

УДК 577.152.193

КИНЕТИКА ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА В ПРИСУТСТВИИ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА

Л.И. Олейник, Т.С. Буслова, И.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова

(кафедра аналитической химии, e-mail: lioleynik@mail.ru)

Установлено, что в присутствии макроциклического комплексообразователя β -циклодекстрина скорость пероксидазного окисления флавоноида кверцетина возрастает на 20%. Сравнение кинетических параметров указанной реакции в присутствии и в отсутствие β -циклодекстрина показало, что его введение не влияет значительно на специфичность фермента по отношению к субстрату-восстановителю (характеризуемую отношением $k_{\text{кат}}/K_M$), а повышение скорости реакции не зависит от времени инкубирования кверцетина с β -циклодекстрином. Сделано предположение, что увеличение скорости реакции связано с неспецифическим взаимодействием β -циклодекстрина с продуктом окисления кверцетина.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, кверцетин, β -циклодекстрин.

Циклодекстрины (рис. 1) являются циклическими олигосахаридами, состоящими из шести, семи или восьми α -D-глюкопиранозных единиц, связанных α -1,4-гликозидными связями в конусообразную структуру. Эта структура обладает гидрофобной внутренней полостью и гидрофильной внешней поверхностью, поэтому β -циклодекстрины способны повышать стабильность и растворимость лекарственных препаратов, витаминов и многих других соединений вследствие образования комплексов включения по типу “гость-хозяин” между молекулой-“гостем” и гидрофобной полостью β -циклодекстрина-“хозяина”.

Изучению влияния циклодекстринов на реакции окисления различных веществ (в частности, фенольных соединений и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина), катализируемые ферментом пероксидазой хрена, посвящен ряд работ [1–4]. Описаны результаты, свидетельствующие как об ингибирующем, так и активирующем

действии циклодекстрина на подобные реакции, причем наблюдаемые эффекты объяснены образованием комплексов либо между циклодекстрином и субстратом фермента, либо между циклодекстрином и интермедиатами ферментативной реакции.

Известно [5–7], что кверцетин (структурная формула которого представлена на рис. 2), так же, как и ряд других соединений, способен включаться в полость β -циклодекстрина. При этом включение кверцетина в такой комплекс позволяет управлять его свойствами, в первую очередь растворимостью в воде, а также, по некоторым данным [2, 5], способностью к окислению. Известно [2], что кверцетин является субстратом пероксидазы, однако подробное описание механизма и кинетики его пероксидазного окисления в литературных источниках отсутствует. В связи с этим представляло интерес изучение как собственно пероксидазного окисления флавоноида, так и воз-

