



УДК 541.128; 577.150.2; 577.158.7

АКТИВАЦИЯ ЭТИЛЕНДИАМИНОМ КАТАЛАЗНОЙ ФУНКЦИИ
ГЕМАТИНА*Шежецкий В. С., Ярославов А. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Обнаружен сокаталитический эффект этилендиамина (ЭДА), превышающий два порядка, в реакции разложения H_2O_2 , катализируемой гематином в водных растворах. Бутиламин, имидазол, а также гистамин не являются сокатализаторами при разложении H_2O_2 на гематине. Из УФ-спектров установлено, что образование гематином комплексов с указанными выше аминами сопровождается его деполимеризацией. Установлено, что в активном центре катализатора необходимо присутствие одной молекулы ЭДА на 1 моль гематина, причем гематин может находиться в димерной форме. Предложен механизм процесса, включающий последовательное присоединение к комплексу гематин — ЭДА иона HO_2^- молекулы H_2O_2 . Промежуточный комплекс гематин — ЭДА · HO_2^- · H_2O_2 распадается с константой скорости $5 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$. Предполагается, что активирующая роль ЭДА в каталазной функции гематина состоит в донорном взаимодействии с молекулой H_2O_2 , которое способствует переносу протона и гидрид иона от одной молекулы субстрата к другой. Наблюдаемый эффект активации каталазной функции гематина ЭДА подтверждает гипотезу Джонса и Саджета об участии кислотно-основных групп апофермента в разложении H_2O_2 каталазой.

Привлекает внимание возможность построения синтетических катализаторов, моделирующих действие ферментов, с использованием фрагментов активных центров ферментов или сходных с ними соединений. Такого рода соединением, входящим в состав активных центров ряда окислительно-восстановительных ферментов (каталаза, пероксидаза, цитохром с и др.), является гематин. Однако некоторые попытки применить гематин в различных формах — в виде комплексов или сорбированном состоянии — для осуществления каталитических эффектов показали, что его каталитическая активность, например в каталазной реакции, мала и не может быть сравнима с активностью фермента [1—4]. Как было показано ранее [5—6], ЭДА ускоряет процесс разложения H_2O_2 на синтетических полимерных катализаторах, активные центры которых построены из ионов Fe^{3+} , связанных в комплексы с поликислотами (полиакриловой (ПАК) и полиметакриловой) и 1,2-диаминами. Эти катализаторы в какой-то мере моделируют действие каталазы. Активирующее действие ЭДА, по-видимому, обусловлено образованием промежуточного комплекса Fe^{3+} — ПАК — ЭДА — H_2O_2 , в котором происходит активация H_2O_2 [6].

Для выяснения, можно ли этот эффект использовать для активации разложения H_2O_2 на гематине, мы исследовали влияние ЭДА и других аминов на скорость разложения H_2O_2 гематином в водных растворах.

В табл. 1 представлены результаты измерения скорости каталазной реакции ряда каталитических систем, включающих гематин и некоторые амины. В 100 и 10 раз более активны, чем другие системы, катализаторы

Каталитические активности комплексов гематина

Концентрация реагентов, М: гематин $1,5 \cdot 10^{-5}$, H_2O_2 $5 \cdot 10^{-2}$, амины 10^{-1} , поливиниламин 0,88; 21°C

Каталитическая система	Число актов реакции s^{-1}	pH	Каталитическая система	Число актов реакции s^{-1}	pH
Гематин	1,9	8,0	Гематин — гистамин	11,4	10,0
Гематин	4,3	10,5	Гематин — ЭДА	930,0	10,2
Гематин — бутиламин	10,1	10,5	Гематин — поливинил-амин	95,0	10,0
Гематин — имидазол	8,8	10,5			

Таблица 2

Константы комплексообразования в системе гематин — амин

Комплекс	K' , M^{-1}	pH	Комплекс	K' , M^{-1}	pH
Гематин — (бутиламин) ₂	4	10,5	Гематин — (имидазол) ₂	$4 \cdot 10^2$	8,0
Гематин — (ЭДА) ₂	4	8,0	Гематин — (имидазол) ₂	$4,7 \cdot 10^2$	10,5
Гематин — (ЭДА) ₂	4	10,5	Гематин — (гистамин) ₂	$2,3 \cdot 10$	10,5

ры 6 и 7, в состав которых, кроме гематина, входят соответственно 1,2-диамин и 1,3-полпамин.

Для выяснения причин ускорения реакции разложения H_2O_2 в присутствии этих катализаторов по сравнению с другими аминами было исследовано взаимодействие гематина с указанными выше аминами методом УФ-спектроскопии.

