.

** Величина f зависит от концентрации TMHQ, см. рис. 4в.

*** Реакция проведена при pH 5.0.

Подобный характер зависимости не позволяет определить коэффициент f , который сильно возрастает с увеличением $[TMHQ]_0$. Величина K_i (53 мкМ) зависит от присутствия органического соразтворителя и в отсутствие DMF снижается до 40 мкМ.

Ингибирующее влияние InH5 и InH6 на пероксидазное окисление PDA (данные не приведены) также имеет конкурентный характер (K_i 200 и 11 мкМ для InH5 и InH6 соответственно). Как и в случае с TMHQ, изломы на зависимостях в координатах Диксона свидетельствуют о наличии двух сайтов связывания InH с активным центром ПХ. В то же время периоды индукции на кинетических кривых накопления продукта реакции в присутствии этих дифенолов отсутствуют.

InH9 и InH10 в использованных концентрациях не влияют на процесс пероксидазного окисления PDA.

Полученные кинетические параметры и характер ингибирования пероксидазного окисления PDA в присутствии разных дифенолов сопоставлены в таблице.

Кинетика ингибирования пероксидазного окисления TMB

Продолжительность периодов индукции при пероксидажном окислении TMB в присутствии

TMHQ связана с концентрацией дифенола линейно, но данная зависимость претерпевает излом при 130 мкМ ингибитора (рис. 5а), что подтверждает наличие двух сайтов связывания TMHQ с ПХ (величина коэффициента f составляет 1.3 до излома и 2.6 после него, т.е. при определенных концентрациях TMHQ одна молекула ингибитора реагирует с 1–2 или 2–3 радикальными частицами). Конкурентный тип ингибирования (K_i 63 мкМ при $[TMHQ]$ 10–60 мкМ) иллюстрирует рис. 5б.

Наличие двух сайтов связывания ингибитора с ПХ было обнаружено и при окислении пары TMB–InH4: зависимость продолжительности периода индукции от $[InH4]$ также претерпевает излом (коэффициенты f равны 1.4 до излома прямой и 1.8 выше излома). В то же время ингибирование пероксидазного окисления TMB в присутствии InH4 носит неконкурентный характер (K_i 240 мкМ).

Присутствие в реакционной смеси InH6, InH8, InH9 и InH10 при пероксидажном окислении TMB приводит к появлению периодов индукции на кинетических кривых накопления продукта реакции. Однако зависимости Δt от начальной концентрации данных дифенолов $[InH]_0$ линейны и изломов не обнаруживают (т.е. в использованных диапазонах концентраций эти соединения связываются только с одним сайтом активного центра ПХ).

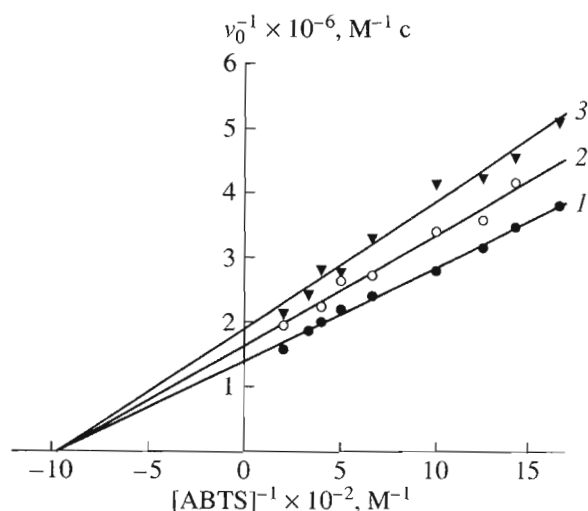


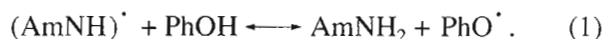
Рис. 3. Зависимости начальной скорости окисления ABTS от его концентрации в двойных обратных координатах в присутствии 0 (1), 15 (2) и 35 мкМ InH6 (3).

