

УДК 577.152.1.042 + 577.152.3  
©Коллектив авторов

## ЗАМЕЩЕННЫЕ АМИНОФЕНОЛЫ И ФЛАВОНОИДЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТЕСТ-СИСТЕМ ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

*Ю.А. Григоренко<sup>1</sup>, Е.И. Карасева<sup>1</sup>, Д.И. Метелица<sup>1\*</sup>, В.Л. Сорокин<sup>2</sup>,  
Г.А. Ксендзова<sup>2</sup>, О.И. Шадыро<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141 Минск, ул. акад. Купревича, 5/2; факс: (375)-(172)63-7274; эл. почта: metelitz@iboch.bas-net.by

<sup>2</sup>Химический факультет Белорусского государственного университета, 220050 Минск, ул. Ленинградская, 14; факс: (375)-(172)09-5464; эл. почта: shadyro@open.by

Проведено сравнительное кинетическое исследование окисления *орто*-фенилендиамина (ФДА) в “псевдопероксидазной” системе метгемальбумин-Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> в присутствии 2-амино-4-трет-бутилфенола (АТБФ), 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола (АДТБФ) и его четырёх N-ацил-производных, а также растительных флавоноидов (кверцетина, морина, силибина, гесперидина и нарингина) при 20°C в забуференном физиологическом растворе, рН 7,4, содержащем 5,25% этанола и ДМФ. АТБФ, АДТБФ и его два N-ацил-производных и все пять флавоноидов с разной эффективностью ингибировали окисление ФДА, охарактеризованное константами ингибирования  $K_i$ , M или глубиной ингибирования в процентах при максимально достижимой концентрации ингибиторов. Наиболее эффективными антиоксидантами оказались кверцетин ( $K_i=7,7 \times 10^{-5}$  M) и АТБФ ( $K_i=1,26 \times 10^{-4}$  M). С учётом этих характеристик и совокупности других необходимых критериев пары ФДА-кверцетин и ФДА-АТБФ рекомендованы к практическому использованию в тест-системах общей антиоксидантной активности биологических объектов.

**Ключевые слова:** антиоксидантная активность, аминифенолы, флавоноиды, метгемальбумины, *о*-фенилендиамин, псевдопероксидазное окисление.

**Принятые сокращения:** ABTS – диаммонийная соль 2,2'-азино-бис(3-этил-2,3-дигидробензотиазолин-6-сульфоновой кислоты), АДТБФ – 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенол, АТБФ – 2-амино-4-трет-бутилфенол, MetHa – метгемальбумин (комплекс гема с БСА в соотношении 1:3), ОАА – общая антиоксидантная активность, ПХ – пероксидаза из корней хрена, ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ФДА – орто-фенилендиамин, InH – ингибиторы свободно-радикальных процессов.