Ультрафиолетовые спектры комплексов гематина с аминами. На рис. 1, а — в приведены УФ-спектры гематина в присутствии ЭДА соответственно при pH 6,0; 8,0 и 10,5. Если при pH 6,0 увеличение концентрации амина не приводит к заметным изменениям в спектре, то при pH 8,0 и 10,5 наблюдается сдвиг максимума поглощения гематина с 393 до 408 нм и возрастание оптической плотности с ростом концентрации ЭДА. Максимум поглощения при 408 нм характеризует переход гематина из полимерной и димерной форм в мономерную, которая представляет собой комплекс гематина с амином состава 1 : 2 [7]. При pH 6,0, когда обе аминогруппы ЭДА протонированы практически нацело, он не взаимодействует с гематином. Комплексы образуют лишь молекулы, в которых одна или две аминогруппы непротонированы (pK_1 7,0; pK_2 10,0) (рис. 1, б и в). Эти результаты указывают на то, что в образовании координационных связей между ионом Fe^{3+} и атомом азота участвует неподеленная пара электронов последнего. Спектр комплекса гематин — бутиламин полностью идентичен спектру комплекса гематин — ЭДА. Исходя из этого факта, а также из того, что вид спектра комплекса гематин — ЭДА не изменяется в широком интервале степени депротонизации ЭДА, можно считать, что в комплексе гематин — ЭДА ион железа связан с одной аминогруппой диамина. Иной вид имеют УФ-спектры комплексов гематин — имидазол (рис. 2). При относительно небольшой концентрации имидазола (10^{-1} М) вид спектра одинаков для pH 8,0 (рис. 2, а, кривая 3) и 10,5 (рис. 2, б, кривая 4): спектр имеет два максимума с λ 408 и 432 нм, кроме того, в более длинноволновой области появляются еще два максимума при 544 и 568 нм, обладающие меньшими коэффициентами поглощения, чем первые. Следует отметить, что при pH 10,5 образование комплексов гематин — имидазол происходит за несколько минут (рис. 2, б,

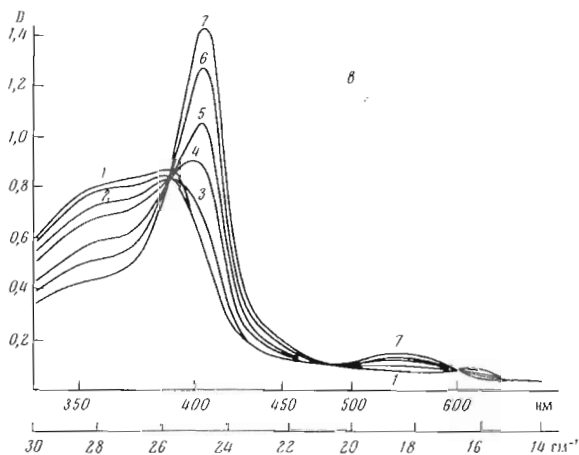
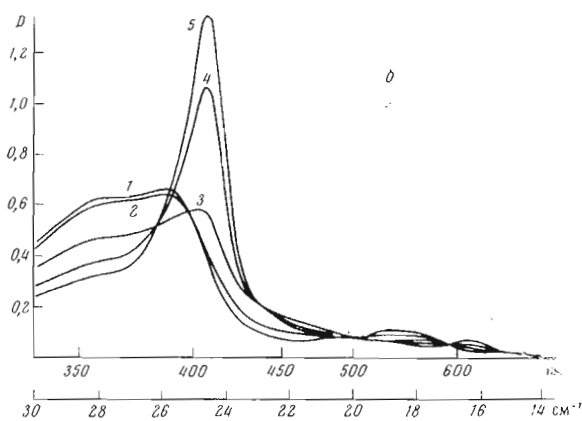
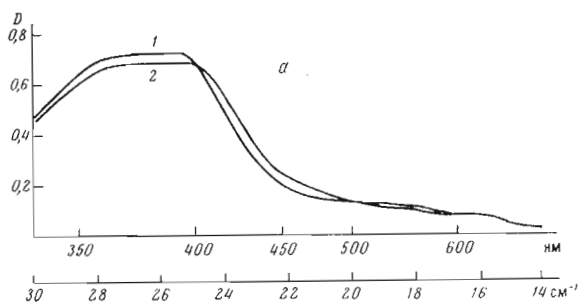


Рис. 1. УФ-спектры гематина в присутствии ЭДА ([гематин] $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, 23°): а — рН 6,0 [ЭДА]; 1 — 0; 2 — $1,0$ М; б — рН 8,0 [ЭДА]; 1 — 0; 2 — 10^{-2} ; 3 — 10^{-1} ; 4 — $4 \cdot 10^{-1}$; 5 — $1,0$ М; в — рН 10,5 [ЭДА]; 1 — 0; 2 — 10^{-2} ; 3 — 10^{-1} ; 4 — $2 \cdot 10^{-1}$; 5 — $3 \cdot 10^{-1}$; 6 — $5 \cdot 10^{-1}$; 7 — $1,0$ М