При этом характер ингибирования различен – неконкурентный для InH6, смешанный для InH8 и бесконкурентный для InH9, а InH10 практически не ингибирует процесс пероксидазного окисления TMB. Полученные кинетические параметры и характер ингибирования пероксидазного окисления TMB в присутствии разных дифенолов сопоставлены в таблице.

Сравнительный анализ ингибирующего действия InH на пероксидазное окисление хромогенных субстратов

Схемы и механизмы совместного пероксидазного окисления аминов (AmNH_2) и фенолов (PhOH) многократно обсуждены в наших преды-

дущих работах [11–18]: этот сложный процесс представляет собой совокупность ферментативных и неферментативных последовательно-параллельных реакций и его направление существенно определяется неферментативной обменной реакцией аминильных и феноксильных радикалов, открытой Н.М. Эмануэлем и сотр. [21, 22]:



Если реакция (1) идет слева направо, то наблюдается регенерация амина и ускоренное расходование фенола, что проявляется в виде периода индукции при образовании продуктов окисления амина (субстрата).

Как следует из таблицы, наличие периода индукции характерно для окисления ABTS и TMB в присутствии всех использованных дифенолов. При пероксидажном же окислении пар PDA–дифенол период индукции наблюдается только в присутствии TMBHQ и отсутствует при окислении пар PDA–замещенные пирокатехины. Полученные нами данные означают, что при окислении ABTS и TMB со всеми использованными дифенолами реакция (1) идет слева направо, т.е. окисляемый субстрат регенерируется. Это означает, что катион-радикалы $(\text{ABTS})^{\cdot+}$ и $(\text{TMB})^{\cdot+}$ реагируют с дифенолами по реакции (1), проявляя в ней достаточно высокую реакционную способность.

При окислении PDA аминильный радикал $(\text{PDA})^{\cdot}$ вступает в реакцию (1) только с TMBHQ и не реагирует со всеми использованными замещенными пирокатехинами. Таким образом, кинетика и характер процессов пероксидазного окисления пар ABTS–дифенолы и TMB–дифенолы, с одной стороны, и пар PDA–замещенные пирокатехины, с другой стороны, принципиально отличаются, что связано с различной реакционной способностью пер-

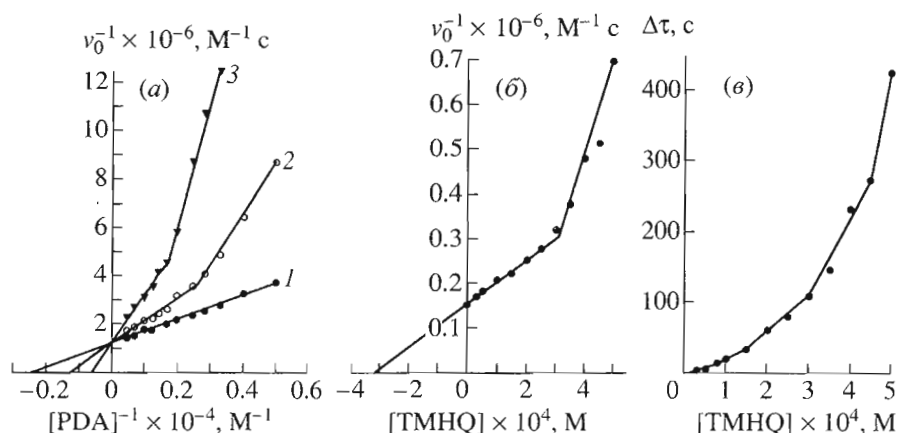


Рис. 4. Зависимости обратной начальной скорости пероксидазного окисления PDA (а) от его обратной начальной концентрации в присутствии 0 (1), 30 (2) и 70 мкМ TMBHQ (3) и (б) от концентрации TMBHQ ([PDA] 2 мМ); (в) – зависимость периода индукции Δt от концентрации TMBHQ. Реакционная смесь содержала 5% DMF.