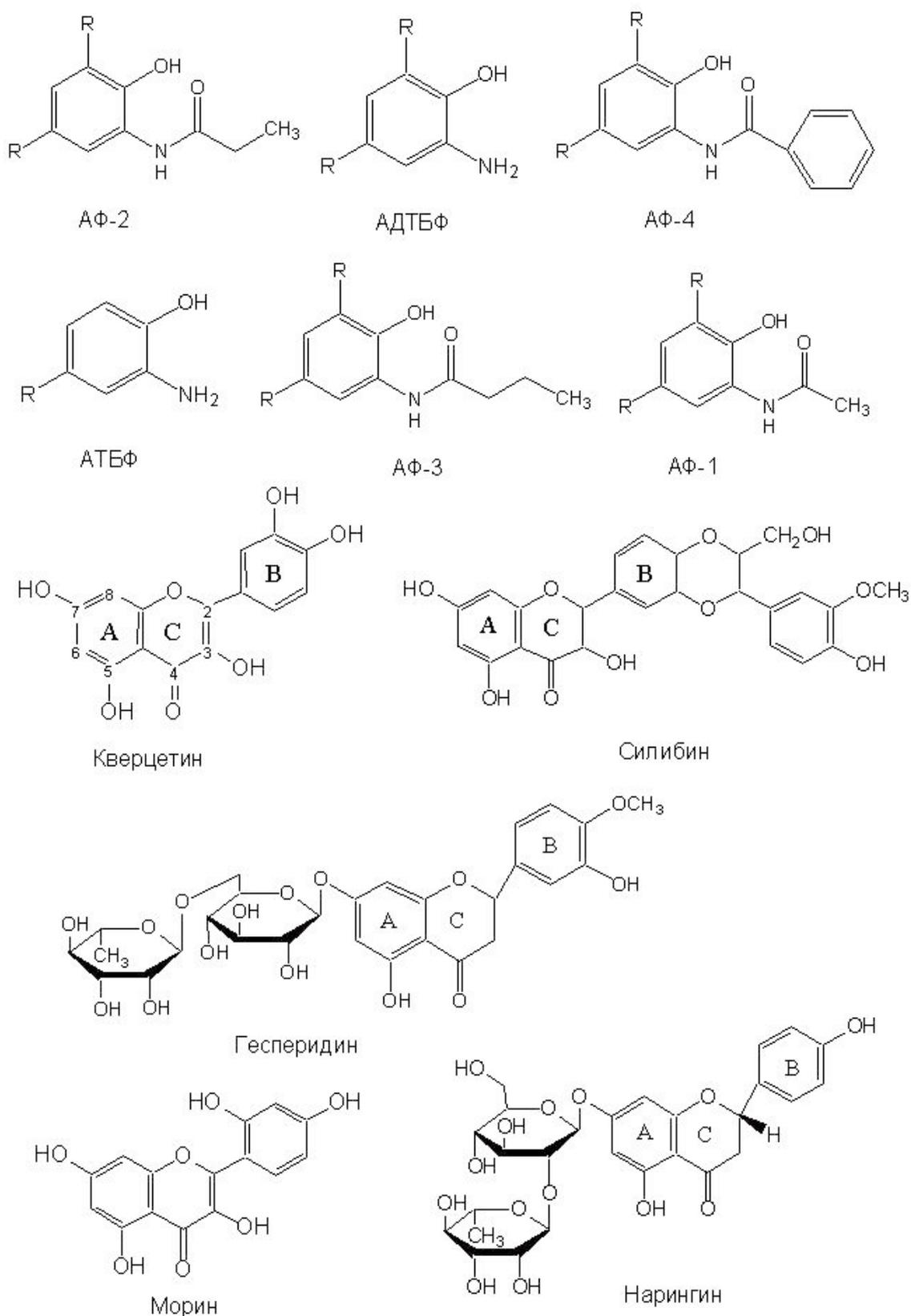
\* - адресат для переписки

**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, супероксиддисмутаза и др.) и продуктов перекисного окисления липидов, использование флуоресцентных, хемилюминесцентных, вольтамперометрических и других методик, обсужденных во многих обзорах и оригинальных статьях [1-7]. Большинство способов определения ОАА биологических объектов слишком трудоёмки, дорогостоящи и поэтому малопригодны для массового лабораторного скрининга. На наш взгляд, наиболее перспективны методы интегральной оценки ОАА биологических жидкостей, предложенные фирмой “Randox” на основе тест-системы “метмиоглобин- $H_2O_2$ -ABTS-Тролокс” [1], 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 [1, 4, 5].

В 2001 г. нами предложена “псевдопероксидазная” тест-система ОАА сыворотки крови человека, в которой дорогие метмиоглобин и ABTS заменены доступными и дешевыми метгемальбумином (MetHa) и *o*-фенилендиамином (ФДА), а вместо труднорастворимого Тролокса использован синтезированный нами ранее (2,3-дигидрокси-4,6-ди-трет.бутилфенил)-*S*-тиосульфат натрия (InH1) [5]. Тест-система “метгемальбумин- $H_2O_2$ -ФДА-InH1” хорошо зарекомендовала себя при определении ОАА сывороток крови здоровых лиц и пациентов с разными патологиями. С целью совершенствования этой системы и расширения области её использования нами проведены систематические кинетические исследования пероксидазного окисления многочисленных пар “субстрат пероксидазы хрена (ПХ) - ингибитор-калибратор”, в которых в качестве хромогенных субстратов использованы ABTS, ФДА и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), а в качестве ингибиторов замещенные фенолы и их полидисульфиды, а также некоторые аминифенолы [6-8]. Практика определения ОАА биологических жидкостей человека показала, что для успешного решения этой задачи необходимы ингибиторы-калибраторы умеренной эффективности, для количественной характеристики которой мы использовали константы ингибирования пероксидазных реакций  $K_i$ . Величины  $K_i$  оптимальных ингибиторов-калибраторов должны быть близки к их значениям для Тролокса [4] или InH1 [5] и находится в пределах  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  М [4-7].

Цель данной работы – количественная характеристика ингибирующих свойств двух замещенных аминифенолов и четырёх *N*-ацилированных производных, а также пяти растительных флавоноидов (кверцетин, морин, силибин, гесперидин и нарингин) в тест-системе ОАА “метгемальбумин- $H_2O_2$ -ФДА” в строго идентичных условиях для выбора оптимальных ингибиторов-калибраторов по значениям их констант ингибирования или глубине торможения “псевдопероксидазного” окисления ФДА. Структурные формулы всех изученных соединений представлены на рисунке 1.

Выбор в качестве объектов исследования замещенных аминифенолов обусловлен их ингибирующими свойствами в пероксидажном окислении ТМВ [7], а природных флавоноидов – их хорошо известной высокой антиоксидантной способностью в химических и биологических свободно-радикальных процессах [9-11]: антиоксидантная активность растительных флавоноидов в существенной степени определяет их выраженные антиаллергические, антиканцерогенные, противовоспалительные и противовирусные свойства [9].



**Рисунок 1.** Структурные формулы замещённых аминофенолов (R – *трет.*бутил) и растительных флавоноидов.

**МЕТОДИКА.** *Реагенты.* В работе использовали гемин фирмы “Serva” (Германия), раствор которого готовили в ДМФ. Для получения метгемальбумина по методике описанной в работе [5], применяли бычий сывороточный альбумин (БСА) (“Предприятия по производству бактериальных препаратов БелНИИ эпидемиологии и микробиологии”, Минск) без дополнительной очистки, используя для его спектрофотометрического определения молярный коэффициент поглощения  $\varepsilon_{280}$  35000 М<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>.