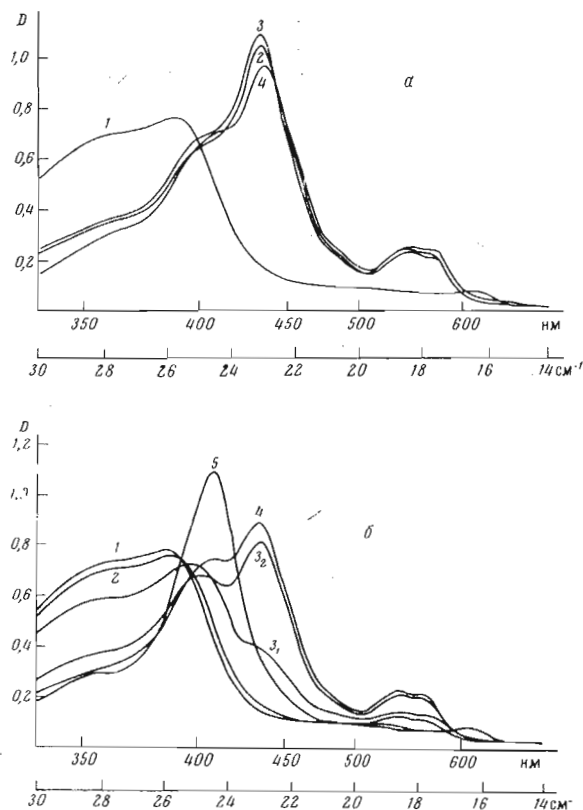


Рис. 2. УФ-спектры гематина в присутствии имидазола ([гематин] $1,5 \cdot 10^{-6}$ М, 23°): а — рН 8,0 [имидазол]; 1 — 0; 2 — 10^{-2} ; 3 — 10^{-1} ; 4 — 1,9 М; б — рН 10,5 [имидазол]; 1 — 0; 2 — 10^{-2} ; 3₁ и 3₂ — $3 \cdot 10^{-2}$ (спектры 3₁ и 3₂ записаны соответственно через 1 и 12 мин); 4 — $3 \cdot 10^{-1}$; 5 — 2,0 М

кривые 3₁ — 3₂), в то время как при рН 8,0 первоначальный вид спектра исследуемого комплекса не изменяется во времени, т. е. комплекс образуется менее чем за 1 мин. Это различие в кинетике комплексообразования может быть обусловлено возросшей (при рН 10,5) конкуренцией за место в координационной сфере Fe^{3+} со стороны иона гидроксила, концентрация которого увеличилась с 10^{-6} до $3,16 \cdot 10^{-1}$ М. При значительных концентрациях имидазола (2М) и при рН 10,5 образуются комплексы, спектр которых имеет лишь одну полосу поглощения при λ 408 нм, полоса поглощения при λ 432 нм исчезает (рис. 2, б, кривая 5). Этот спектр не отличается от спектров комплекса гематин — ЭДА. Возможно, что наблюдаемая трансформация спектра связана с переходом комплекса гематин — имидазол в комплекс гематин — имидазолий в условиях, когда концентрация аниона имидазола становится равной $2,1 \cdot 10^{-3}$ М. Принимая во внимание нуклеофильность имидазолия, значительно превосходящую нуклеофильность имидазола, а также наличие заряда, противоположного по знаку заряду комплекса феррипорфирина, переход комплекса гематин — имидазол в комплекс гематин — имидазолий весьма вероятен.

Спектры гематина в присутствии гистамина полностью повторяют спектры комплексов гематин — бутиламин, гематин — ЭДА. Это свидетельствует, во-первых, об образовании мономерного гематина, связанного с двумя молекулами гистамина, и, во-вторых, указывает на взаимодействие металла с первичной аминогруппой, а не с имидазольным остатком.

Взаимодействие гематина с поливиниламином показывает, что в системе отсутствуют мономерные комплексы и доминируют комплексы, в кото-

рые гематин входит в виде олигомеров или димеров. Это следует из отсутствия максимума поглощения при λ 408 нм, присущего мономерному состоянию гематина, и появления полосы поглощения при λ 403 нм со значительно более низким значением коэффициента экстинкции [7].

Следует отметить, что гематин утрачивает способность к комплексообразованию с аминами в присутствии различных анионов и, в частности, анионов хлора.

Константы комплексообразования аминов с гематином были рассчитаны по пику поглощения мономерного гематина (λ 408 нм), исходя из зависимости оптической плотности от концентрации депротонированного амина. Мономерный гематин образуется в результате присоединения двух молекул амина по 5 и 6 местам координационной сферы [8]. Поэтому поглощение при λ 408 нм отражает присоединение второй молекулы ЭДА к димерному комплексу гематин — ЭДА (K''). Присоединение одной молекулы ЭДА к гематину, по-видимому, не сопровождается значительными изменениями в УФ-спектрах, а приводит лишь к небольшому смещению полосы Сорс от 393 к 403 нм, без повышения оптической плотности (ср. на рис. 2, б кривые 1 и 3₁).