вичных продуктов окисления (ABTS)^{•+} и (TMB)^{•+} и (PDA)^{•+} в реакциях с замещенными пирокатехинами.

Рассчитанные величины коэффициентов f меняются в пределах 0.7–2.6, что характерно для многих фенольных ингибиторов [23]. Отклонение f от целочисленных величин (1 или 2) объясняется тем, что дифенолы часто связываются с гидрофобным каналом ПХ по двум или более центрам (см. рис. 4 и 5) и поэтому различаются по своей антирадикальной активности. От двух до трех катион-радикалов (TMB)^{•+} гибнет на TMBQ, 1–2 катион-радикала – на InH4 и InH8. Неожиданно, что $f < 2$ для пар ABTS–InH8 и TMB–InH8, так как можно было предполагать, что в реакциях с катион-радикалами могут участвовать все четыре HO-группы полифенола InH8, однако значения f для InH8 мало отличаются от их величин для InH6. Это означает, что в реакциях пероксидазного окисления пар ABTS–InH8 и TMB–InH8 с радикалами, вероятно, реагируют только две из четырех HO-групп ингибитора, в то время как при окислении пар ABTS–InH6 и TMB–InH6 антирадикальную активность могут проявлять две HO- и HS-группа пирокатехина.

Из таблицы следует, что при пероксидажном окислении пар амин–фенол проявляются самые разные типы ингибирования: конкурентный (PDA–TMBQ, PDA–InH5, PDA–InH6, TMB–TMBQ), неконкурентный (ABTS–InH6, TMB–InH4, TMB–InH6), смешанный (ABTS–InH8, ABTS–TMBQ, TMB–InH8) и, наконец, бесконкурентный (TMB–InH9). При конкурентном типе ингибирования субстрат и дифенол конкурируют за сайты связывания с ПХ и в реакциях с активными радикальными формами ПХ – Соединениями I и II; неконкурентный тип ингибирования означает отсутствие конкуренции за связывание с ПХ, но не исключает конкуренции за Соединения I и II пероксидазы; смешанный тип ингибирования означает частичную конкуренцию субстрата и дифенола за связывание с ПХ, конкуренцию за Соединения I и II ПХ и возможную потерю активности ПХ в ходе ферментативного процесса из-за взаимодействия фермента с активными радикалами дифенолов – промежуточными продуктами окисления.

Характер связывания аминов и фенолов с ПХ изучали самыми разными методами. Считается, что амины и фенолы взаимодействуют с различными участками гидрофобного канала ПХ [24] и что к связыванию ароматических соединений причастна аминокислотная последовательность, координирующая дистальную область гема Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val [25]. Предполагается, что субстратная специфичность пероксидаз определяется последовательностью 138–143 (Leu-Pro-