В качестве субстрата “псевдопероксидазной” системы применяли *o*-фенилендиамин (ФДА) квалификация “ч.д.а” производства Харьковского химико-фармацевтического завода (Украина) после очистки возгонкой в вакууме. В качестве окислителя использовали разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> спектрофотометрически ( $\varepsilon_{230}$  = 72,4 М<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>). Для приготовления буферных растворов применяли соли и основания производства “Реахим” (Россия).

*Замещённые аминифенолы* АТБФ и АДТБФ (см. рис. 1) были синтезированы по описанным ранее методикам [12, 13] соответственно. *N*-ацетильные производные аминифенола АДТБФ, обозначенные символами АФ-1, АФ-2, АФ-3 и АФ-4 (см. рис. 1), были синтезированы и охарактеризованы по методикам, описанным в работе [14]. Исходные растворы аминифенолов готовили в этаноле (АТБФ и АДТБФ) или ДМФ непосредственно перед началом эксперимента.

*Флавоноиды* кверцетин (М 302), морин в виде дигидрата (М 338), силибин (М 482) и гесперидин (М 610,57) получены от фирмы “Sigma” (США), а нарингин (М 580,55) – от фирмы “Fluka” (Швейцария). Все флавоноиды использовали без дополнительной очистки.

*Окисление ФДА* в “псевдопероксидазной” системе MetHa (комплекс гемин-БСА (1:3)) – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> проводили при 20°С на спектрофотометре “Specol-211” (“Carl Zeiss”, Германия) с термостатируемым кюветным отделением в среде “забуференного” физиологического раствора (ЗФР; 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,4, с 0,15 М NaCl), содержащего 5,25% ДМФ (в присутствии АТБФ и АДТБФ – 5% этанола и 0,25% ДМФ). Такие условия полностью обеспечивали гомогенность реакционных смесей.

В типичном эксперименте конечные концентрации реагентов составляли: 10 мкМ гемин, 30 мкМ БСА, 6 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,8 мМ ФДА и разные концентрации потенциальных ингибиторов. Во всех случаях реакции начинали добавлением к смесям H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и следили за окислением ФДА по образованию продукта реакции с максимумом светопоглощения при 455 нм, используя при расчетах начальной скорости реакции молярный коэффициент поглощения продукта  $\varepsilon_{455}$  16200 М<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>, определенный ранее в нашей лаборатории при рН 7,4. При определении начальных скоростей реакции использовали только начальные строго линейные участки кинетических кривых роста оптической плотности продукта окисления ФДА.

*Характеристика ингибирования окисления ФДА в “псевдопероксидазной” системе MetHa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* Для определения типа ингибирования строили зависимости в координатах Лайнуивера-Берка. Для определения величин констант ингибирования  $K_i$  использовали метод Диксона [15] и в случае его неприменимости – метод Корниш-Боуден в координатах  $[\text{ФДА}]_0/v_0 - [\ln\text{H}]$ , где  $v_0$  – начальная скорость окисления ФДА,  $[\ln\text{H}]$  – концентрация ингибитора [16]. В тех случаях, когда использование обоих методов было затруднено или невозможно, процесс характеризовали глубиной ингибирования в процентах при максимально достижимой концентрации ингибитора.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** *Ингибирование окисления ФДА в “псевдопероксидазной” системе MetHa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> замещёнными аминифенолами.* На рисунке 2а представлены кинетические зависимости роста продукта окисления ФДА ( $A_{455}$ ) в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии АТБФ в концентрациях от 0,5 мкМ до 0,8 мМ (2-9). Как видно, с ростом концентрации АТБФ сильно снижал скорость окисления ФДА. Зависимость начальной скорости окисления

ФДА  $v_0$  от начальной концентрации ФДА в координатах Лайнуивера-Берка при возрастающих концентрациях АТБФ свидетельствует о **смешанном типе ингибирования** (данные не представлены). На рисунке 2б показаны зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от возрастающей концентрации АТБФ, которые во всех случаях линейны и пересекаются в одной точке в левом квадранте. По методу Диксона [15] определена константа ингибирования, равная 0,126 мМ при 20°C.

