

## Литература

1. Лагоненко А. Л., Песнякевич А. Г., Николайчик Е. А. Плейотропный эффект мутации в гене *pelW* бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 JN5084 // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия: Тез. докл. конф. Минск, 2002. С.137.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 440 с.
3. Скобляков С.А., Лагоненко А.Л., Мямин В.Е., Песнякевич А.Г., Николайчик Е.А. Влияние мутаций в генах *pelW* и *kdgR* на продукцию пектатлиаз у *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Вестн. Белорус. ун-та. 2004. (в печати).
4. Ausubel F. A., Brent R., Kingston R. F., Moore D. D., Seidman I. G., Smith J. A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. N. Y., 1992.
5. Barras F., Gijsegem F., Chatterjee A. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia* // Annu. Rev. Phytopathol. 1994. Vol. 32. P. 201–234.
6. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* // Annu. Rev. Microbiol. 1996. Vol. 50. P. 213–257.
7. Liu Y., Jiang G., Cui Y., Mukherjee A., Ma W. L., Chatterjee A.K. *kdgR<sub>Ecc</sub>* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, harpin<sub>Ecc</sub> and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 2411–2422.
8. de Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria // Journal of Bacteriology. 1990. Vol. 172. P. 6568–6572.
9. Metcalf W., Jiang W., Wanner B. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
10. Quandt J., Hynes M. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria // Gene. 1993. Vol. 127. P. 15–21.
11. Sala-Trepat J., Evans W. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species // Eur. J. Biochem. 1971. Vol. 20. P. 400–413.

## АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЛАВОНОЛОВ

Е. А. Ледак, В. В. Сенчук

Флавонолы – это распространенные полифенольные биологически активные соединения растений, они являются природными антиоксидантами, входят в состав многочисленных биологически активных добавок к пище и лекарственных препаратов [1]. Флавонолы фармакологически активны, обладают Р-витаминными, ангиопротекторными, антирадикальными свойствами [2].

Кверцетин и физетин (5-дезоксикверцетин) являются структурно родственными соединениями, отличающимися только по гидроксилу в С5-положении кольца А. Оба флавонола обладают системой сопряжённых двойных связей, а, следовательно, способностью к перераспределению

электронной плотности внутри молекулы и формированию метиленхиноидных структур. Установлено, что флавонолы могут эффективно окисляться по пероксидазному механизму [7, 8].

Целью работы было установление спектра продуктов пероксидазного окисления природных флавонолов кверцетина и физетина методом HPLC-анализа и их сравнительный анализ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали пероксидазу из хрена (ПХ; КФ 1.11.1.7) с  $R_z=3,0$  производства «Sigma» (США). Концентрацию ПХ определяли спектрофотометрически, используя  $\epsilon_{403}=102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [3], а концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  спектрофотометрически с использованием  $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [4].

Условия проведения ферментативной реакции окисления кверцетина и физетина в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  описаны ранее [5].

HPLC анализ продуктов пероксидазного окисления флавонолов. В ходе реакции реакции пероксидазного окисления флавонолов отбирали пробы объемом 10 мкл и анализировали хроматографически на колонке Allure C-18 (150 x 4,6 мм; 5  $\mu\text{m}$ , 60 ангстрем) фирмы «Restec» в HPLC хроматографе «Shimadzu LCMS-QP8000α». Условия хроматографического анализа: 0,1% TFA; элюция в линейном градиенте 5 – 30 % ацетонитрила в течении 18 мин, изократическая элюция 30 % ацетонитрилом, элюция в градиенте 30 – 40 % ацетонитрила с 20 по 25 мин, элюция в градиенте 40 – 60 % ацетонитрила с 25 по 28 мин, элюция в градиенте 60 – 100 % ацетонитрила с 28 по 30 мин, изократическая элюция 100 % ацетонитрилом с 30 по 40 мин [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в ходе пероксидазного окисления двух изученных флавонолов появляется ряд продуктов, как более, так и менее гидрофобных, чем исходные субстраты.

При глубоком пероксидазном окислении обоих изученных субстратов происходит накопление более гидрофильных продуктов, спектр поглощения которых соответствует простым фенольным соединениям, очевидно, гидроксibenзойным кислотам (рис. 1в, 2в).