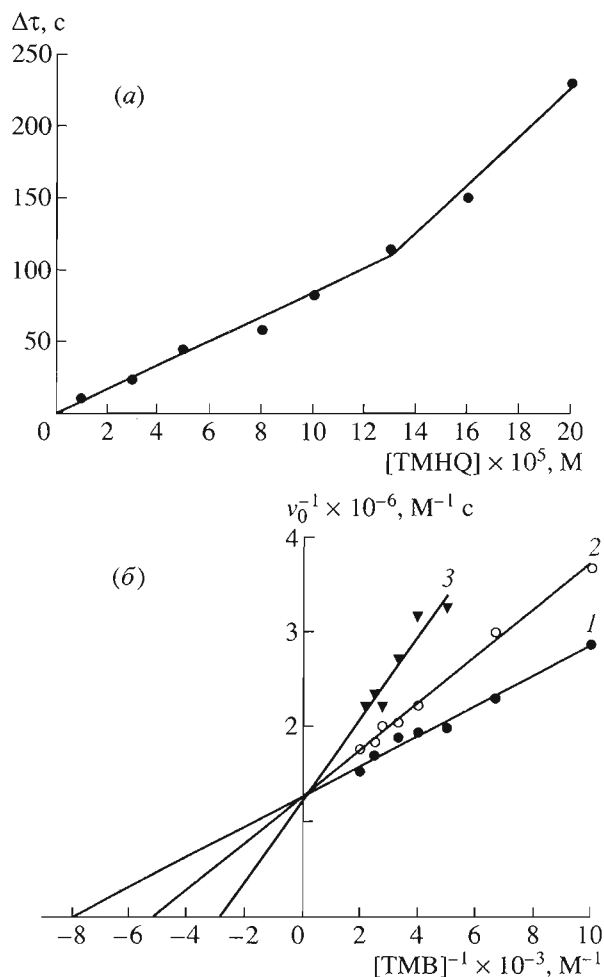


Рис. 5. Зависимость периода индукции Δt при пероксидажном окислении 0.5 мМ TMB от концентрации TMBQ (а) и начальной скорости окисления TMB от его концентрации в двойных обратных координатах в присутствии 0 (1), 20 (2) и 40 мкМ TMBQ (3) (б).

Ala-Pro-Phe-Phe) [26], однако структурные аспекты связывания ароматических соединений с пероксидазами в настоящее время далеки от своего решения. Из таблицы следует, что наиболее эффективным ингибитором пероксидазного окисления PDA и TMB является InH6, хотя характер ингибирования в двух случаях совершенно различен: при окислении пары PDA–InH6 ингибирование конкурентное и нет периодов индукции на кинетических кривых, а при окислении TMB–InH6 ингибирование неконкурентное и есть зависимость периода индукции от концентрации ингибитора. При ингибировании окисления ABTS наиболее эффективен InH8 (K_i 32 мкМ), а InH6 в 4 раза уступает ему по ингибирующей способности (K_i 118 мкМ). Величина K_i отражает уменьшение каталитической активности ПХ вследствие взаимодействия ингибитора и продуктов его окисления с ферментом. Поэтому максимальная антиради-

кальная активность InH6 и InH8 понятна и связана, в первую очередь, с числом радикалацептирующих центров: три у InH6 и потенциально четыре – у InH8. Однако из таблицы следует, что не только число групп, активных в реакциях с радикалами, определяет эффективность ингибиторов.

Из таблицы следует, что для решения практических задач выбора подходящих ингибиторов-калибраторов для определения ОАА биологических жидкостей лучше всего использовать пары PDA с InH5 и InH6, так как окисление PDA не обнаруживает периодов индукции, что является очень важным с точки зрения экспрессности и удобства метода, а величины K_i для InH5 и InH6 попадают в ингибирующий диапазон сывороток крови человека [3]. Построение калибровочных зависимостей при определении ОАА биологических жидкостей возможно также по продолжительности Δt : в этом случае перспективно использование пар ABTS–InH8, ABTS–TMHQ и TMB–InH6, TMB–InH8. Недостатком TMHQ как ингибитора-калибратора является его окисляемость на воздухе, что можно устранить таблетированием ингибитора.

Точный, экспрессный и информативный анализ ОАА сывороток крови пациентов с различными патологиями уже успешно реализован в нашей лаборатории с использованием тест-системы метгемальбумин– H_2O_2 –PDA–InH1 [3]. Данная работа открывает перспективу использования шести пар хромогенный субстрат пероксидазы–замещенный дифенол при количественной характеристике ОАА биологических жидкостей человека, природных биопрепаратов, продуктов, напитков и вин. Следует особо выделить пары PDA–InH5 и PDA–InH6, которые удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к субстратам и ингибиторам в тест-системах определения ОАА [3, 7], и гораздо дешевле, чем используемые в тест-системах фирмы “Randox” ABTS и Тролокс. Необходимое присутствие DMF или этанола при окислении ряда пар никак не сказывается на качестве тест-систем и самого анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали пероксидазу хрена марки А с оптическим показателем чистоты RZ 2.4 (НПО “Биолар”, Латвия). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения белка в максимуме полосы Core (403 нм), равный $102000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [27]. В качестве окислителя применяли разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектрофотометрически ($\epsilon_{230} 72.1 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [28]). В качестве восстанавливающих хромогенных субстратов ПХ применяли ABTS в виде диаммониевой соли и водорастворимый TMB · 2 HCl (Sigma, США), TMB (Serva, Германия) и PDA марки “ч.д.а.” Харьковского химико-фармацевтического завода (Украина) после