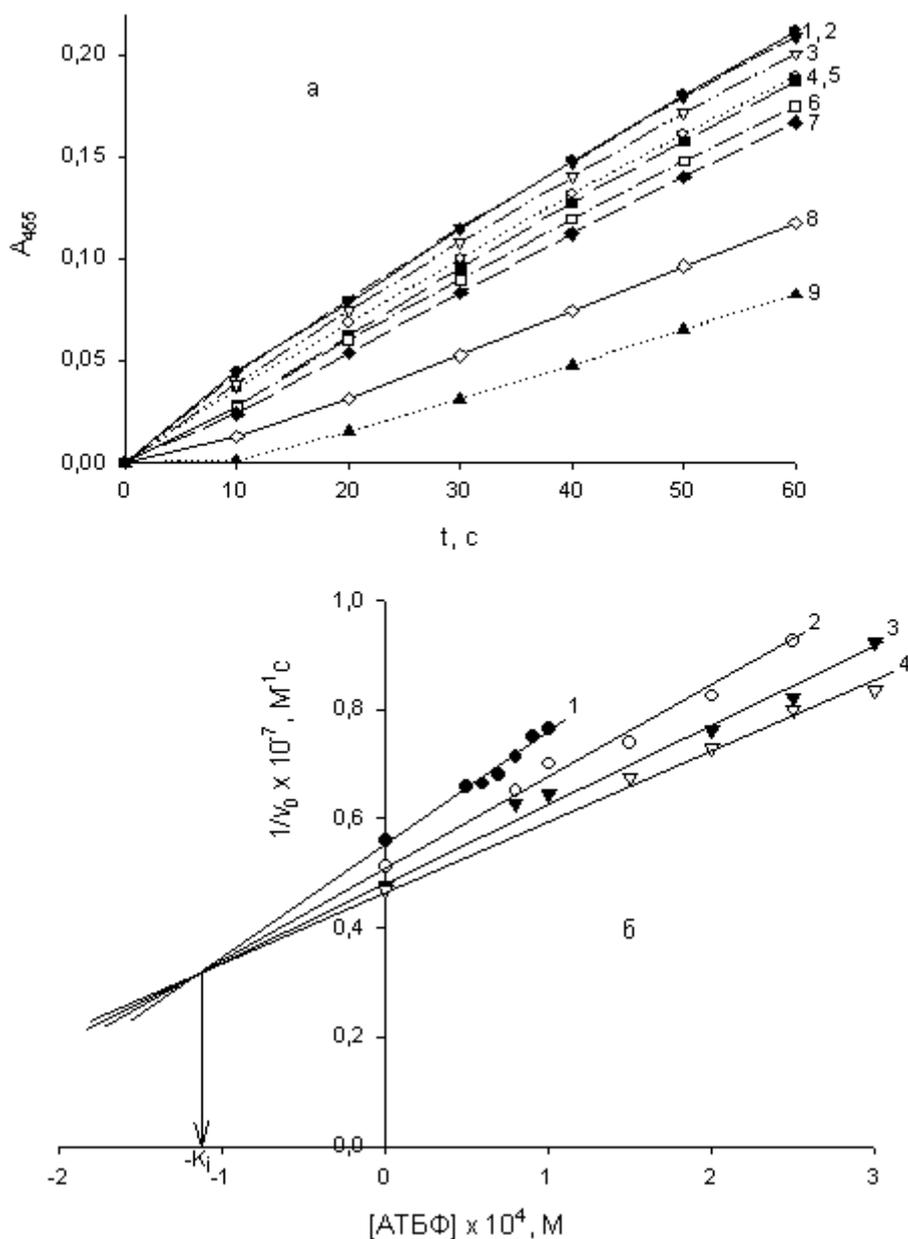


Рисунок 2.

а - Кинетика роста оптической плотности продукта окисления ФДА (0,8 мМ) в отсутствие АТБФ (1) и в присутствии 0,5 (2), 1,0 (3), 5,0 (4), 10 (5), 50 (6), 100 (7), 500 (8) и 800 (9) мкМ АТБФ при 20°C, в ЗФР, рН 7,4, содержащем 5% этанола и 0,25% ДМФ, 10 мкМ гемин, 30 мкМ БСА, 6 мМ  $H_2O_2$ .

б - Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от концентрации АТБФ при разных начальных концентрациях ФДА: 1 - 0,15, 2 - 0,30, 3 - 0,45 и 4 - 0,60 мМ.

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОАА

Смешанный тип ингибирования свидетельствует о возможной частичной конкуренции ФДА и АТБФ за связывание с MetHa в области активного центра и безусловной конкуренции субстрата и ингибитора за активные радикальные частицы, главной из которых является высоко реакционно-способный радикал HO· [17-19].

С практической точки зрения отметим, что кинетические зависимости роста  $A_{455}$  строго линейны и не осложнены лаг-периодами, измерение окисления происходит быстро (1 мин), АТБФ хорошо совместим со средой – ЗФР с добавлением 5% этанола и 0,25% ДМФ, а константа ингибирования 0,126 мМ в 6,3 раза меньше концентрации ФДА (0,8 мМ).

В идентичных условиях аналогичные кинетические зависимости окисления ФДА получены без и в присутствии АДТБФ в возрастающих концентрациях от 0,1 мкМ до 0,05 мМ, при которой достигается 35% ингибирование процесса (см. табл.). Определение  $K_i$  из зависимостей в координатах Диксона ( $1/v_0$  от  $[АДТБФ]_0$ ) было бы некорректным в интервале концентраций ингибитора 0,1 мкМ – 0,05 мМ, который невозможно расширить из-за ограниченной растворимости АДТБФ в среде реакции, связанной с присутствием в молекуле АДТБФ второго трет.бутильного заместителя в сравнении с хорошо растворимым АТБФ (см. рис. 1).

*Таблица.* Количественные характеристики ингибирования замещёнными аминифенолами и флавоноидами окисления ФДА в “псевдопероксидазной” системе “MetHa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ФДА” и ТМВ в пероксидазной системе “ПХ-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ТМВ” [6, 22].

Ингибитор	Система “MetHa-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -ФДА”			Система “ПХ-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -ТМВ”
	$[InH] \times 10^4, M$	Глубина ингибирования, %	$K_i \times 10^4, M$	$K_i \times 10^4, M$
АТБФ	2,0	49	1,26	0,98*
АДТБФ	0,5	35	-	0,36*
АФ-1	1,0	17	-	не ингибирует
АФ-2	1,0	24	-	не ингибирует
Кверцетин	6,0	22	0,77	0,11**
Морин	0,6	22	-	0,22**
Салицин	6,0	26	-	активирует окисление
Гесперидин	6,0	50	3,76	12% ингибирования
Нарингин	2,0	41	2,72	10% ингибирования

Примечание. \* - 20°C, 0,015 М фосфат-цитратный буфер, pH 6,0, содержащий 5% этанол [6];

\*\* - 20°C, 0,015 М фосфат-цитратный буфер, pH 6,3, содержащий 10% ДМФ [22].