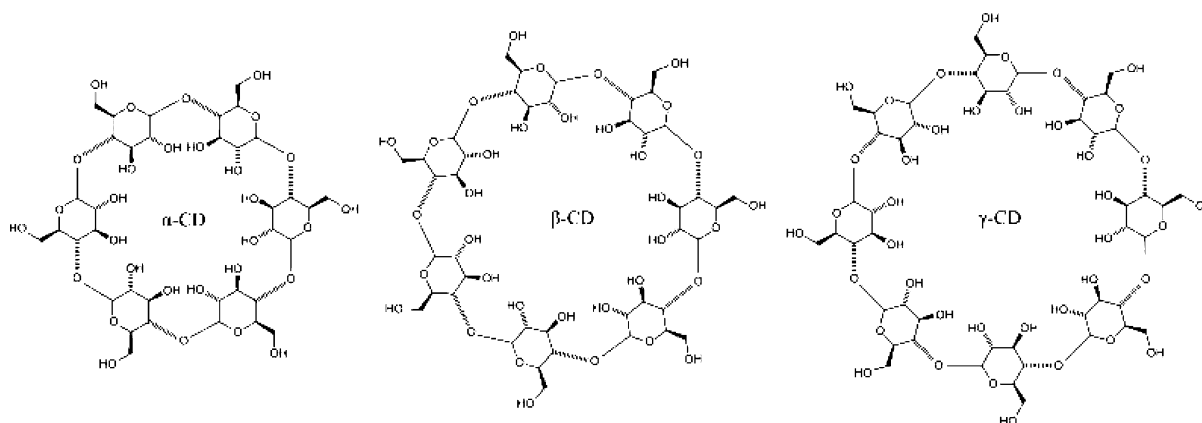


Рис. 1. Структурные формулы циклодекстринов

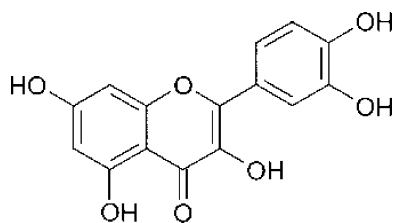


Рис. 2. Структурная формула кверцетина

возможности управления указанным процессом путем введения β -циклодекстрина (ЦД).

Целью данной работы явилось сравнительное изучение кинетики пероксидазного окисления кверцетина в отсутствие и в присутствии β -циклодекстрина.

Экспериментальная часть

Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: пероксидазу из корней хрена (К.Ф. 1.11.1.7), кверцетин, β -циклодекстрин (“Sigma”, США), гидрофосфат аммония, дигидрофосфат аммония, пероксид водорода (“Merck”, Германия), ацетат натрия и уксусную кислоту (“Helicon”).

Растворы пероксидазы готовили растворением навески твердого препарата в фосфатном буферном растворе (рН 7,0). Точную концентрацию пероксидазы устанавливали спектрофотометрически ($\epsilon_{403} = 9,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Кверцетин растворяли в диметилсульфоксиде, “х.ч.” (ДМСО). Для приготовления 1%-го раствора β -циклодекстрина и проведения реакции пероксидазного окисления кверцетина использовали 0,05 М ацетатный буферный раствор с рН 4,5. Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду с электропроводностью не более 18,2 МОм, очищенную на установке “Milipore” (Франция).

Измерение рН буферных растворов проводили на рН-милливольтметре “Эконикс-эксперт” (Россия). Препараты взвешивали на аналитических весах “OHAUS” (Швейцария). Для регистрации спектров поглощения использовали спектрофотометр “UV-mini 1240” (“Shimadzu”, Япония).

Методика эксперимента

Для измерения скорости индикаторной реакции окисления кверцетина, катализируемой пероксидазой из корней хрена, был использован метод тангенсов. Начальную скорость реакции контролировали, регистрируя изменение оптической плотности реакционного раствора при определенной длине волны. Рассчитанный нами молярный коэффициент поглощения продук-

та реакции составил $1,15 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в отсутствие β -циклодекстрина и $1,33 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в его присутствии. При каждой концентрации кверцетина проводили две серии опытов: в присутствии и в отсутствие β -циклодекстрина в реакционной системе.

Для регистрации кинетических кривых ферментативного окисления кверцетина поступали следующим образом: в стеклянную пробирку при комнатной температуре вводили последовательно необходимые количества 0,05 М ацетатного буферного раствора, 1%-го раствора β -циклодекстрина (если необходимо), 10 мкМ раствора фермента, 2 мМ раствора кверцетина в ДМСО и в последнюю очередь 2 М раствора пероксида водорода. В зависимости от эксперимента концентрации компонентов в реакционной смеси варьировали в следующих пределах: 5–100 мкМ кверцетина, 50–500 мкМ пероксида водорода. Общий объем смеси составлял 1 мл. Полученную смесь перемешивали и переносили в кювету для спектрофотометра, в течение 2 мин регистрировали оптическую плотность. Начальную скорость реакции находили по отношению тангенса угла наклона линейного участка кинетической кривой к предварительно определенному молярному коэффициенту поглощения.