его очистки возгонкой в вакууме. DMF и этанол перед употреблением перегоняли. Для приготовления буферных растворов применяли соли и оснoвания производства Реахим (Россия).

Спектры ПМР получали на спектрометре “Tesla BS-567A”, 100 МГц, в растворе $CDCl_3$, δ , м.д., внутренний стандарт – гексаметилдисилазан. Масс-спектры записаны при 70 эВ на спектрометре “Schimadzu QP-5000” с прямым вводом образца в ионный источник. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре “Specol-211” (Carl Zeiss, Германия).

Триметилгидрохинон (TMHQ) производства Реахим (Россия) очищен сублимацией в вакууме. Т. пл. 172–174°C. УФ-спектр, H_2O , λ_{max} , нм: 206 и 286 ($\epsilon_{286} 2667 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

3-(2-Гидроксиэтилсульфанил)-4,6-ди-*трет*-бутил-1,2-дигидроксibenзол (InH4) синтезирован по методике [29]. УФ-спектр, этанол, λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$): 213 (32000) и 295 (2783).

4-Трет-бутилпирокатехин (InH5) производства Реахим (Россия) очищен по методике [30]. УФ-спектр, H_2O , λ_{max} , нм: 217 и 279 ($\epsilon_{279} 2696 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-сульфанил-1,2-дигидроксibenзол (InH6) синтезирован по модифицированной методике [31]: к раствору 7.5 г (2,3-дигидрокси-4,6-ди-*трет*-бутилфенил)-5-тиосульфата натрия (In1) [3] в 10 мл воды добавляли 50 мл бензола, 10 г цинковой пыли и при интенсивном перемешивании медленно приливали 25 мл конц. HCl. Перемешивание проводили еще в течение 1 ч, полученный бесцветный раствор фильтровали, а осадок на фильтре промывали бензолом (2×15 мл). Бензольный слой отделяли, промывали насыщенным водным раствором NaCl и сушили $MgSO_4$. После удаления растворителя на ротационном испарителе осадок кристаллизовали из гексана. Получали бесцветные крупные кристаллы InH6 с выходом 76%. Т. пл. 63–64°C. УФ-спектр, этанол, λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$): 219 (23500) и 265 (9400). Спектр ПМР: 6.93 (1 H, с, OH), 6.68 (1 H, с, аром. H), 5.56 (1 H, с, OH), 2.78 (1 H, с, SH), 1.48 (9 H, с, Me_3), 1.38 (9 H, с, Me_3). Масс-спектр (70 эВ, m/z , $I_{\text{отн}}$, %): 254 (M^+ , 27), 239 ($M^+ - CH_3$, 100).

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензилдисульфанил)-1,2-дигидроксibenзол (InH8) синтезирован по методике [32]. УФ-спектр, этанол, λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$): 211 (42500) и 292 (13500).