С целью повышения растворимости АДТБФ в его молекулу были введены ацильные фрагменты и получены четыре различных N-ацильных производных – АФ-1, АФ-2, АФ-3 и АФ-4 (рис. 1), каждое из которых испытано в стандартных условиях в реакции окисления ФДА. Оказалось, что АФ-1 в интервале концентраций 0,05-0,10 мМ монотонно снижал начальную скорость окисления ФДА на 17%, а АФ-2 в том же интервале концентраций – на 24% (см. табл.). N-ацил-производные АФ-3 и АФ-4 в тех же концентрациях не обнаружили ингибирующего действия на окисление ФДА. Снижение антиоксидантной активности N-ацил-производных в “псевдопероксидазной” системе связано с потерей одного из радикал-акцептирующих центров – NH<sub>2</sub>-группы, которая блокируется при ацилировании; весьма вероятно также, что снижается антирадикальная активность HO-группы из-за возможности образования водородной связи с карбонильным кислородом ацильных фрагментов. В случае соединений АФ-1 и АФ-2 водородные связи –ОН...О= образуются лишь частично, так как иначе эти аминифенолы вообще не имели бы антирадикальной активности даже по отношению к реакционноспособному HO·.

Таким образом, из шести использованных замещённых аминифенолов для применения в тест-системах ОАА, безусловно, перспективен АТБФ, по совокупности свойств удовлетворяющий всем требованиям к ингибиторам-калибраторам, приведенным в работах [4, 5, 17-20].

Ингибирование окисления ФДА в “псевдопероксидазной” системе MetHa- $H_2O_2$  растительными флавоноидами. На рисунке 3а представлены кинетические зависимости роста оптической плотности продукта окисления  $A_{455}$  без (1) и в присутствии возрастающих концентраций кверцетина от 5,0 мкМ до 0,6 мМ (2-10). Как видно, кверцетин сильно снижал начальную скорость окисления ФДА с ростом концентрации и при 0,6 мМ ингибировал процесс на 82%. Зависимость обратной начальной скорости окисления ФДА от концентрации кверцетина (координаты Диксона) однозначно свидетельствует о **бесконкурентном типе ингибирования** (рис. 3б). В таких случаях для определения величины  $K_i$  используют метод Корниш-Боуден [16]: на рисунке 3в представлена линейаризация зависимостей  $[\text{ФДА}]/v_0$  от  $[\text{InH}]$  при трех разных концентрациях ФДА и по данным рисунка определена величина  $K_i = 0,077$  мМ, свидетельствующая о высокой ингибирующей эффективности кверцетина, которая в 1,6 раза выше, чем у синтетического АТБФ ( $K_i = 0,126$  мМ).