Значения константы K'' для исследованных комплексов приведены в табл. 2. Для комплексов гематин — диамины величина константы не зависит от того, одна или обе аминогруппы депротонированы, что подтверждает установленный из спектров факт об участии в комплексообразовании только одной из двух аминогрупп. Обращает на себя внимание значительно более слабая связывающая способность ЭДА по сравнению с другими аминами и, в частности, с гистамином, что находится в обратной зависимости от каталитической активности этих комплексов.

Кинетика разложения H_2O_2 на комплексе гематин — ЭДА. Было важно выяснить, не сопровождается ли каталитическое разложение H_2O_2 на комплексе гематин — ЭДА побочными реакциями, в частности пероксидазным окислением ЭДА. На рис. 3 приведены кинетические кривые каталазного разложения H_2O_2 на данном катализаторе, полученные при последовательном добавлении к катализатору исходной концентрации H_2O_2 после ее полного исчерпания в предыдущем реакционном цикле. Видно, что H_2O_2 полностью превращается в O_2 и H_2O и, следовательно, не расходуется на окисление амина, хотя активность катализатора от цикла к циклу (кривые 1—4) понижается. По числу превращенных молекул H_2O_2 (превышающем 10^4) на каждом активном центре можно судить об устойчивости данного комплекса в реакционной среде.

На рис. 4 представлена зависимость начальной скорости разложения H_2O_2 от концентрации ЭДА. Своего максимального значения скорость реакции достигает при концентрации ЭДА 0,1 М и уменьшается при дальнейшем увеличении концентрации амина. Вместе с тем анализ УФ-спектров гематина в присутствии ЭДА (рис. 1, в, кривая 3) показывает, что при концентрации ЭДА 0,1 М образуются преимущественно димерные комплексы гематина, в которых соотношение гематина и связанного с ним ЭДА 1 : 1. Дальнейшее увеличение концентрации ЭДА в системе, приводящее к завершению деполимеризации гематина и образованию мономерных комплексов гематин — ЭДА (1 : 2), уменьшает скорость разложения H_2O_2 . Эти результаты указывают на ступенчатый механизм присоединения аминов к гематину и позволяют сделать вывод о том, что наиболее активными в каталазной реакции являются комплексы гематин — ЭДА состава 1 : 1. Из зависимости, представленной на рис. 4, рассчитали константу (K') образования этих комплексов, которая оказалась равной 47. Характерно, что такое же значение константы связывания второй молекулы ЭДА получено нами и в случае комплекса Fe^{3+} — ПАК — $(ЭДА)_2$, что коррелирует с близкими величинами активностей обоих комплексов в каталазной реакции.

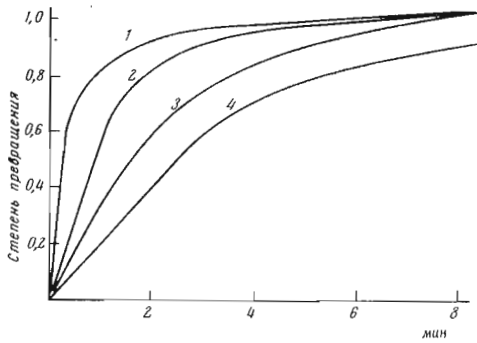


Рис. 3. Повторяющиеся каталитические циклы разложения H_2O_2 на гематине в присутствии ЭДА (газомеретрическая методика): 1—4 порядок циклов. Концентрация реагентов: [гематин] — $1,5 \cdot 10^{-6}$; ЭДА — 10^{-1} ; H_2O_2 — 10^{-1} М; рН 10,5; 21°C

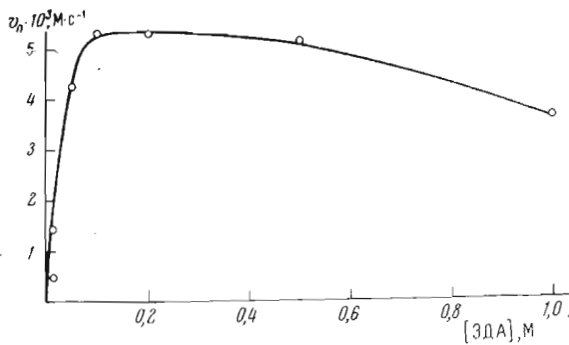


Рис. 4. Зависимость скорости разложения H_2O_2 на комплексе гематин — ЭДА от концентрации ЭДА. Концентрация реагентов: гематин — $1,5 \cdot 10^{-6}$; H_2O_2 — $5 \cdot 10^{-2}$ М; рН 10,5; 21°C

