

## **ВЭЖХ-АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ ПСЕВДОПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЛАВОНОЛОВ МЕТГЕМОГЛОБИНОМ**

**Е.В. Бондарюк, В.В. Сенчук**

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Флавонолы – природные биологически активные полигидроксипроизводные 2-(фенил)-хромен-4-она [1]. Ряд флавонолов относится к незаменимым пищевым факторам для человека, проявляя антиоксидантную, антирадикальную, противоопухолевую, ангиопротекторную и другие виды активности [2-6]. В этом отношении особый интерес представляют наиболее распространенные в растениях флавонолы – кверцетин, рутин (3'-рутинозид кверцетина), физетин (5'-дезоксикверцетин) и морин (структурный изомер кверцетина по кольцу В). Флавонолы растительной пищи эффективно всасываются в пищеварительном тракте и поступают в системный кровоток, распространяясь по органам и тканям человека и животных [5, 7]. В распространении и распределении флавонолов важную роль играет система сывороточный альбумин / красные клетки крови [5]. Как относительно гидрофобные вещества, флавонолы легко проникают через липидный бислой мембран эритроцитов и могут вступать во взаимодействие с гемоглобином, который, как известно, является эффективным окислителем целого ряда соединений, включая и вещества фенольной природы [8, 9]. Нами показано, что в присутствии  $H_2O_2$  гемоглобин окисляет ряд флавонолов (кверцетин, физетин, морин, рутин). Сравнительно давно установлена способность пероксидаз окислять флавонолы [10-13]. Однако до сих пор остаются невыясненными сходства и отличия биохимических процессов окисления флавонолов пероксидом водорода, катализируемых истинными пероксидазами и псевдопероксидазами. Продолжая работу в этом направлении, целью данного исследования было установление возможных путей псевдопероксидазного окисления ряда наиболее распространенных в растениях и в пище человека флавонолов путем HPLC-анализа образующихся продуктов.

### **Материалы и методы исследования**

В исследовании были использованы лиофилизированный метгемоглобин лошади фирмы «Реанал» (Венгрия); флавонолы кверцетин, физетин, морин, рутин производства фирмы «Sigma» (США). Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Cary 50 (Австралия).

Реакцию псевдопероксидазного окисления флавонолов метгемоглобином проводили в 0,05 М натрий-фосфатном буфере (PBS), pH 7,4. Реакционная среда

содержала: метгемоглобин – 5 мкМ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 500 мкМ, флавонолы (кверцетин, физетин, морин, рутин) – 50 мкМ. Ход реакции контролировали спектрофотометрически. Реакцию останавливали добавлением к 1 мл реакционной смеси 0,25 мл 1Н НСl. Субстраты реакции и образовавшиеся продукты экстрагировали равным объемом охлажденного этилацетата. Для приготовления образцов для проведения ВЭЖХ этилацетатные экстракты выпаривали в роторном испарителе при низком давлении, затем растворяли в 60 мкл метанола, на колонку наносили 20 мкл.

HPLC-анализ исходных субстратов и продуктов псевдопероксидазного окисления флавонолов проводили в хроматографе «Shimadzu LCMS-QP8000a» на колонке Allure C-18 (150 × 4,6 мм; 5 мкм, размер пор 60 ангстрем) фирмы «Restec» (США). Использовался вариант ВЭЖХ с обращенной фазой (оф-ВЭЖХ). Использовались следующие условия хроматографирования: скорость 0,75 мл/мин, 40°; колонка уравновешена с ацетонитрилом, содержащим 0,1% уксусной кислоты; 0-5 мин – 20% ацетонитрил, 5-15 мин – 20-100% линейный градиент ацетонитрила, 15-18 мин – 100% ацетонитрил, 18-30 мин – 20% ацетонитрил. Спектры полученных хроматографических пиков были записаны в диапазоне 220-500 нм.

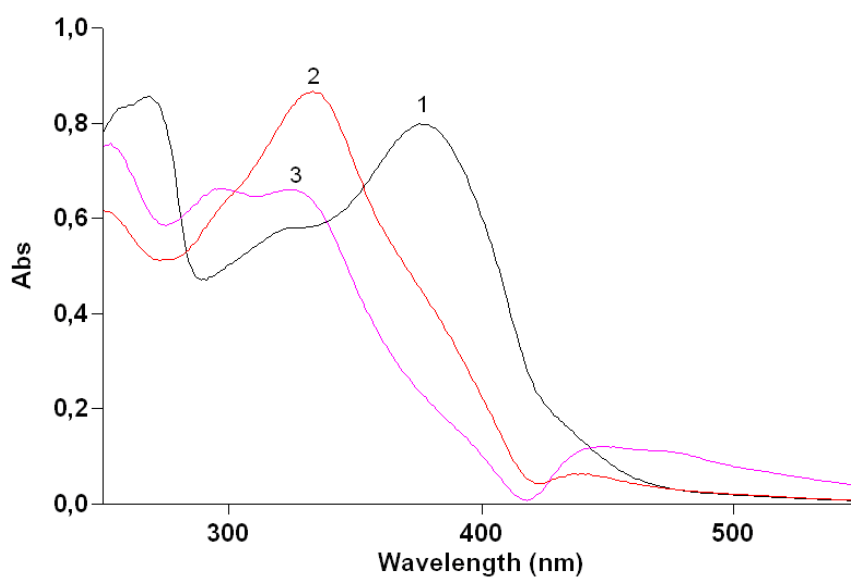
### **Результаты и их обсуждение**

На рисунке 1 представлены UV-Vis-спектры поглощения реакционной среды, иллюстрирующие расходование субстрата и образование продуктов в реакции псевдопероксидазного окисления флавонолов при участии метгемоглобина.