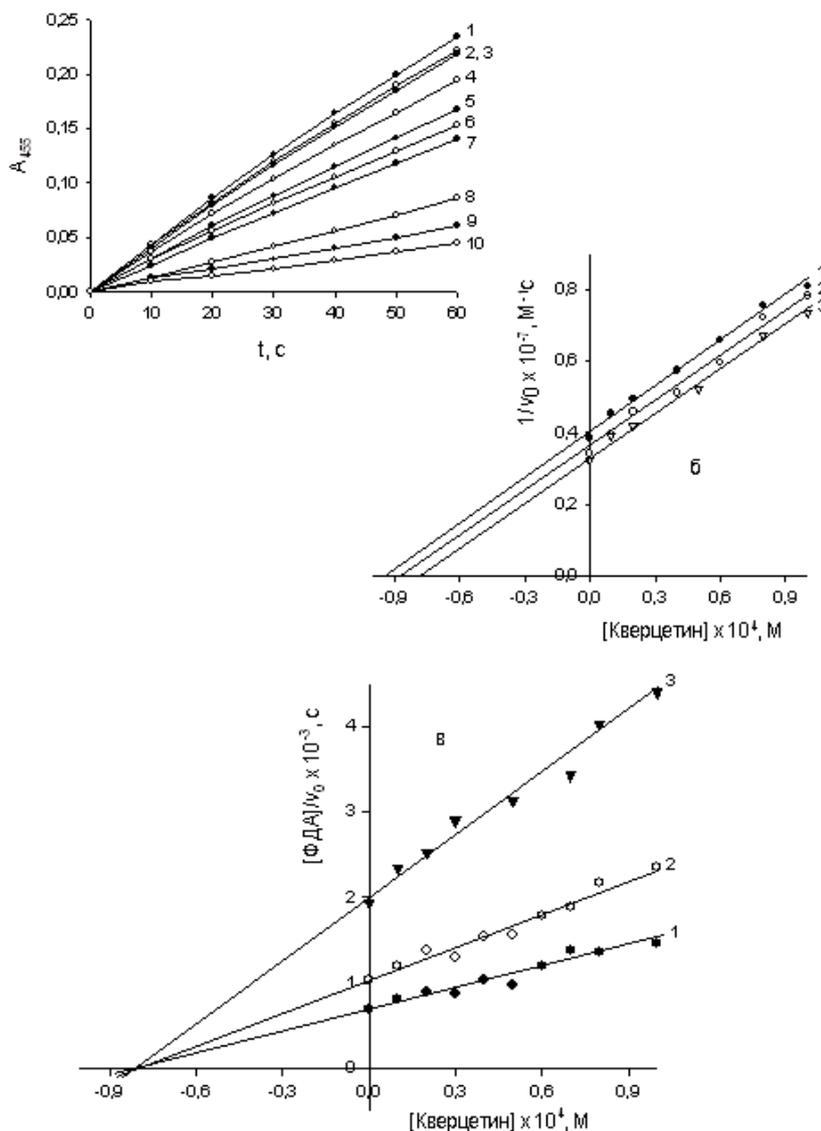


Рисунок 3.

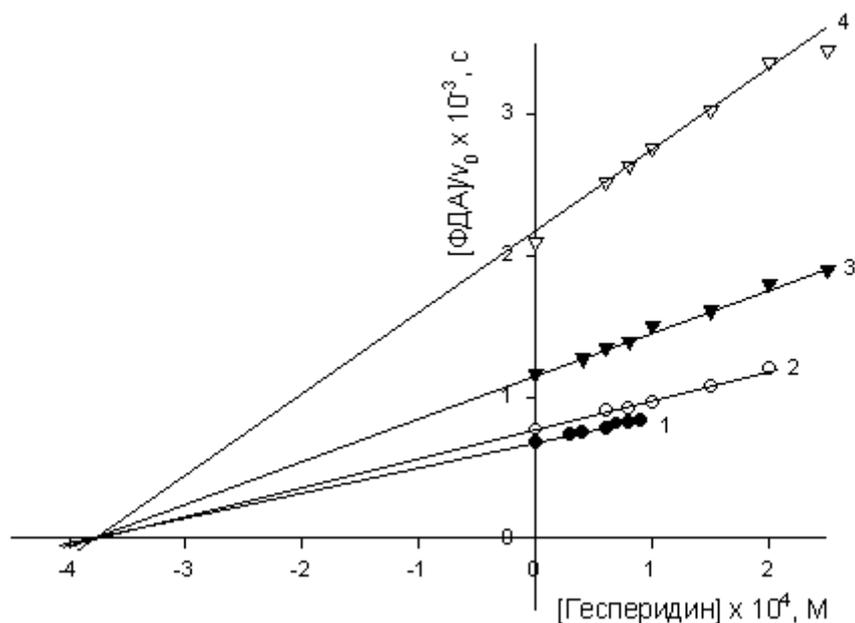
- а – Кинетика роста оптической плотности продукта окисления ФДА (0,8 мМ) в отсутствие кверцетина (1) и в присутствии 5 (2), 10 (3), 30 (4), 50 (5), 80 (6), 100 (7), 200 (8), 400 (9) и 600 (10) мкМ кверцетина при 20°C, в ЗФР, рН 7,4, содержащем 5,25% ДМФ, 10 мкМ гемин, 30 мкМ БСА, 6 мМ  $H_2O_2$ . б – Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА от концентрации кверцетина при разных начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,18, 2 – 0,30 и 3 – 0,60 мМ. в – Зависимости  $[\text{ФДА}]/v_0$  от концентрации кверцетина при разных начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,18, 2 – 0,30 и 3 – 0,60 мМ.

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОАА

**Морин** в концентрациях от 2 мкМ до 0,06 мМ сильно снижал скорость окисления ФДА и обнаружил максимальную глубину ингибирования ~88% при невысокой концентрации 0,06 мМ. Однако величина  $K_i$  для морина не определена, так как с ростом его концентрации продукты окисления ингибитора мешают спектрофотометрическому определению расходуемого ФДА. Кроме того, продукты окисления морина взаимодействуют с MetHa (как и с ПХ) и отравляют биокатализатор, что объясняется повышенной реакционной способностью по отношению к гембелкам феноксильных радикалов, образующихся при окислении HO-групп морина в кольце В (рис. 1), находящихся в *мета*-положении друг к другу [21] в отличие от кверцетина, у которого HO-группы в кольце В находятся в *орто*-положении.

**Силибин** в интервале концентраций от 5,0 мкМ до 0,6 мМ монотонно снижал скорость окисления ФДА, так что при его максимальной концентрации глубина ингибирования процесса составляла ~86%. Для силибина зависимости в координатах Диксона в указанном интервале его концентраций были нелинейными, что исключает определение величины  $K_i$  этим методом.

**Гесперидин** в интервале концентраций 0,03-0,60 мМ снижал скорость окисления ФДА приблизительно на 50%. Зависимости в координатах Диксона строго линейны и параллельны друг другу, что подтверждает **бесконкурентный тип** ингибирования, при котором  $K_i$  определяют по методу Корниш-Боуден [16]: на рисунке 4 представлены линейные зависимости в координатах  $[\text{ФДА}]/v_0 - [\text{гесперидин}]$ , по точке пересечения которых определена  $K_i = 0,376$  мМ.



**Рисунок 4.**

Зависимости  $[\text{ФДА}]/v_0$  от концентрации гесперидина при окислении ФДА в концентрациях: 1 – 0,15, 2 – 0,18, 3 – 0,30 и 4 – 0,60 мМ. Остальные условия реакции приведены в подписи к рисунку 3.