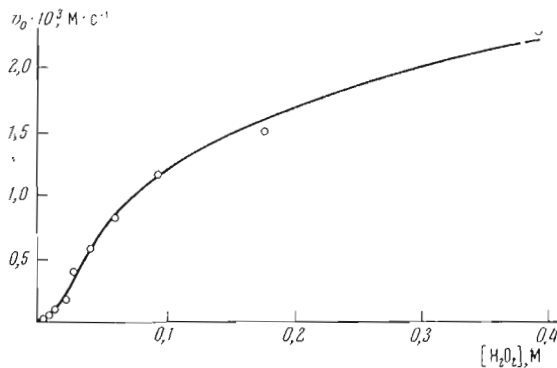


Рис. 5. Зависимость скорости разложения H_2O_2 на комплексе гематин — ЭДА от концентрации H_2O_2 . Концентрация реагентов: гематин — $2 \cdot 10^{-6}$; ЭДА — $2 \cdot 10^{-2}$ М; рН 10,2; 21°C

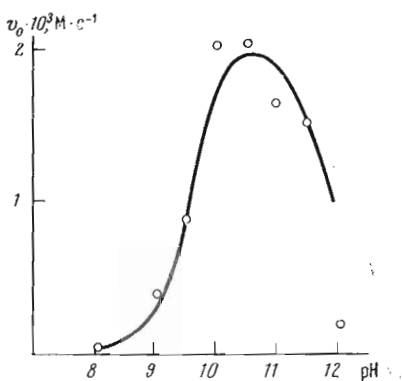


Рис. 6

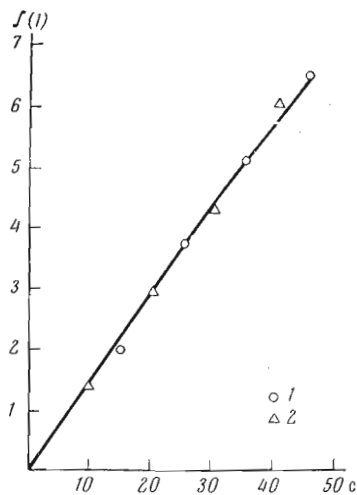


Рис. 7

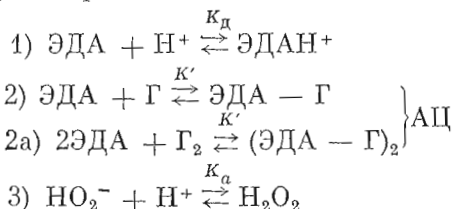
Рис. 6. Зависимость скорости разложения H_2O_2 на комплексе гематин — ЭДА от pH. Концентрация реагентов: Γ — $3 \cdot 10^{-6}$; ЭДА — $9,4 \cdot 10^{-2}$; H_2O_2 — $5,4 \cdot 10^{-2}$ М; 21° . \circ — экспериментальные точки; — зависимость, вычисленная по уравнению (1)

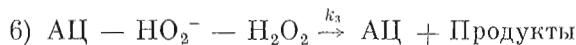
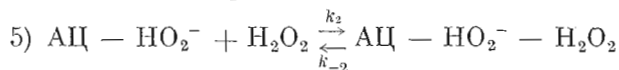
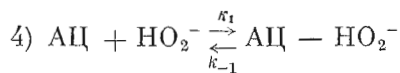
Рис. 7. Кинетические кривые разложения H_2O_2 на комплексе гематин — ЭДА в координатах \int (1), рассчитанных по формуле (2) (pH 10,2; 21°). Концентрация реагентов: гематин — $2 \cdot 10^{-6}$; ЭДА — $2 \cdot 10^{-2}$ М; 1 — H_2O_2 — $4 \cdot 10^{-2}$, 2 — $5,8 \cdot 10^{-2}$ М

На рис. 5 представлена зависимость скорости реакции от концентрации H_2O_2 . При малых концентрациях H_2O_2 порядок реакции по H_2O_2 больше первого и при больших концентрациях меньше первого. Такая зависимость скорости от концентрации субстрата характерна для реакций, идущих по стадийному механизму.

Зависимость скорости реакции от pH, изображенная на рис. 6, достигает максимума в области pH 10,0—10,5, т. е. там, где степень депротонизации ЭДА 0,5—0,75 и степень депротонизации H_2O_2 0,02—0,06 (pK_a 11,7). Экстремальный вид pH зависимости может быть обусловлен участием в реакции иона HO_2^- и недиссоциированной молекулы H_2O_2 . Однако различие в значениях элементарных констант присоединения этих частиц к активному центру вызывает сдвиг максимума скорости от значения pH, равного $pK_a \text{H}_2\text{O}_2$, до pH 10,3. Вместе с тем совпадение значения pH, при котором достигается максимум скорости реакции, с pK_a второй аминогруппы в молекуле ЭДА не противоречит тому, что комплексно не связанная аминогруппа ЭДА, наряду с ионами Fe^{3+} гематина, может принимать участие в одной из элементарных стадий каталитического акта. Можно предположить, что свободная аминогруппа ЭДА взаимодействует с молекулой H_2O_2 через неподеленную пару электронов атома азота. В согласии с этим предположением скорость реакции достигает максимума, когда равновесие $\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$ сдвинуто вправо, т. е. как раз при значениях pH 9—11.