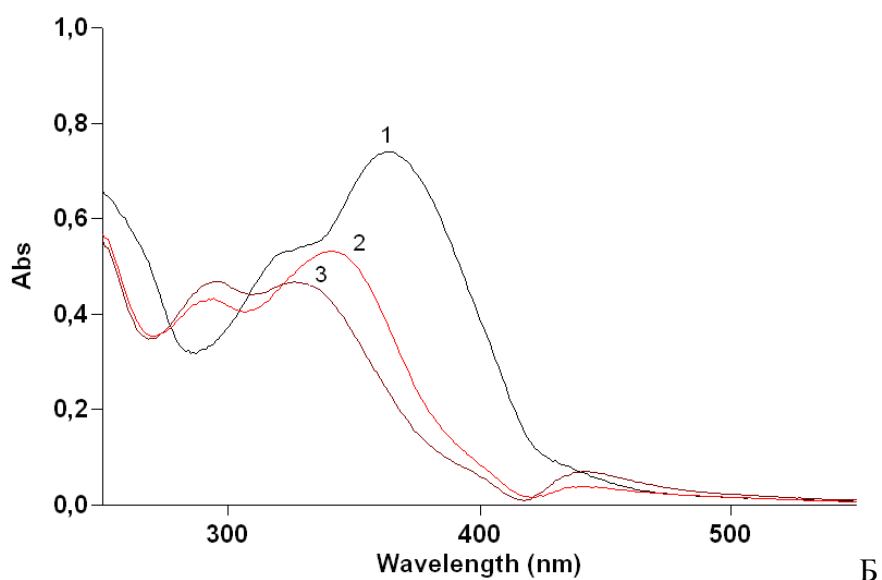
Инкубация кверцетина в среде, содержащей метгемоглобин (mHb) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к типичным изменениям в спектре поглощения (Рисунок 1, А). Наблюдается исчезновение полос 1 и 2 с максимумами поглощения при 375 и 267 нм соответственно и появлением нового максимума при 333 нм (полоса 3), интенсивность которого сначала возрастает, а затем при дальнейшем окислении уменьшается. В ходе реакции наблюдалось появление двух изобестических точек при 283 и 351 нм на первой фазе, когда имело место накопление первичного продукта, содержащего хромофор при 333 нм. В ходе дальнейшей инкубации наблюдали образование двух новых изобестических точек в области 300 и 400 нм (не показаны). Одновременно происходит уменьшение максимума при 333 нм и увеличение максимума при 253 нм. В красной области спектра наблюдается образование двух новых максимумов низкой интенсивности в области 444 и 473 нм.

При окислении морина, как и в случае с кверцетином, имеет место исчезновение полос 1 и 2 при 392 и 269 нм соответственно и возникновение полосы 3 при 330 нм (Рисунок 1, В). Присутствуют четко выраженные изобестические точки при 283, 358 и 455 нм (не показано). Как и в предыдущем случае, в ходе дальнейшей реакции интенсивность

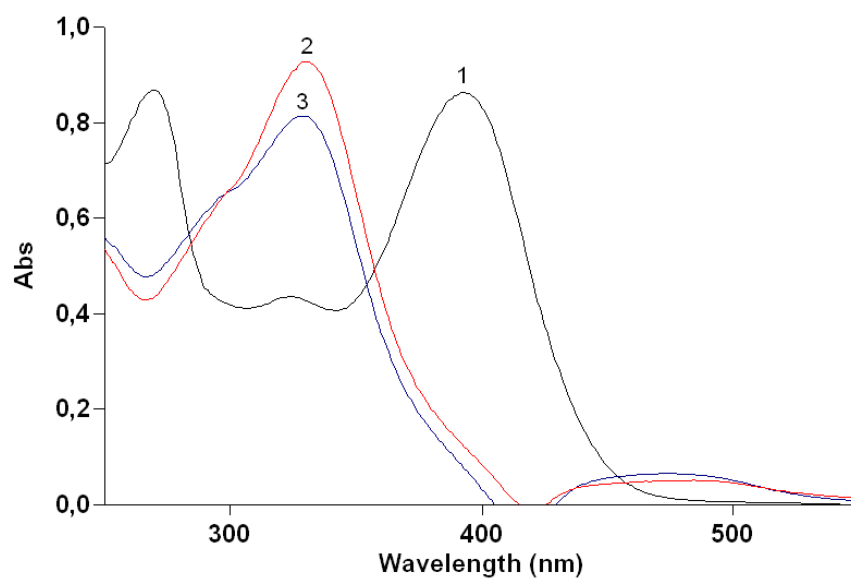
полосы 3 постепенно уменьшается и увеличивается интенсивность поглощения в красной области спектра в районе 475 нм.