**Нарингин** в интервале концентраций 0,05-0,8 мМ снижал скорость окисления ФДА приблизительно до 41% и обнаружил смешанный тип ингибирования (данные не приведены). Величина  $K_i$  определена по методу Корниш-Боуден на основании данных рисунка 5: прямые линии для разных концентраций ФДА пересекаются в одной точке в левом квадранте и  $K_i = 0,872$  мМ.

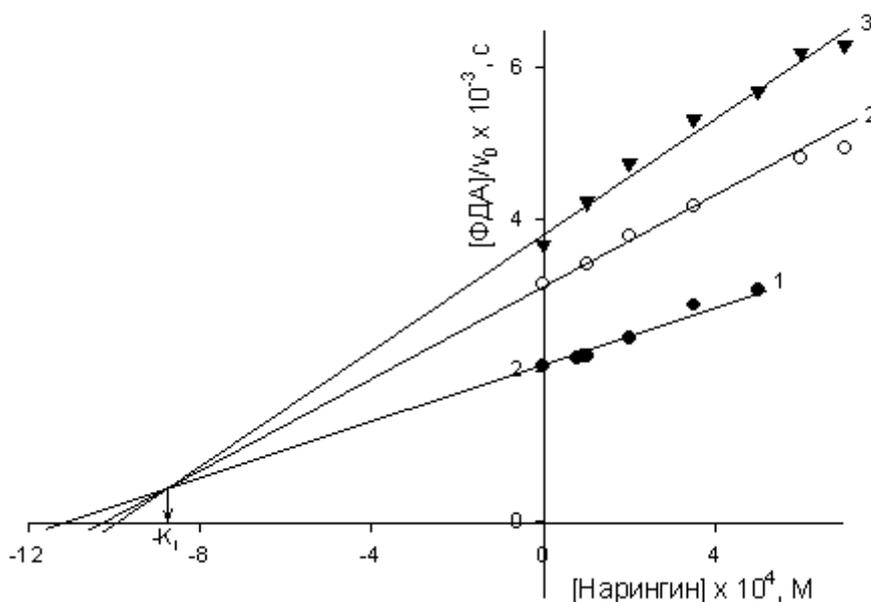


Рисунок 5.

Зависимости  $[\text{ФДА}]/v_0$  от концентрации нарингина при окислении ФДА в концентрациях: 1 – 0,5, 2 – 0,8 и 3 – 1,0 мМ. Остальные условия реакции приведены в подписи к рисунку 3.

Таким образом, все пять флавоноидов, два из которых (гесперидин и нарингин) гликозидной природы, существенно ингибируют окисление ФДА в “псевдопероксидазной” системе  $\text{MetHa}-\text{H}_2\text{O}_2$ -ФДА. На основании количественных данных таблицы изученные флавоноиды могут быть расположены в ряд по убывающей ингибирующей эффективности: кверцетин>морин>силибин>гесперидин>нарингин.

Как видим, в конце ряда находятся гликозидные флавоноиды: это может быть связано со снижением их гидрофобности и повышением растворимости в водной среде, что не способствует связыванию гликозидных флавоноидов с активным центром  $\text{MetHa}$  и снижает возможность их взаимодействия с радикалами  $\text{HO}\cdot$ , генерируемыми в этом центре. По количественным параметрам ингибирования (табл.), совместимости со средой анализа и другим критериям для практического использования в тест-системах ОАА может быть рекомендована пара ФДА-кверцетин.

Важно отметить, что при ингибировании окисления ТМВ флавоноидами в пероксидазной системе “ПХ- $\text{H}_2\text{O}_2$ -ТМВ”, охарактеризованном константами ингибирования или его глубиной в процентах, ряд убывающей эффективности флавоноидов как антиоксидантов полностью аналогичен приведенной выше последовательности для “псевдопероксидазной” системы “ $\text{MetHa}-\text{H}_2\text{O}_2$ -ФДА”: кверцетин>морин>гесперидин=нарингин [22].

Для сравнения количественные характеристики ингибирования окисления ФДА в “псевдопероксидазной” и ТМВ в пероксидазной системах сопоставлены в таблице, из которой следует, что одни и те же ингибиторы более эффективны в пероксидазной системе, чем в “псевдопероксидазной”, что объясняется двумя причинами: различной природой радикальных частиц – активные промежуточные соединения пероксидазы I и II и катион-радикал  $\text{TMB}^{+\cdot}$  в первом случае; радикал  $\text{HO}\cdot$  и первичный радикал ФДА $\cdot$  – во втором; различием в связывании ингибиторов в гидрофобном канале ПХ и с несколькими сайтами альбумина в составе его

комплекса с геминном, часть которых может быть удалена от центра зарождения радикалов. Множественность сайтов альбуминов для связывания экзогенных соединений хорошо известна [23, 24]. Это обстоятельство объясняет также различия типа ингибирования: смешанное для пар ФДА с АТБФ и нарингином и бесконкурентное – для пар ФДА с кверцетином и гесперидином. Ранее показан смешанный характер ингибирования окисления ТМВ в пероксидазной системе для АТБФ и АДТБФ [6] и для кверцетина и морина [22].