Кинетическая схема каталазного процесса, учитывающая все описанные выше кислотно-основные равновесия и кинетические стадии, выглядит следующим образом:





где Г — гематин и АЦ — активный центр.

Предположив, что равновесия 1—3 устанавливаются быстро и выполняется условие стационарности по концентрациям промежуточных комплексов АЦ — НО₂⁻ и АЦ — НО₂⁻ — Н₂О₂, получим уравнение, связывающее скорость реакции с концентрациями Н₂О₂, ЭДА и гематина

$$-\frac{d[\text{Н}_2\text{О}_2]}{dt} = v_0 = \frac{k_3 [\text{АЦ}] \alpha (1 - \alpha) [\text{Н}_2\text{О}_2]_0^2}{K_s K_m + K_m \left[\alpha + \frac{k_2}{k_1} (1 - \alpha) \right] [\text{Н}_2\text{О}_2]_0 + \alpha (1 - \alpha) \cdot [\text{Н}_2\text{О}_2]_0^2} \quad (1)$$

где $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$; $K_m = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}$; $\alpha = \frac{1}{10^{\text{p}K_a - \text{pH}} + 1}$;

$$[\text{АЦ}] = \frac{K' \cdot [\text{Г}]_0 \cdot [\text{ЭДА}]_{\text{нп}}}{1 + K' [\text{ЭДА}]_{\text{нп}}}; \quad [\text{ЭДА}]_{\text{нп}} = \frac{k_{\text{д}} [\text{ЭДА}]_0}{[\text{H}^+] + k_{\text{д}}}$$

$K_{\text{д}} = 10^{-10}$ М, а $[\text{ЭДА}]_{\text{нп}}$ — концентрация непротонированного ЭДА.

Для оценки величины констант K_m , k_3 , K_s и k_2/k_1 удобно представить уравнение (1) в форме линейной зависимости. При малых концентрациях Н₂О₂ можно пренебречь в знаменателе членом, включающим $[\text{Н}_2\text{О}_2]_0^2$. Зависимость v_0 от $[\text{Н}_2\text{О}_2]_0$ в таком приближении спрямится в координатах

$$\frac{[\text{АЦ}] [\text{Н}_2\text{О}_2]_0}{v_0} - \frac{1}{[\text{Н}_2\text{О}_2]_0}$$

При больших концентрациях Н₂О₂ значения $K_s K_m$ много меньше значений двух других членов знаменателя, и после соответствующего упрощения уравнение (1) спрямляется в координатах $[\text{АЦ}]/v_0 - 1/[\text{Н}_2\text{О}_2]_0$.

Экспериментальные результаты (рис. 5) удовлетворяют линейным формам уравнения (1), что дает возможность определить величины $K_s K_m$, k_3 и $K_m [\alpha + (1 - \alpha)(k_2/k_1)]$, подставляя которые в уравнение (1) и меняя соотношение k_2/k_1 и значение K_m , можно вычислить значения v_0 в широком интервале рН. Рассчитанная таким образом зависимость скорости реакции от рН приведена на рис. 6. Видно удовлетворительное согласие с данными, полученными для v_0 экспериментальным путем при различных значениях рН (k_2/k_1 $6,7 \cdot 10^{-4}$, K_m 0,22 М). Полученные кинетические константы элементарных реакций разложения Н₂О₂ на комплексе гематин — ЭДА имеют следующие значения: $k_2/k_1 - 6,7 \cdot 10^{-4}$; $k_3 - 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$; $K_m K_s - 5,9 \cdot 10^{-5} \text{ М}^2$; $K_m - 0,22 \text{ М}$; $K_s - 2,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$.

Правильность вычисленных констант была проверена путем подстановки их в интегрированное уравнение (1), которое имеет вид

$$\int (1) = K_s K_m \Delta \frac{1}{[\text{Н}_2\text{О}_2]} - K_m \left[\alpha + (1 - \alpha) \frac{k_2}{k_1} \right] \Delta \ln [\text{Н}_2\text{О}_2] - \alpha (1 - \alpha) \Delta [\text{Н}_2\text{О}_2] = k_3 [\text{АЦ}] \alpha (1 - \alpha) \Delta t, \quad (2)$$

Экспериментальные точки кинетических кривых для двух концентраций Н₂О₂ (рН 10,2), подставленные в уравнение (2), ложатся на прямую, исходящую от начала координат (рис. 7). Это указывает на то, что полученные значения кинетических констант разложения Н₂О₂ верны и активные центры в процессе реакции не теряют своей активности.