Увеличение скорости индикаторной реакции характеризовали отношением разности между скоростями реакции окисления кверцетина в присутствии и в отсутствие β -циклодекстрина к скорости реакции в отсутствие β -циклодекстрина.

Результаты и их обсуждение

Судя по литературным данным, до сих пор точно не описаны продукты пероксидазного окисления кверцетина, однако предложена схема окисления кверцетина в присутствии тирозиназы [8] (рис. 3). Поскольку и тирозиназа, и пероксидаза относятся к классу оксидоредуктаз, можно предположить, что пероксидазное окисление будет приводить к образованию тех же продуктов.

Как видно из представленных на рис. 4 спектров поглощения продуктов пероксидазного окисления кверцетина в присутствии и в отсутствие β -циклодекстрина, изменение оптической плотности наблюдалось при двух длинах волн – 300 и 540 нм. Однако оптическая плотность при 540 нм быстро убывала (что свидетельствовало о дальнейшем превращении продукта), причем изменение поглощения было не столь значительным, как при 300 нм. По этой причине в дальнейших экспериментах скорость реакции контролировали по накоплению продукта, поглощающего при 300 нм, выбрав концентрацию фермента (0,5 нМ), при

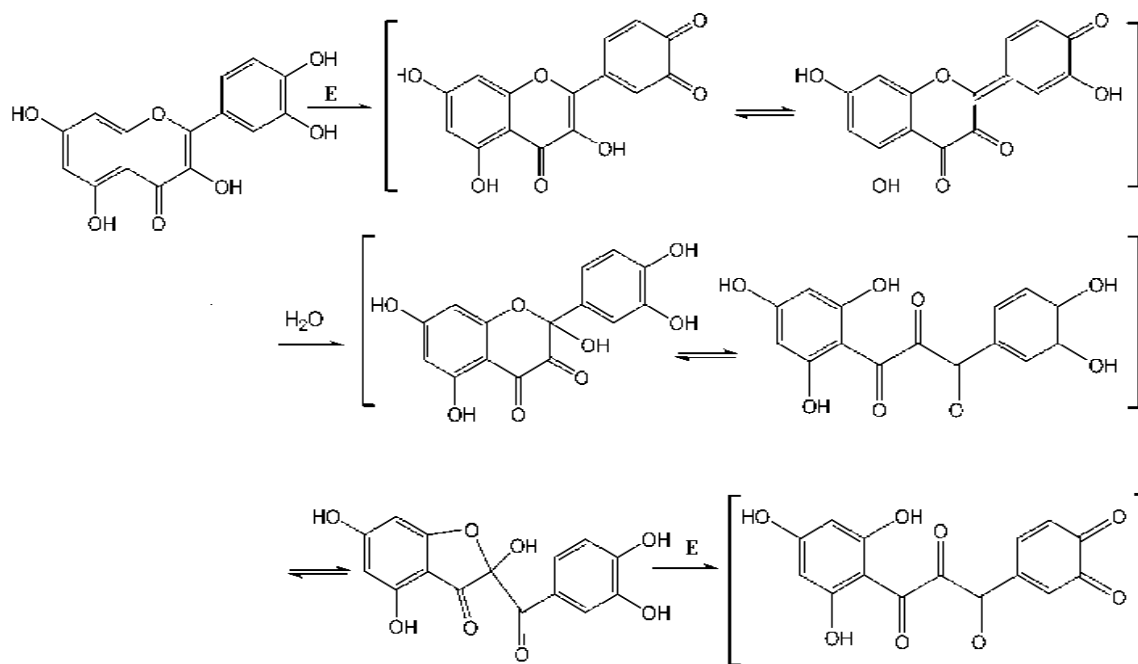


Рис. 3. Схема тирозиназного окисления кверцетина [8]

которой кверцетин в диапазоне концентраций 4–100 мкМ окислялся достаточно быстро, а кинетическая кривая была линейна в течение по крайней мере 30 с после начала реакции, т.е. не менее 15 с после начала регистрации оптической плотности.