А



Б



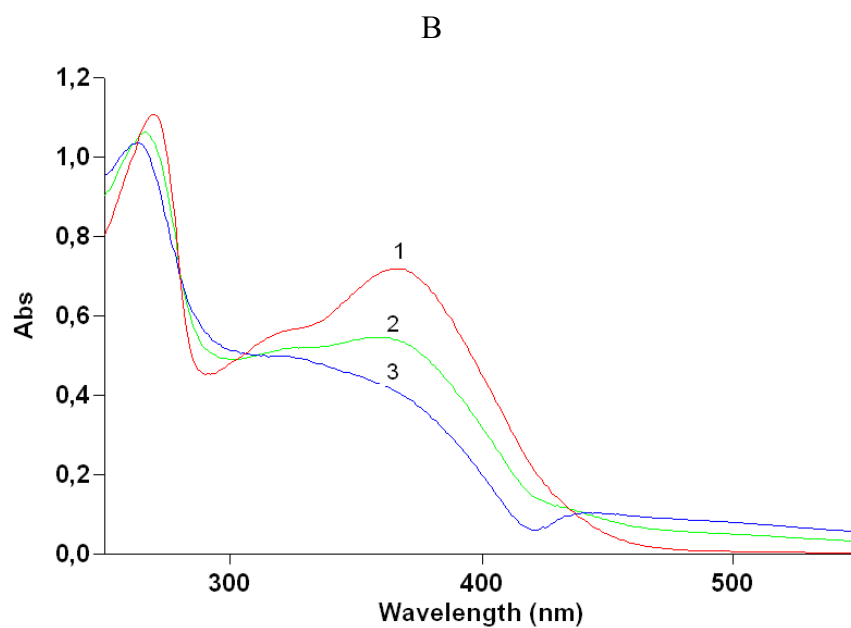


Рисунок 1 - UV-Vis-спектры поглощения реакционной среды в процессе псевдопероксидазного окисления флавонолов катализируемого метгемоглобином. А – кверцетин, Б – физетин, В – морин, Г – рутин. 1 – спектры исходных продуктов, 2 – промежуточные продукты, 3 – после 15 минут окисления

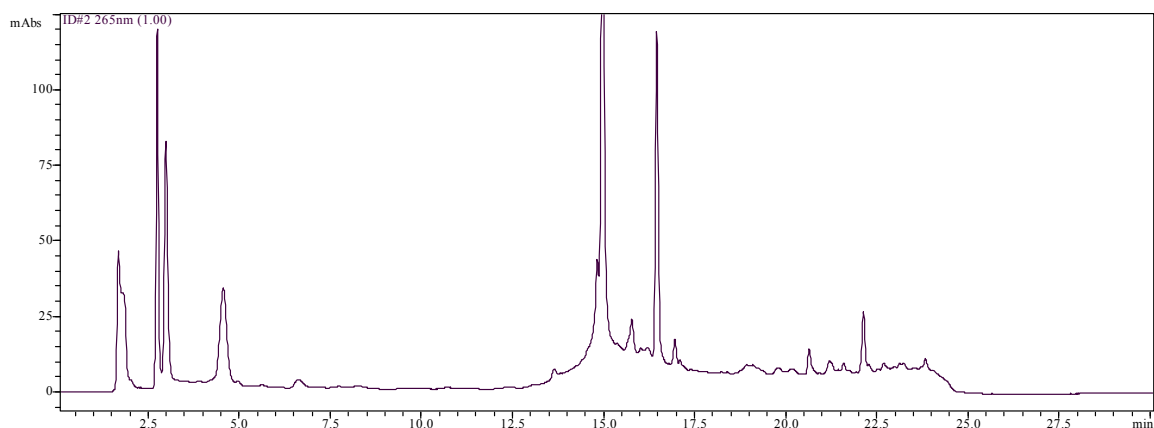
В случае псевдопероксидазного окисления физетина происходит одновременное уменьшение максимума полосы 1 и смещение в коротковолновую область (Рисунок 1, Б). Образуется двойной максимум при 294 и 327 нм, а также максимум в красной области спектра при 442 нм.

Окисление рутина сопровождается характерным уменьшением максимума полосы 1 и 2 при 366 и 269 нм соответственно, однако формирования полосы 3 не происходит (Рисунок 1, Г). Наблюдается смещение полосы 2 в коротковолновую сторону с 269 до 263 нм, а также увеличение интенсивности поглощения в красной области (450-550 нм). Наблюдаемые изобестические точки: 280, 305 и 437 нм.