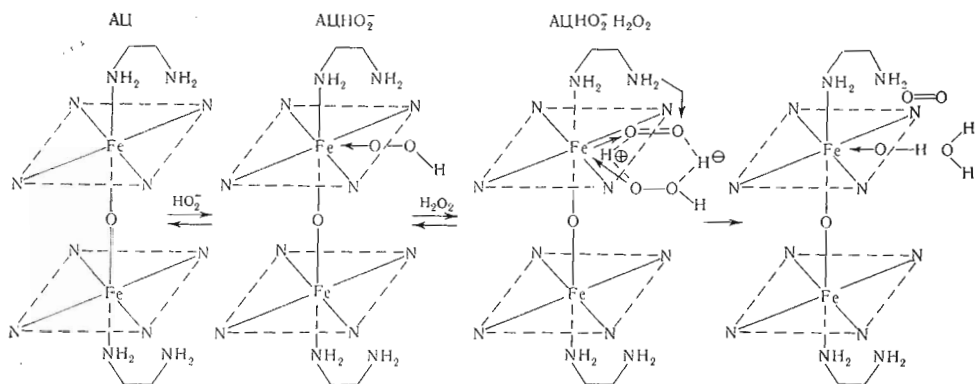


Рис. 8. Схема каталазного процесса на комплексе гематин — ЭДА

Роль ЭДА в каталазной реакции, протекающей на комплексе гематин — ЭДА. Основная задача исследования — выяснение той особой роли, которую играет ЭДА в реакции разложения H_2O_2 . Как уже указывалось ранее, наиболее каталитически активными, по-видимому, являются комплексы гематин — ЭДА состава 1 : 1. Комплексы гематин — ЭДА (1 : 2) обладают меньшей каталитической активностью. Комплексы гематин — ЭДА, которые образуются уже при pH 8,0 (степень депротонизации первой аминогруппы ЭДА составляет 0,9), становятся активными центрами каталазного разложения H_2O_2 при депротонизации второй аминогруппы, т. е. при $\text{pH} \geq 10$. Этим, по-видимому, и объясняется исключительная роль ЭДА по сравнению с другими рассмотренными аминами как носителя второй аминогруппы, расположенной вблизи от атомов железа гематина и обуславливающей присоединение двух молекул H_2O_2 и их последующее превращение в O_2 и H_2O . В том случае, если второй группой является не первичная аминогруппа, а иминогруппа имидазола (гистамина), то такое строение активного центра не способствует ускорению реакции как и в случае реакций, протекающих на комплексах гематина с моноаминами.

Основываясь на результатах взаимодействия аминов с перекисями в водных растворах и, в частности, образования комплекса ЭДА — H_2O_2 [6], можно предположить связывание ЭДА с H_2O_2 и в активном центре данного катализатора. В водных растворах водородная связь менее вероятна, чем связь неподеленной пары электронов азота непосредственно с атомом кислорода перекиси. В пользу этой точки зрения свидетельствуют экспериментальные величины теплот обеих реакций, равные соответственно 2 и 7 ккал/моль [8]. Перенос электронов от атома азота на кислород должен приводить к перераспределению электронной плотности в молекуле H_2O_2 и облегчить переход гидрид иона и протона с молекулы H_2O_2 к иону HO_2^- , который на гематине непосредственно связан с ионом Fe^{3+} (рис. 8). Взаимодействие ЭДА с H_2O_2 может приводить к временному ослаблению или даже разрыву связи Fe^{3+} — ЭДА, вследствие чего не исключено образование связи между ионом Fe^{3+} и молекулой H_2O_2 . Ослабление связи Fe^{3+} — ЭДА (одно из условий распада переходного комплекса) становится возможным благодаря исходной лабильности этой связи в комплексе гематин — ЭДА, что следует из значения константы комплексобразования гематина с ЭДА (табл. 2).

Таким образом, функция ЭДА в активном центре данного катализатора сводится к активации одной из молекул H_2O_2 . В связи с тем что активация H_2O_2 была предположена и в реакции, катализируемой каталазой [9], следует сопоставить константы элементарных стадий, позволяющие установить сходство и различие в механизме реакции, катализируемой ферментом и его синтетической моделью. Исходя из значений константы

равновесия при образовании и распаде промежуточного комплекса (АЦ $\text{HO}_2^-\text{H}_2\text{O}_2$) $K_m = (k_2 + k_3)/k_1 = 0,22$ и константы скорости распада этого комплекса $k_3 = 5 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$, можно определить величину константы скорости k_2 , которая $\geq 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Взяв минимальное значение $k_2 = 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ из соотношения $k_2/k_1 = 6,7 \cdot 10^{-4}$, определим значения $k_1 = 4 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. У каталазы константа скорости присоединения первой молекулы H_2O_2 к активному центру и константа скорости распада комплекса Огуры равны $(1-3) \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ и 10^7 с^{-1} соответственно [10, 11]. Из сопоставления приведенных констант скоростей следует, что первая молекула H_2O_2 присоединяется к комплексу гематин — ЭДА с константой скорости, равной константе скорости аналогичной стадии у фермента. Различие в активностях данной модели и фермента скорее всего следует отнести к стадии присоединения второй молекулы H_2O_2 к активному центру. Это следует из того, что комплекс ЭДА — H_2O_2 образуется с константой равновесия, равной 40 [6]. Приняв, что такая же константа характеризует связывание H_2O_2 с ЭДА на гематине, получим, что в выражении для K_m (см. выше) константой скорости k_{-2} можно пренебречь в сравнении с k_3 , и следовательно, k_2 приближается к рассмотренной величине $2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Дальнейшее совершенствование модели каталазы на основе гематина должно быть направлено на преодоление разрыва в величинах константы скорости k_2 .