Для более детального изучения динамики накопления различных продуктов в ходе реакции был использован следующий подход: при недостатке  $\text{H}_2\text{O}_2$  происходит частичное окисление флавонола в соответствии со стехиометрическим коэффициентом, вплоть до полного исчерпания  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Таким образом, можно зафиксировать промежуточное состояние окисления и продукты реакции. При этом на хроматограмме отчетливо

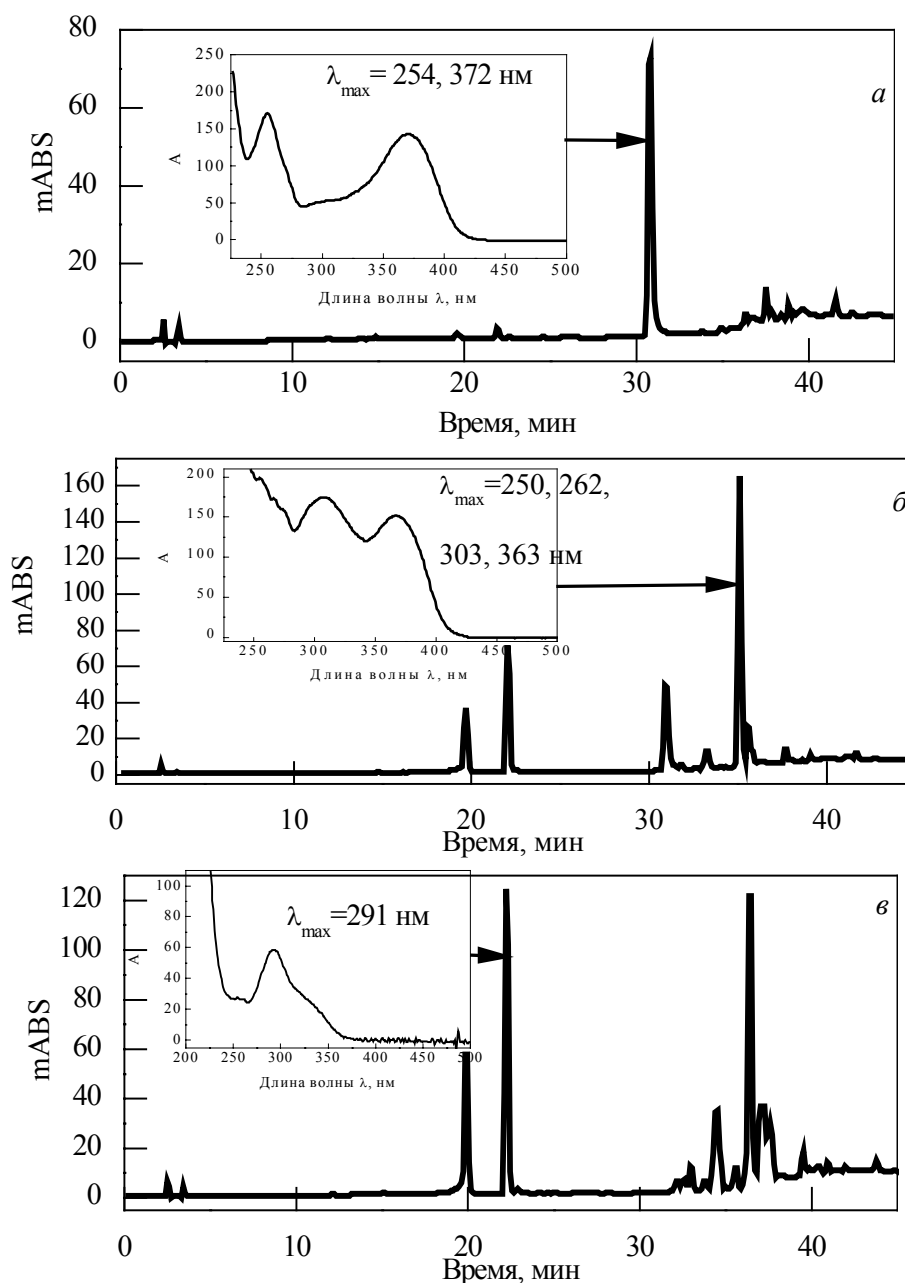


Рис. 1. HPLC-хроматограммы анализа кверцетина (а) и разделения продуктов пероксидазной реакции окисления кверцетина при различных соотношениях пероксида водорода и кверцетина: б – при соотношении 0,5:1, в – при соотношении 1:1. На вставках показаны UV-VIS спектры поглощения кверцетина (а), метилехинонового продукта окисления кверцетина (б) и гидроксibenзойных кислот (в)

виден пик более гидрофобного продукта, характерного для обоих субстратов, спектр которого соответствует сложному фенольному соединению, как мы предполагаем – метилехинону соответствующего субстрата (рис. 1б, 2б).