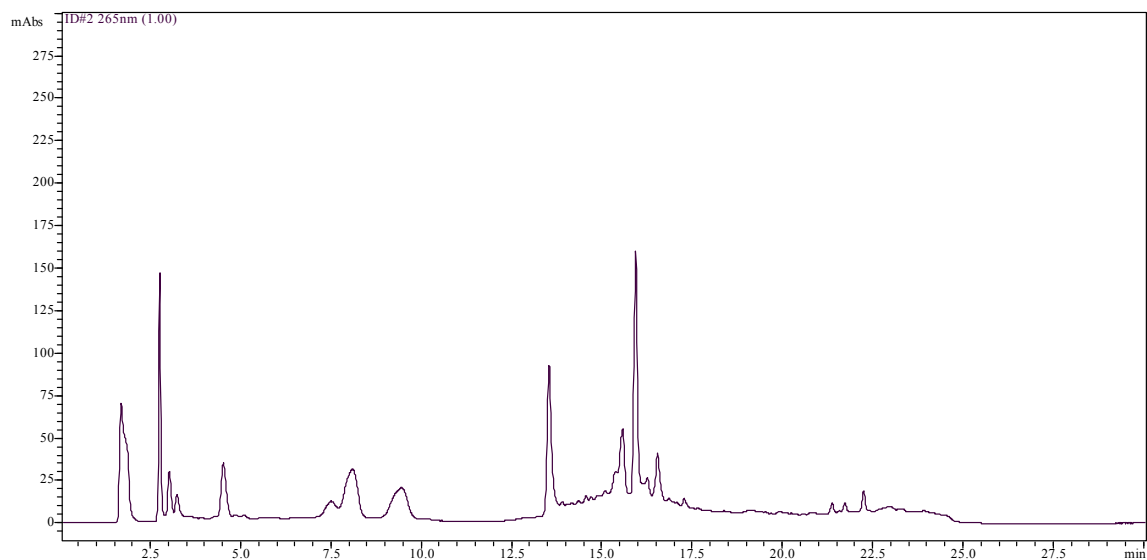
Реакцию псевдопероксидазного окисления флавонолов гемоглобином останавливали, руководствуясь спектрофотметрическими данными в момент наибольшего накопления промежуточного продукта с максимальной интенсивностью поглощения в области полосы 3, а также после образования конечных продуктов, спектр которых не претерпевал дальнейших изменений. Время инкубации реакционной смеси составило: 2,5 и 15 минут для кверцетина, 2,5 и 10 минут для физетина, 5,5 и 15 минут для морина, 5 и 15 минут для рутина.

**HPLC-анализ продуктов окисления кверцетина.** На рисунке 2 представлены оф-ВЭЖХ-хроматограммы продуктов псевдопероксидазного окисления флавонолов катализируемого метгемоглобином. Пик со временем удержания 15,08 мин на Рисунок 2А

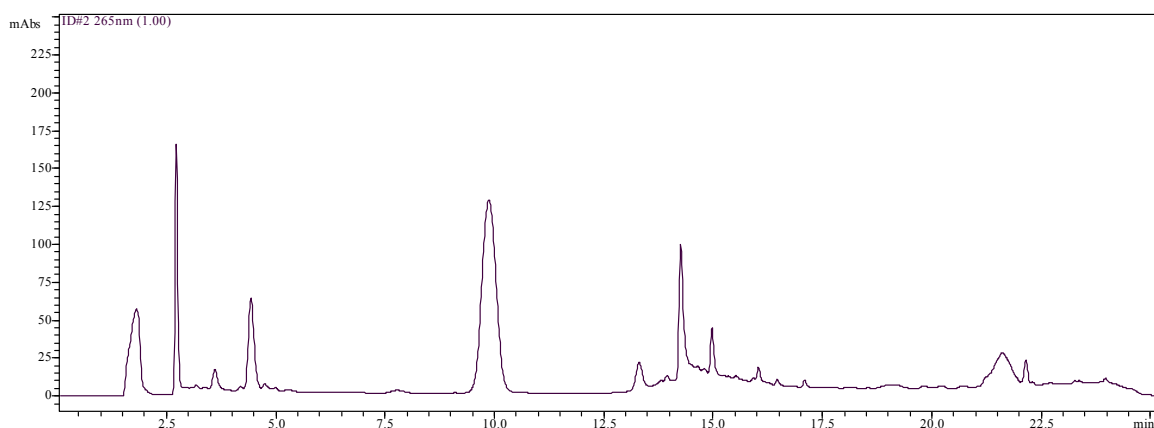
соответствует исходному веществу – кверцетину и имеет характерные максимумы поглощения при 255 и 370 нм (не показано). Соответствующий пик кверцетина на хроматограмме для времени инкубации 2,5 мин имеет вчетверо более низкую интенсивность. Наблюдается возникновение ряда новых пиков со временем удерживания 1,68, 2,72, 4,56, 14,83 (максимум поглощения около 292 нм, Рисунок 3-2); 3,01 (максимумы поглощения 258, 293 нм, Рисунок 3-1); 16,47 (269, 302, 363 нм, Рисунок 3-3). Через 15 минут инкубации пик кверцетина, а также пик 3,01 практически исчезает. Интенсивность пиков 1,68 и 16,47 увеличивается, а пиков 2,72, 4,56 и 14,83 – уменьшается.