На основании полученных данных можно утверждать, что в тест-системах ОАА биологических объектов могут быть использованы пары ФДА-АТБФ, ФДА-кверцетин, а также ТМВ-АДТБФ и ТМВ-кверцетин, как показано ранее [6, 22].

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ) по проекту В-1206.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Rice-Evans C., Miller N.* (1994) *Meth. Enzymol.*, **234**, 279-293.
2. *Теселкин Д.А., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 87-93.
3. *Клебанов Г.И., Теселкин Ю.А., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Владимиров Ю.А.* (1999) *Вестник РАМН*, №2, 15-22.
4. *Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышников В.С.* (2001) *Биохимия*, **66**, 628-639.
5. *Русь О.Б., Метелица Д.И.* (2001) *Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук*, №4, 75-82.
6. *Наумчик И.В., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Полозов Г.И., Шадыро О.И.* (2004) *Биоорг. химия*, **30**, 537-546.
7. *Наумчик И.В., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Едимечева И.П., Сорокин В.Л., Шадыро О.И.* (2005) *Биохимия*, **70**, 397-405.
8. *Metelitz D.I., Karasyova E.I., Grintsevich E.E., Thorneley R.N.F.* (2004) *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1-9.
9. *Yang Ch.S., Prabhu S., Landau J.* (2001) *Drug Metabolism Rev.*, **33**, 237-253.
10. *Andersen Ø.M., Markham K.R. (eds.)* (2005) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, Boca Raton.
11. *Эмануэль Н.М.* (1977) *Кинетика экспериментальных опухолевых процессов*, Наука, Москва, с. 257-299.
12. *Albert H.E.* (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 4985-4988.
13. *Вольева В.Б., Прокофьева Т.И., Белостоцкая И.С., Комиссарова Н.Л., Ершов В.В.* (1995) *Известия РАН, сер. хим.*, №9, 1789-1793.
14. *Шадыро О.И., Ксендзова Г.А., Бореко Е.И.* (2002) *Хим.-фарм. журнал*, **36**, 14-16.
15. *Келети Т.* (1990) *Основы ферментативной кинетики*, Мир, Москва, с. 183-203.
16. *Диксон М., Уэбб Э.* (1982) *Ферменты*, Мир, Москва, Т. 2, с. 507.
17. *Русь О.Б., Пучкаев А.В., Метелица Д.И.* (1996) *Биохимия*, **61**, 1813-1824.
18. *Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В.* (1997) *Журн. прикл. химии*, **70**, 1713-1720.
19. *Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В., Шадыро О.И.* (1997) *Биохимия*, **62**, 323-333.
20. *Русь О.Б., Пучкаев А.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И.* (1998) *Журн. прикл. химии*, **71**, 842-848.
21. *Divi R.L., Doerge D.R.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 9668-9674.
22. *Григоренко Ю.А., Карасева Е.И., Метелица Д.И.* (2006) *Биоорг. химия*, **32**, принята к опубликованию.

23. Ландау М.А. (1981) Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений, Наука, Москва, с. 42-103.
24. Peters Th. (1996) All about Albumin – Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego, CA.

Поступила: 02. 11. 2006.

**SUBSTITUTED AMINOPHENOLS AND FLAVONOIDS AS POTENTIAL COMPONENTS  
FOR TEST-SYSTEMS OF TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY**

**Yu.A. Grigorenko<sup>1</sup>, E.I. Karasyova<sup>1</sup>, D.I. Metelitz<sup>1</sup>, G.A. Ksendsova<sup>2</sup>, V.L. Sorokin<sup>2</sup>, O.I. Shadyro<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus<sup>1</sup>, ul. Acad. Kuprevicha, 5/2, Minsk, 220141 Belarus<sup>1</sup>; fax: (375)-(172)63-7274; e-mail: metelitz<sup>1</sup>@iboch.bas-net.by

<sup>2</sup>Belorussian State University, Chemical Faculty, ul. Leningradskaya, 14, Minsk, 220050 Belarus<sup>2</sup>; fax: (375)-(172)09-5464; e-mail: shadyro<sup>2</sup>@open.by

A comparative kinetic study of *ortho*-phenylenediamine (PDA) oxidation in the “pseudoperoxidase” system Methemalbumin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of 2-amino-4-*tert*-butylphenol (ATBP), 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol (ADTBP) and its four N-acyl derivatives, as well as flavonoids (quercetin, morin, silibin, hesperidin and naringin) has been carried out under standart conditions at 20°C in phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 5.25% ethanol and DMFA. ATBP, ADTBP and two its N-acyl-derivatives as well as all five flavonoids inhibited with different efficiency the PDA oxidation characterized in terms of the inhibition constants, K<sub>i</sub>, M, or the percent of inhibition degree at the maximal taking concentrations of these inhibitors.

Most effective antioxidants were quercetin (K<sub>i</sub> = 7.7×10<sup>-5</sup> M) and ATBP (K<sub>i</sub> = 1.26×10<sup>-4</sup> M). Using these characteristics and other necessary criteria, the pairs PDA-quercetin and PDA-ATBP were proposed for a practical application in the test-systems for total antioxidant activity of biological objects.

**Key words:** antioxidant activity, aminophenols, flavonoids, methemalbumin, *ortho*-phenylenediamine, pseudoperoxidase-catalyzed oxidation.