Экспериментальная часть

Использовали гемин фирмы «Koch—Light» (Англия) марки ч. Его концентрацию в водном растворе определяли спектрофотометрически при $\lambda 393 \text{ нм}$, принимая коэффициент экстинкции $\epsilon 5 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [12]. Бутиламин и ЭДА подвергали ректификации перегонкой в вакууме. Имидазол, гистамин (фирма «Fluka AG», Швейцария) и поливиниламин использовали без дополнительной очистки. H_2O_2 (30%-ный водный раствор) была дважды перегнана в вакууме в кварцевой посуде. Реакцию разложения H_2O_2 проводили в термостатированном сосуде при интенсивном перемешивании. Комплекс гематина с аминами доводили до требуемого значения рН прибавлением концентрированных растворов NaOH или HClO_4 . Измерения рН проводили на потенциометре типа рН-метр 340. В реакционный сосуд, содержащий известное количество катализатора, вводили H_2O_2 . Скорость реакции определяли, останавливая реакцию H_2O_2 и оттитровывая непрореагировавшую H_2O_2 раствором KMnO_4 , титр которого варьировали от 0,004 до 0,1 М. Полноту превращения H_2O_2 контролировали, измеряя выделяющийся O_2 газометрическим методом [13]. УФ-спектры комплексов гематина с аминами снимали на самопишущем спектрофотометре типа «Specord» UV VIS (ГДР).

Минимальное время начала записи спектра от момента сливания реагентов $\sim 20 \text{ с}$.

Авторы выражают благодарность В. А. Кабанову за полезные советы при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gatt R., Kremer M. L. (1968) *Trans. Faraday Soc.*, **64**, 721—726.
2. Brown S. B., Jones P. (1968) *Trans. Faraday Soc.*, **64**, 999—1005.
3. Nicholls P. (1964) *Trans. Faraday Soc.*, **60**, 137—140.
4. Веселова М. Н., Чухрай Е. С., Полторак О. М. (1969) *Вестн. МГУ. Сер. «Химия»*, № 6, 8—11; (1970), № 1, 14—17.
5. Капанчан А. Т., Пшежецкий В. С., Кабанов В. А. (1970) *Докл. АН СССР*, **190**, 853—856.
6. Пшежецкий В. С., Лебедева Т. А., Кабанов В. А. (1972) *Докл. АН СССР*, **204**, 1492—1497.
7. Janagi J., Sekuru J., Orii J., Okunuki K. (1972) *J. Biochem.*, **71**, 47—54.

8. Чалтыкян О. А., Вартамян О. А., Алоян А. Г. (1972) Ж. физ. химии, 44, 624—626.
9. Jones P., Suggett A. (1968) Biochem. J., 110, 621—633.
10. Chance B. (1949) J. Biol. Chem., 180, 947—957.
11. Ogura J. (1955) Arch. Biochem. Biophys., 57, 288—293.
12. Irada J., Shibata K., (1962) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 9, 323—331.
13. George P. (1947) Nature, 180, 41—42.

Поступила в редакцию
3.VII.1974

ETHYLENE DIAMINE ACTIVATION OF HEMATIN CATALASE FUNCTION

PSHEZHETSKIY V. S., JAROSLAVOV A. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The activating effect of ethylene diamine (EDA), exceeding two orders of magnitude, was found for the hematin catalyzed decomposition of hydrogen peroxide (HP) in aqueous solution. Monoamines (butylamine and imidazole) as well as diamine (histamine) do not function as co-catalysts in this reaction. As evidenced by UV spectra, hematin displays some depolymerization on complexing the above amines. It was found that one molecule of EDA is present at the active centre of catalyst, hematin being able to exist in dimeric form. The process involves consecutive binding of the HO_2^- ion and H_2O_2 molecule to hematin-EDA complex characterized by the rate constants $4 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ and $2 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, respectively; the intermediate complex splits with the rate constant of $5 \cdot 10^3 \text{s}^{-1}$. The activating effect of EDA in catalase function of hematin is assumed to involve the donor interaction with HP which favors the proton and hydride transfer between substrate molecules. The results obtained give support to Jones and Suggett suggestion that apo-enzyme acid-base groups participate in decomposition of HP by catalase.