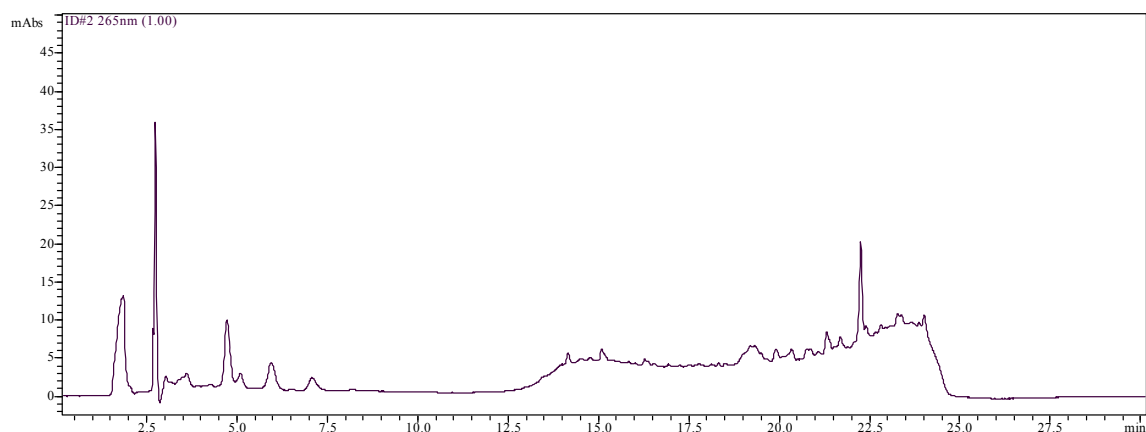
А



Б



В



Г

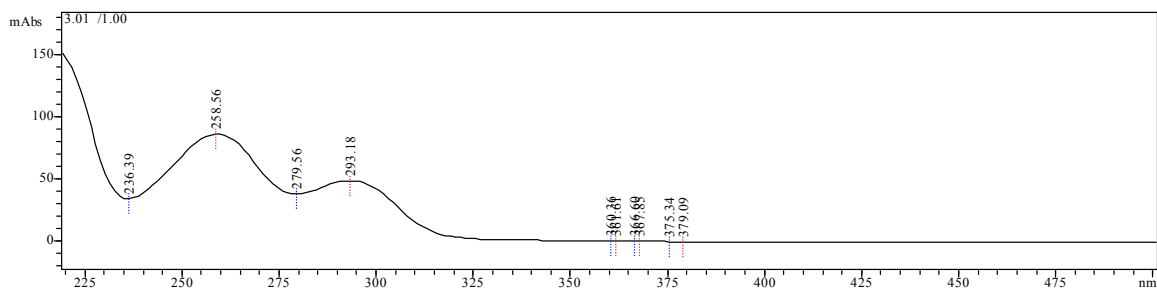
Рисунок 2 - HPLC-хроматограммы продуктов псевдопероксидазного окисления флавонолов метгемоглобином. А – кверцетин (2,5 мин инкубации), Б – физетин (2,5 мин инкубации), В – морин (5,5 мин инкубации), Г – рутин (5 мин инкубации).

**HPLC-анализ продуктов окисления физетина.** Пик со временем удержания 13,41 мин (Рисунок 2, Б) соответствует физетину. По сравнению с контрольным образцом (не показано), после инкубации физетина с метгемоглобином на хроматограмме появляется множество новых пиков, часть из которых со временем удержания 8,1, 15,61, 15,95 и 16,59 исчезает при дальнейшей инкубации, а часть со временем удержания 1,74, 2,75, 4,45, 7,49 и 22,26 увеличивается. Характерно образование сходного с кверцетином продукта (Рисунок 3-4): пик 3,02 (максимумы при 259 и 293 нм). Пик со временем удержания 15,95 (Рисунок 3-6) имеет в спектре поглощения максимумы 285, 322 и 347 нм, которые соответствуют метиленхиноновому производному физетина. При инкубации с метгемоглобином в течение 10 минут этот пик исчезает.

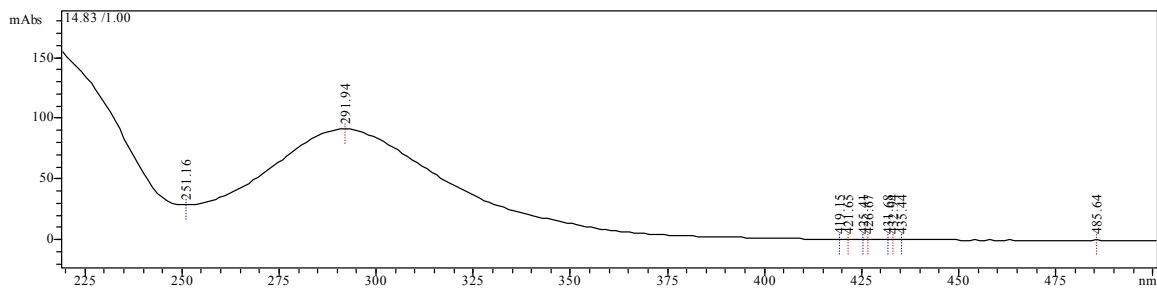
**HPLC-анализ продуктов окисления морина.** Пик со временем удержания 14,25 (Рисунок 2В) соответствует морину. В ходе окисления возникает ряд новых пиков: 1,74, 2,71, 4,45, 10,06, в то время как пик, соответствующий морину уменьшается. Как и в

случае кверцетина и физетина, отмечено образование продукта с максимумом поглощения при 293 нм (10,06 мин, Рисунок 3-8), а также продукта с максимумами поглощения при 252 и 293 нм (4,45 мин, Рисунок 3-7). В ходе дальнейшего окисления происходит уменьшение пика 10,66 и увеличение пиков 1,74, 2,71 и 4,45.