Концентрация пероксида водорода была выбрана таким образом, чтобы не менее 20 с после начала регистрации оптических плотностей кинетическая кривая имела линейный характер (100 мкМ).

При постоянной концентрации кверцетина (50 мкМ) изучили зависимость скорости реакции от содержания β-циклодекстрина в диапазоне его концентраций от 0 до 8,35 мМ (соответствует соотношению молярных концентраций ЦД-кверцетин от 0 до 167), при этом в диапазоне молярных концентраций ЦД-кверцетин 10–167 скорость реакции повышалась на 20% по сравнению со скоростью в отсутствие ЦД. При этом увеличение скорости реакции в присутствии β-циклодекстрина по сравнению со скоростью реакции в его отсутствие не было связано с изменением pH раствора, значение которого в обоих процессах было постоянным и составляло 4,5.

Далее изучили зависимость ускорения реакции пероксидазного окисления кверцетина в присутствии β-циклодекстрина от времени инкубации смеси кверцетина и β-циклодекстрина перед введением их в реакционную систему. Предполагали, что если причиной ускорения реакции является образование более реакционноспособного по сравнению со свободным кверцетином комплекса, то скорость реакции должна воз-

растать по мере увеличения времени инкубирования кверцетина с β-циклодекстрином, вследствие увеличения количества комплекса в системе. Однако нами показано отсутствие значимой зависимости скорости реакции от времени инкубации в диапазоне от 0 до 60 мин. Это свидетельствует либо о том, что в этих условиях комплекс образуется мгновенно (что вызывает сомнения, так как в работах [2, 5] для получения комплекса между кверцетином и β-циклодекстрином его компоненты выдерживали в течение длительного времени (например, 60 мин под действием ультразвука [2] или 24 ч [5])), либо о том, что предположение об образовании более реакционноспособного комплекса как причины ускоряющего действия неверно. Для выяснения причины активирующего дей-

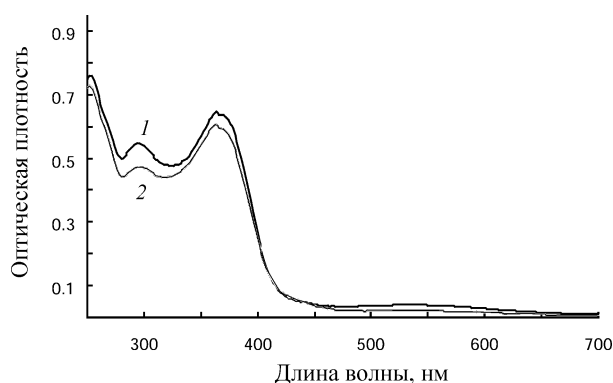


Рис. 4. Спектры поглощения реакционного раствора в присутствии и в отсутствие β-циклодекстрина (фермент 0,5 нМ, кверцетин 50 мкМ, β-циклодекстрин 2 мМ, пероксид водорода 100 мкМ): 1 – в присутствии ЦД, 2 – в отсутствие ЦД

Кинетические параметры реакций ферментативного окисления кверцетина в присутствии и в отсутствие β -циклодекстрина (жирным шрифтом выделены параметры, статистически значимо отличающиеся в отсутствие и в присутствии ЦД)

Параметр	Кинетические параметры относительно кверцетина					
	в отсутствие ЦД			в присутствии ЦД		
$V_{\text{макс}}$, мкМ/с	0,32	±	0,05	0,36	±	0,05
$k_{\text{кат}}^{\text{эф}} \times 10^{-9}$, с ⁻¹	0,64	±	0,10	0,72	±	0,09
K_m , мкМ	8	±	3	11	±	4
$k_{\text{кат}}^{\text{эф}} / K_m \times 10^{-12}$, с ⁻¹ мкМ ⁻¹	84,9	–	–	65,4	–	–
параметр	кинетические параметры относительно пероксида водорода					
	в отсутствие ЦД			в присутствии ЦД		
$V_{\text{макс}}$, мкМ/с	0,45	±	0,03	0,53	±	0,07
$k_{\text{кат}}^{\text{эф}} \times 10^{-9}$, с ⁻¹	0,91	±	0,06	0,11	±	0,02
K_m , мкМ	202	±	32	186	±	62
$k_{\text{кат}}^{\text{эф}} / K_m \times 10^{-12}$, с ⁻¹ мкМ ⁻¹	4,5	–	–	5,7	–	–