4,6-Ди-*трет*-бутил-3-(1-фенил-1H-1,2,3,4-тетразол-5-илсульфанил)-1,2-дигидроксibenзол (InH9) синтезирован по модифицированной методике [32]: к раствору 0.89 г (5 ммоль) 2-меркапто-1-фенил-1,2,3,4-тетразола в 20 мл метанола в течение 2 ч при перемешивании по каплям добавляли 30 мл раствора 1.1 г (5 ммоль) 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-бензохинона в метаноле. После 3 ч перемешивания обесцветившийся раствор упаривали на

роторном испарителе, а остаток дважды перекристаллизовывали из смеси гексан–бензол. Выход 1.79 г (90%). Т. пл. 130–132°C. УФ-спектр, этанол, λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 213, 251 (14000) и 297 (3600). Спектр ПМР: 7.60 (5 H, с, аром. H), 7.33 (1 H, с, аром. H), 7.00 (1 H, с, OH), 6.5–6.1 (1 H, уш. с, OH), 1.39 (9 H, с, Me_3), 1.27 (9 H, с, Me_3). Масс-спектр (70 эВ, m/z , $I_{\text{отн}}$, %): 398 (M^+ , 6).

2-(4,6-Ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксибензилсульфинил)уксусная кислота (InH10) синтезирована по модифицированной методике [32]: к раствору 1.0 г (3.2 ммоль) 2-(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидрофенилсульфинил)уксусной кислоты в 10 мл уксусной кислоты при перемешивании добавляли по каплям 3 мл 36% H_2O_2 и оставляли смесь на сутки. После упаривания раствора в вакууме остаток кристаллизовали из смеси эфир–гексан. Выход 0.62 г (59%). Т. пл. 142–143°C. Спектр ПМР: 7.2–7.1 (1 H, уш. с, OH), 6.90 (1 H, с, аром. H), 6.6–5.4 (1 H, уш. с, OH), 4.48 (1 H, г, J 14.6 Гц) и 3.92 (1 H, г, J 14.6 Гц) (диастереотопные протоны CH_2 -группы), 1.41 (9 H, с, Me_3), 1.40 (9 H, с, Me_3). Масс-спектр (70 эВ, m/z , $I_{\text{отн}}$, %): 328 (M^+ , 15).

Кинетические измерения проводили в 0.015 М фосфатно-цитратном буфере (рН 6.0) при 20°C на спектрофотометре “Specol-211” (Carl Zeiss, Германия) с термостатируемым кюветным отделением.

При исследовании пероксидазного окисления хромогенных субстратов реакцию начинали добавлением H_2O_2 (перед добавлением H_2O_2 смесь выдерживали 3 мин при 20°C) и в течение 1–2 мин регистрировали рост поглощения продукта окисления при соответствующей длине волны. Значения v_0 определяли по начальным, строго линейным участкам кинетических кривых. Во всех случаях использованные ингибиторы и продукты их превращения не вносили никакого вклада в полосы поглощения продуктов окисления хромогенных субстратов.

За пероксидазным окислением ABTS в присутствии дифенолов и без них следили на 414 нм (ϵ 31100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [33]). Варьировали концентрацию ABTS (0.8–5 мМ) и дифенолов (0–50 мМ). Концентрация H_2O_2 составляла 0.4 мМ, концентрация ПХ – 4 нМ (для пары ABTS–ТМНҚ 0.2 мМ и 2 нМ соответственно). Реакционная смесь содержала 5% этанола в экспериментах с InH6 и InH10 и 10% этанола в экспериментах с InH8 и InH9.

За пероксидазным окислением PDA в присутствии дифенолов и без них следили на 455 нм (ϵ 16400 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [16]). Варьировали концентрацию PDA (0.1–2 мМ) и дифенолов (0–30 мМ). Концентрация H_2O_2 составляла 2.0 мМ, концентрация ПХ – 1 нМ. Реакционная смесь содержала 5% этанола в экспериментах с InH6 и InH10 и 10% этанола в экспериментах с InH9; эксперименты с ТМНҚ проводили как в чисто водном буфере, так и в присутствии 5% DMF.