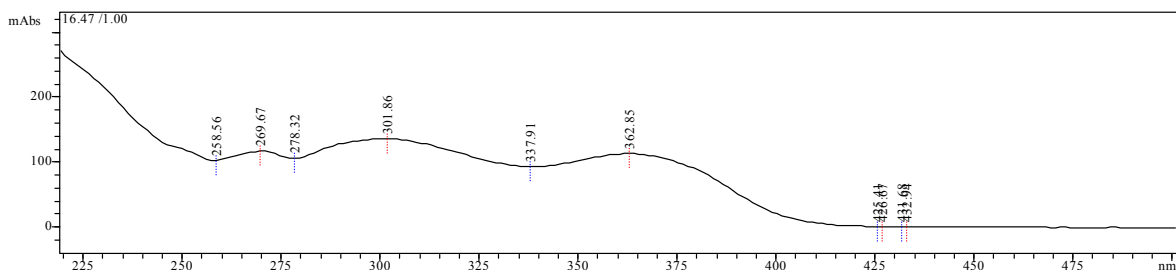
**HPLC-анализ продуктов окисления рутина.** Рутин, как более гидрофильное соединение, имеет время удержания 4,88 мин (Рисунок 2Г). В процессе его окисления данный пик полностью исчезает в течение 15 минут.