Примечание. Для расчета $k_{\text{кат}}^{\text{эф}}$ было принято, что концентрация пероксидазы хрена может быть определена по поглощению ее раствора при 403 нм.

ствия β -циклодекстрина сравнили кинетические параметры окисления кверцетина в отсутствие и в присутствии ЦД. Ферментативные реакции окисления кверцетина пероксидом водорода являются двусубстратными. В частности, для многих процессов окисления фенольных соединений (к которым можно отнести и кверцетин) наиболее корректным считается использование кинетической схемы “пинг-понг”, которая подходит и к данному случаю. Однако попытка рассчитать кинетические параметры этой реакции по указанной схеме с использованием алгоритма расчета, приведенного в [9], привела к абсурдным результатам. По-видимому, причиной является то, что ряд допущений относительно соотношения констант скоростей отдельных стадий и концентраций компонентов реакции, принятых в [9] для получения числовых значений кинетических параметров, неприменим для изучаемой системы. Поэтому для оценки кинетических параметров решили использовать классическую схему Михаэлиса–Ментен для односубстратных процессов, поскольку при фиксированной концентрации одного из субстратов (в идеальном случае – при насыщающей концентрации одного из субстратов; однако такие условия зачастую невыполнимы в реальных условиях вследствие ингибирования фермента большими концентрациями субстрата) ско-

рость процесса можно считать зависящей только от концентрации одного из субстратов [10]. При этом рассчитанные по этой схеме величины K_m и $V_{\text{макс}}$ корректнее считать кажущимися величинами, поскольку истинные значения этих показателей рассчитывают для односубстратных реакций.

Для расчета кинетических параметров пероксидазного окисления кверцетина исследовали зависимость скорости реакции от его концентрации при фиксированной концентрации пероксида водорода, а также зависимость скорости реакции от концентрации пероксида водорода при фиксированной концентрации кверцетина. По полученным данным для реакций, проведенных как в присутствии, так и в отсутствие β -циклодекстрина, рассчитали кинетические параметры реакции (кажущиеся K_m , $V_{\text{макс}}$, $k_{\text{кат}}^{\text{эф}}$, $k_{\text{кат}}^{\text{эф}}/K_m$), значения которых представлены в таблице. Выявили, что максимальная скорость и константа Михаэлиса, рассчитанные при варьировании концентрации пероксида водорода при введении β -циклодекстрина, не меняется значимо. Это служит подтверждением того, что увеличение скорости процесса не связано с влиянием β -циклодекстрина на основной субстрат пероксидазы. В присутствии β -циклодекстрина возрастает максимальная скорость индикаторной реакции, рассчитанная при варьировании концентрации

кверцетина, и соответственно возрастает константа Михаэлиса относительно кверцетина, что представляется естественным, поскольку она отражает концентрацию субстрата, необходимую для достижения скорости, в два раза меньшей максимальной. Специфичность связывания субстратов, которую характеризуют отношением $k_{\text{кат}}/K_m$, мало изменялась при введении β -циклодекстрина. Это свидетельствует, по-видимому, о том, что β -циклодекстрин не связывается ни с субстратами реакции, ни с самим ферментом. В связи с этим расчет константы активации в данном случае представляется нецелесообразным. Учитывая, что скорость реакции не меняется значительно при варьировании времени выдерживания кверцетина и β -циклодекстрина перед введением их в реакцию, можно предположить, что причиной ускоряющего действия β -цик-