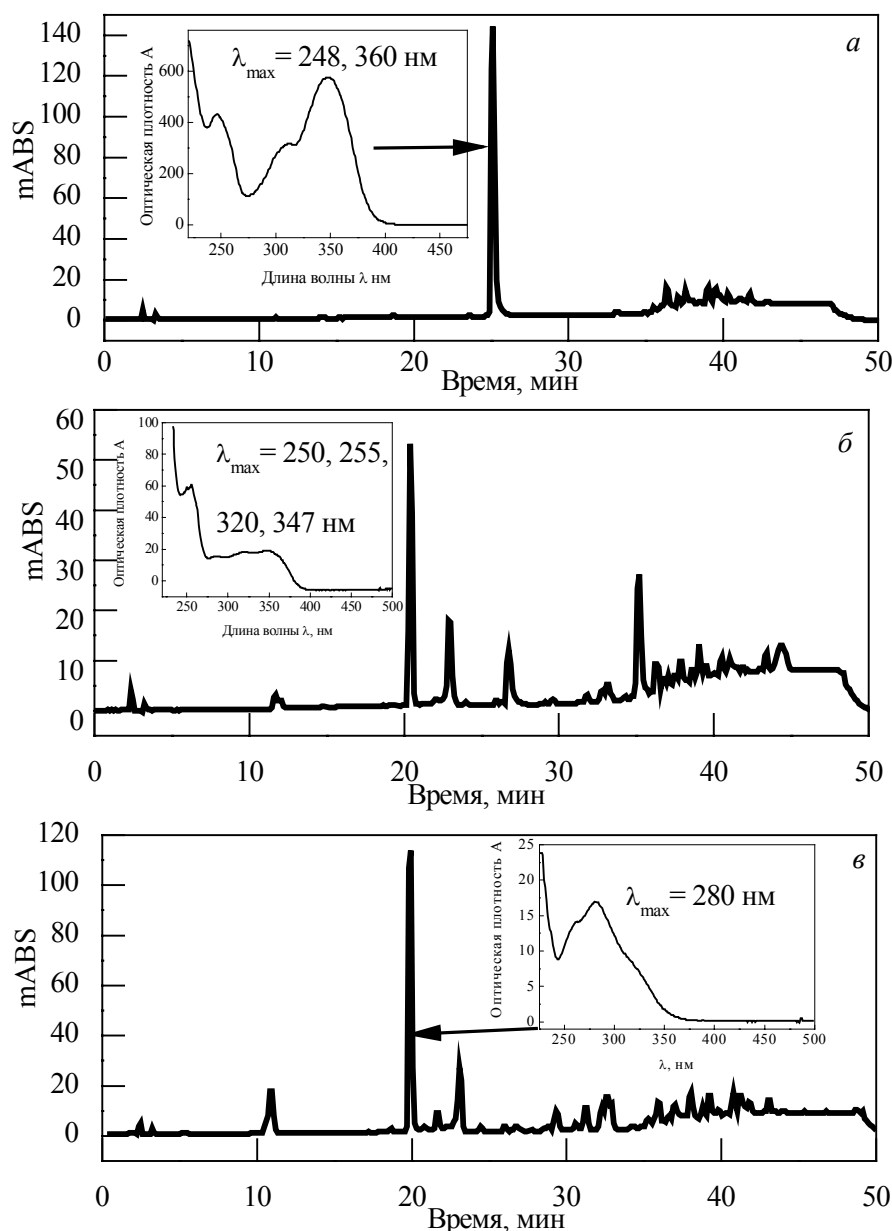


Рис. 2. HPLC-хроматограммы анализа физетина (а) и разделения продуктов пероксидазной реакции окисления кверцетина при различных соотношениях пероксида водорода и физетина: б – при соотношении 0,5:1, в – при соотношении 1:1. На вставках показаны UV-VIS спектры поглощения физетина (а), метилехинонового продукта окисления физетина (б) и гидроксibenзойных кислот (в)

Если рассматривать процесс пероксидазного окисления кверцетина и физетина в динамике, то можно отметить следующее: по нашему мнению, сначала происходит переход молекулы флавонола в хиноидную форму, а затем разрыв молекулы на простые фенольные соединения, что подтверждается данными хроматограмм (рис. 1, 2). Таким образом, результаты работы показывают, что наличие гидроксила при С5 в фенил-

хромановой структуре флавонолов не существенно сказывается как на характере, так и на интенсивности пероксидазного окисления [7].

### Литература

1. The Flavonoids: advances in research / Ed. *Harborne J. B.* L.-N.Y. 1988.
2. *Cody V., Middleton E., and Harborne J. B.*, eds Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological and Structure-Activity Relationships, A.R. Liss, New York, 1986.
3. *Schonbaum, G. R., Lo, S.* // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 3353.
4. Справочник химика / Под ред. *Никольского Б. П.* Т. 4. Химия.: Л-д. 1967.
5. *Ледак Е. А., Сенчук В. В.* Окисление дигидроксибензолов тиреоидпероксидазой человека // Вестн. Белорус. ун-та. Сер.2. 2002. N2. С. 18.
6. *Awad H. M., Boersma M.G., Vervoort J., and Rietjens I.M.C.M.* Peroxidase-Catalysed Formation of Quercetin Quinone Methide Glutathione Adducts // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2000. Vol. 378. N 2. P. 224–233.
7. *Ледак Е. А., Сенчук В. В.* Окисление ряда флавонолов пероксидазой из хрена // Вестн. Белорус. ун-та. Сер.2. 2003. N 1. С. 30.
8. *Shreier P., Miller E.* Studies on Flavonol Degradation by Peroxidase (Donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreductase, EC 1.11.1.7): Part 2 – Quercetin // Food Chemistry. 1985.Vol. 18. P. 301–317.