За пероксидазным окислением ТМВ в присутствии дифенолов и без них следили на 655 нм (ϵ 39000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [27]). Варьировали концентрацию ТМВ (0.05–1 мМ) и дифенолов (0–2 мМ). Концентрация H_2O_2 составляла 1.0 мМ, концентрация ПХ – 0.2 нМ. Реакционная смесь содержала 5% этанола в экспериментах с InH6, InH8 и InH10; 10% этанола в экспериментах с InH9; 10% DMF в экспериментах с InH4.

Количественная характеристика ингибирования пероксидазного окисления хромогенных субстратов дифенолами. Для определения коэффициента f использовали теорию метода ингибиторов [19] и соотношения (3) и (4):

$$\Delta t = f[\text{InH}]_0/v_i, \quad (3)$$

$$v_0 \approx v_i = f(v_i/f), \quad (4)$$

где Δt – период индукции в накоплении продукта окисления ABTS, PDA или ТМВ, v_i – скорость иницирования радикалов, приблизительно равная начальной скорости окисления хромогенного субстрата в отсутствие ингибитора. Детали метода подробно описаны в наших ранее опубликованных работах [1, 2, 11–18].

Характер ингибирования определяли из зависимостей Лайнуивера-Берка (начальная скорость окисления от концентрации субстрата в двойных обратных координатах) в присутствии возрастающих концентраций дифенола. Константы ингибирования K_i , в зависимости от типа ингибирования, рассчитывали из зависимостей $1/v - [\text{InH}]_0$ согласно [20], $v_0/v - [\text{InH}]_0$ согласно [34] или $s/v_0 - [\text{InH}]_0$ согласно [35], где v_0 и v – скорости реакции без ингибитора и в его присутствии, $[\text{InH}]_0$ – начальная концентрация ингибитора, s – концентрация субстрата.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ) по проекту № В-434.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метелица Д.И., Русь Г.Б., Пучкаев А.В. // Журн. прикл. химии. 1997. Т. 70. С. 1713–1720.
2. Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В., Шадыро О.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 323–333.
3. Русь О.Б., Метелица Д.И. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 4. С. 75–82.
4. Теселкин Д.А., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. // Вопросы мед. химии. 1997. Т. 43. С. 87–93.
5. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.A. // Clin. Sci. 1993. V. 84. P. 407–412.
6. Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышников В.С. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 628–639.
7. Свиридов Д.О., Камышников В.С., Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 2. С. 60–63.
8. SigmaImmuNotes. 1991. № 5. P. 1–11.