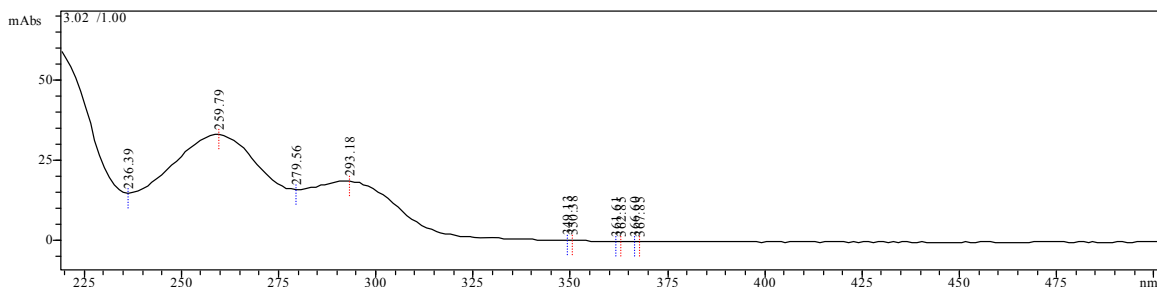
1



2



3



4

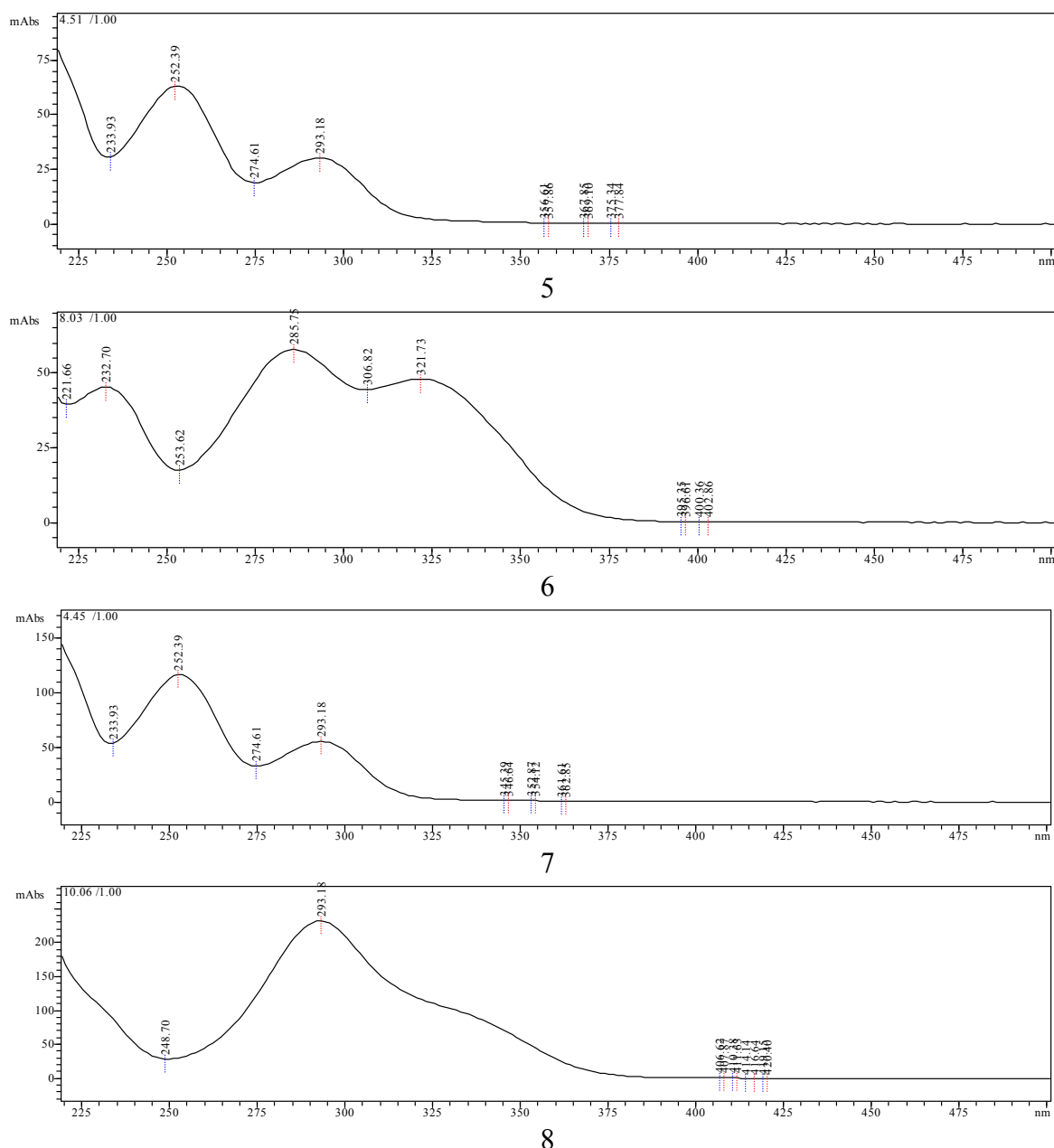


Рисунок 3 - UV-Vis-спектры поглощения основных продуктов псевдопероксидазного окисления флавонолов. 1-3 – продукты окисления кверцетина (3,01, 14,83, 16,47 мин); 4-6 – продукты окисления физетина (3,02, 4,51, 8,03 мин); 7-8 – продукты окисления морина (4,45, 10,06 мин).

Ранее было установлена способность метгемоглобина катализировать реакцию псевдопероксидазного окисления флавонолов – кверцетина, рутина, физетина и морина. При взаимодействии  $H_2O_2$  с гемоглобином сначала образуется каталитически активное производное гемоглобина – комплекс I и II [8, 14, 15], которое, как мы предполагаем, способно катализировать реакцию окисления флавонолов. Поскольку пространство гемового кармана слишком мало для того, чтобы вместить молекулу флавонола, реакция псевдопероксидазного окисления должна проходить на поверхности белковой глобулы с участием  $\pi$ -катион радикала белка (Соединение I).



Сходство спектральных изменений при пероксидазном [10] и псевдопероксидазном окислении флавонолов заставляет предположить образование сходных как промежуточных, так конечных и продуктов окисления. Окисление флавонолов сопровождается характерными изменениями в их спектрах поглощения, которые включают: исчезновение полос 1 и 2 и появление полосы 3 имеют место и при окислении флавонолов различными окислителями, истинными пероксидазами [10-13, 16] и при автоокислении [1]. Характер спектральных изменений позволяет сделать вывод об образовании промежуточного продукта или продуктов, содержащий хромофор с максимумом поглощения в области 330 нм. Оф-ВЭЖХ-анализ позволил изолировать предполагаемые продукты псевдопероксидазного окисления: гидроксibenзойные кислоты (максимум при 293 нм) и метиленихиноновое производное (максимумы при 270, 302 и 363 нм для производного кверцетина; 232, 285 и 321 нм для производного физетина). Для трех флавонолов – кверцетина, физетина и морина зарегистрировано образование неустановленного продукта с максимумами поглощения при 252-259 и 293 нм. Возможно в отношении данного продукта можно говорить об альтернативном пути окисления, при котором в окислении молекул субстрата участвуют вторичные свободные радикалы, возникающие при распаде оксоферрильного  $\pi$ -катион-радикала.

По данным литературы [11, 12] предполагается два основных этапа на пути окисления флавонолов: 1) по ОН-группам В-кольца с образованием семихинонов и хинонов; 2) раскрытие  $\gamma$ -пиронового кольца по связи  $C_3-C_4$  и/или  $C_2-O$ . В результате образуется смесь фенолкарбоновых кислот и дигидроксibenзойных продуктов превращения кольца В, всего более 20 разных продуктов [11, 15]. В структуре флавонолов имеются определенные гидроксильные группы, наиболее легко окисляющиеся при воздействии разнообразных окислительных агентов с низким восстановительным потенциалом [1]. Селективное окисление по этим группам ведет к образованию близких по структуре и спектральным свойствам продуктов. Первичной мишенью чаще всего являются гидроксильные (катехольные) группы кольца В [2, 3]. При их окислении образуются короткоживущие семихиноновые анион-радикалы и далее соответствующие ортобензохиноны. Видимо, в результате окисления катехольной группы кольца В увеличивается поглощение в красной области спектра (около 500 нм) [3], которое было зарегистрировано и в процессе псевдопероксидазного окисления кверцетина, физетина и морина при участии метгемоглобина.