лодекстрина в изучаемой реакции является неспецифическое связывание молекулы-рецептора с продуктом окисления кверцетина. Ранее на подобный эффект указывали в работе [11] для ряда процессов с участием ферментов. В отличие от авторов [2], наблюдавших ингибирование β -циклодекстрином пероксидазного окисления кверцетина при длительном совместном выдерживании (60 мин) флавоноида с олигосахаридом под действием ультразвука, мы показали, что при непосредственном введении в реакцию окисления β -циклодекстрина последний ускоряет процесс. Это, очевидно, связано с тем, что во время протекания ферментативной реакции кверцетин не внедряется в полость β -циклодекстрина, а, по-видимому, лишь неспецифически взаимодействует с продуктом окисления флавоноида.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект № 09-03-00823-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trotta F., Ferrari R.P., Laurenti E., Moraglio G., Trossi A. // J. Incl. Ph. Mol. Recognition Chem. 1996. **25**. P. 225.
2. Lucas-Abellan C., Fortea I., Gabaldyn J.A., Nьсез-Delicado E. // J. Agric. Food Chem. 2007. **56**. P. 255.
3. Chen J.B., Xia C.G., Li S.B. // Chinese Chem. Lett. 2000. **11**. P. 721.
4. Reihmann M.H., Ritter H. // Macromol. Chem. Phys. 2000. **201**. P. 798.
5. Koontz J.L., Marcy J.E., O'Keefe S.F., Duncan S.E. // J. Agric. Food Chem. 2009. **57**. P. 1162.
6. Borghetti G.S., Lula I.S., Sinisterra R.D., Bassani V.L. // Am. Ass. Pharm. Sci. 2009. **10**. P. 235.
7. Zheng Y., Haworth I.S., Zuo Z., Chow M. S.S., Chow A.H.L. // J. Pharm. Sci. 2005. **94**. P. 1079.
8. Kubo K., Nihei K., Shimizu K. // Bio. Med. Chem. 2004. **12**. P. 5343.
9. Garsia-Moreno M., Moreno-Conesa M., Rodrigues-Lypez J.N., Garsia-Canovas F., Varyn R. // Biol. Chem. 1999. **380**. P. 689.
10. Copeland R.A. Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. Wiley, 2000.
11. Villalonga R., Cao R., Fragoso A. // Chem. Rev. 2007. **107**. P. 3088.

Поступила в редакцию 01.04.2010.

KINETICS OF QUERCETIN OXIDATION CATALYZED BY HORSERADISH PEROXIDASE IN THE PRESENCE OF β -CYCLODEXTRIN

L.I. Oleynik, T.S. Buslova, I.A. Veselova, T.N. Shekhovtsova

(Division of Analytical Chemistry)

The rate of quercetin oxidation catalyzed by horseradish peroxidase was found to increase by 20% in the presence of macrocyclic complexing agent β -cyclodextrin. The comparison of the kinetic parameters of this reaction in the presence and in the absence of β -cyclodextrin showed that the introduction of β -cyclodextrin did not influence significantly the specificity of the enzyme towards the reducing substrate (estimated as k_{cat}/K_m ratio). At the same time, the reaction rate did not depend on the time of incubation of quercetin and β -cyclodextrin. The increase of the reaction rate was supposed to be associated with non-specific interaction between β -cyclodextrin and the product of quercetin oxidation.

Key words: horseradish peroxidase; cyclodextrin; quercetin.

Сведения об авторах: Олейник Любовь Игоревна – аспирант химического факультета МГУ (loleynk@mail.ru); Буслова Татьяна Сергеевна – студентка химического факультета МГУ (tanyabuslova@gmail.com); Веселова Ирина Анатольевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (irina.veselova@mail.ru); Шеховцова Татьяна Николаевна – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (tnshekh@yandex.ru).