9. *Bagirova N.A., Shekhovtsova T.N., van Huystee R.B.* // *Talanta*. 2001. V. 55. P. 1151–1164.
10. *Бурлакова Е.Б., Крайков С.А., Храпова Н.Г.* // *Биол. мембраны*. 1998. Т. 15. С. 137–162.
11. *Карасёва Е.И., Никифорова Т.В., Метелица Д.И.* // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2001. Т. 37. С. 472–479.
12. *Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И.* // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 1255–1263.
13. *Карасёва Е.И., Метелица Д.И.* // *Биохимия*. 1999. Т. 64. С. 68–75.
14. *Карасёва Е.И., Никифорова Т.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И.* // *Биоорганич. химия*. 1999. Т. 25. С. 665–672.
15. *Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И.* // *Биохимия*. 2001. Т. 66. С. 751–761.
16. *Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И.* // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2001. Т. 37. С. 713–721.
17. *Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И.* // *Биоорганич. химия*. 2002. Т. 28. С. 147–155.
18. *Наумчик И.В., Карасёва Е.И., Метелица Д.И., Полозов Г.И., Шадыро О.И.* // *Весті НАН Беларусі. Сер. хім. навук*. 2002. № 3. С. 85–91.
19. *Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л.* *Химическая физика старения и стабилизации полимеров*. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
20. *Келети Т.* *Основы ферментативной кинетики*. Пер. с венг. М.: Мир, 1990. С. 183–203.
21. *Карпущина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М.* // *Докл. АН СССР*. 1963. Т. 152. С. 110–114.
22. *Карпущина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М.* // *Докл. АН СССР*. 1965. Т. 160. С. 158–162.
23. *Денисов Е.Т.* *Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций*. М.: Наука, 1971. С. 106–141.
24. *Ким Б.Б.* *Биотехнология пероксидаз растений и грибов*. *Итоги науки и техники*. Биотехнология. Т. 36. М.: ВИНТИ, 1992. С. 126–146.
25. *Газарян И.Г.* *Биотехнология пероксидаз растений и грибов*. *Итоги науки и техники*. Биотехнология. Т. 36. М.: ВИНТИ, 1992. С. 4–54.
26. *Газарян И.Г., Упоров И.В., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Мареева Е.А., Лагримина Л.М.* // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 708–715.
27. *Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П.* // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1987. Т. 23. С. 116–124.
28. *Справочник химика* / Ред. Никольский Б.П. Ленинград: Химия, 1967. С. 919.
29. *Петрикевич Д.К., Тимошук В.А., Шадыро О.И., Андреева О.Т., Вотяков В.И., Желобкович В.Е.* // *Химико-фарм. журн.* 1995. Т. 29. С. 32–34.
30. *Белостоцкая И.С., Комиссарова Н.Л., Джуарян Э.В., Еришов В.В.* // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1971. № 12. С. 2816–2817.
31. *Wanzlick H.-W.* // *Angew. Chemie*. 1964. V. 76. P. 313–320.
32. *Масловская Л.А., Петрикевич Д.А., Тимошук В.А., Шадыро О.И.* // *Журн. общей химии*. 1996. Т. 66. С. 1899–1902.
33. *Re R., Pellegrini N., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.* // *Free Radicals Biol. And Med.* 1999. V. 26. P. 1231–1237.
34. *Березин И.В., Клесов А.А.* *Практический курс химической и ферментативной кинетики*. М.: Изд-во МГУ, 1976. С. 100–102.
35. *Диксон М., Уэбб Э.* *Ферменты*. Пер. с англ. М.: Мир, 1982. Т. 2. С. 507–508.

Inhibition of the Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Chromogenic Substrates by Alkyl-Substituted Diatomic Phenols

I. V. Naumchik*, E. I. Karasyova*, D. I. Metelitzka**, G. I. Polozov**, and O. I. Shadyro**

*Fax: (375)-(172) 63-7274; e-mail: metelitzka@iboch.bas-net.by

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

**Faculty of Chemistry, Belarussian State University,
ul. Leningradskaya 14, Minsk, 220080 Belarus

A comparative kinetic study of the peroxidase oxidation of three chromogenic substrates—2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazoline-6-sulfonic acid), *o*-phenylenediamine (PDA), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine—inhibited by trimethylhydroquinone and six *tert*-butylated pyrocatechols (InH) was carried out at 20°C in 0.015 M phosphate-citrate buffer (pH 6.0) containing organic cosolvents (0–10% ethanol or DMF). The inhibitors were quantitatively characterized by the inhibition constants (K_i), the duration of the lag period in the oxidation product formation ($\Delta\tau$), and the stoichiometric coefficient of inhibition that specifies the number of radicals terminated by one InH molecule (f). The inhibition could be competitive, noncompetitive, mixed, or uncompetitive, which depended on the nature and structure of the chromogenic substrate–diatomic phenol pair. Various substrate–diatomic phenol pairs exhibited K_i values within the range of 11–240 μ M and f values from 0.7 to 2.6. The absence of a lag period was characteristic of oxidation of the substituted *o*-phenylenediamine–substituted pyrocatechol. The total kinetic parameters and properties of the components allowed us to suggest six chromogenic substrate–substituted diatomic phenol pairs for use in test systems for the determination of antioxidant activity in human body fluids, natural biological preparations, and food. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: horseradish peroxidase, inhibition; inhibitor calibrators; *tert*-butyl-substituted pyrocatechols; trimethylhydroquinone