Методом оф-ВЭЖХ-анализа показано расходование рутина (3-рутинозид кверцетина) в процессе псевдопероксидазного окисления при участии метгемоглобина. Однако в этом случае не удалось зарегистрировать возникновение продуктов,

аналогичных образующимся при окислении остальных флавонолов. Факт отсутствия полосы 3 при окислении рутина, у которого блокирована С<sub>3</sub>-ОН группа, может говорить о том, что эта ОН-группа в положении С<sub>3</sub> может вовлекаться в сложный процесс внутримолекулярных превращений, инициируемый окислением по ОН-группам кольца В [3]. Блокирование С<sub>3</sub>-атома в кольце С, который, видимо, является критичным для разрыва γ-пиронового кольца при окислении как по пероксидазному [16], так и по псевдопероксидазному пути, препятствует образованию гидроксibenзойных кислот. Видимо, окисление рутина идет по кольцу В без разрыва структуры кольца С. Имеются данные, что при окислении рутина пероксидазой из хрена по 3'- и 4'-ОН группам образуется как минимум два продукта [13]. При этом имеет место образование производного о-бензохинона в качестве промежуточного соединения [13].

### **Заключение**

Методом UV-Vis-спектрофотометрического анализа показано образование промежуточных продуктов псевдопероксидазного окисления флавонолов кверцетина, физетина, морина и рутина в системе, содержащей Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и метгемоглобин в качестве катализатора. В процессе окисления происходит характерное изменение в спектре поглощения флавонолов с исчезновением полосы 1 и 2 и появлением полосы 3 (кроме рутина). Оф-ВЭЖХ-анализ показал образование ряда промежуточных и конечных продуктов окисления, среди которых гидроксibenзойные кислоты (максимум поглощения 293 нм) и метиленихиноновые производные, а также неустановленные продукты с максимума поглощения 252-259 и 293 нм. Установлен факт разрыва С-кольца в структуре 2-(фенил)-хромен-4-она, а также критичность для этого процесса доступности свободной гидроксильной группы при С<sub>3</sub>.

Благодарим за помощь в выполнении HPLC-анализа сотрудников кафедры биохимии Корик Е.О., Семака И.В.

### **Литература**

1. Костюк, В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.
2. Bors, W. The Chemistry of Flavonoids / W. Bors [et al.] // Flavonoids in Health and Disease (C.A. Rice-Evans and L. Packer eds). New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. P. 111–136.
3. Jovanovic, S.V. Antioxidant properties of flavonols: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals / S.V. Jovanovic [at al.] // Flavonoids in Health and Disease (C.A. Rice-Evans and L. Packer eds). New York: Marcel Dekker, Inc., 1998. P. 137–161.
4. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes / R. Masella [et al.] // J. of Nutritional Biochemistry. – 2005. – Vol. 16. – P. 577–586.

5. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites / J.P.E. Spencer [et al.] // *J. Biochem.* – 2003. – Vol. 372. – P. 173–181.
6. Flavonoids: Antioxidants or Signal Molecules / R.J. Williams [et al.] // *Free Radic. Biology and Medicine.* – 2004. – Vol. 36, № 7. – P. 838–849.
7. Human Red Blood Cells as A Natural Flavonoid Reservoir / M. Fiorani [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2003. – Vol. 37, № 12. – P. 1331–1338.
8. Redox Reactions of Hemoglobin and Myoglobin: Biological and Toxicological Implications / A.I. Alayash [et al.] // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2001. – Vol. 3, № 2. – P. 313–327.
9. Oxidative modification of quercetin by heme proteins / E.M. Cherviakovsky [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2006. – Vol. 342. – P. 459–464.
10. Ледак, Е.А. Окисление ряда флавонолов пероксидазой из хрена / Е.А. Ледак, В.В. Сенчук // *Вестн. Белорус. госуд. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География.* – 2003. – № 1. – С. 30–35.
11. Miller, E. Studies on Flavonol Degradation by Peroxidase (Donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreductase, EC 1.11.1.7): Part 1 – Kaempferol / E. Miller, P. Schreier // *Food Chemistry.* – 1985. – Vol. 17. – P. 143–154.
12. Schreier, P. Studies on Flavonol Degradation by Peroxidase (Donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreductase, EC 1.11.1.7): Part 2 – Quercetin / P. Schreier, E. Miller // *Food Chemistry.* – 1985. – Vol. 18. – P. 301–317.
13. Takahama, U. Spectrophotometric study on the oxidation of rutin by horseradish peroxidase and characteristics of the oxidized products / U. Takahama // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1986. – Vol. 882. – P. 445–451.
14. Alayash, A.I. Redox Biology of Blood / A.I. Alayash // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2004. – Vol. 6, № 6. – P. 941–943.
15. Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide Glutathione Adducts / H.M. Awad [et al.] // *Arch. of Biochem. and Biophys.* – 2000. – Vol. 378. – № 2. – P. 224–233.
16. Makris, D.P. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols / D.P. Makris, J.T. Rossiter // *Food Chemistry.* – 2002. – Vol. 77. – P. 177–185.