

УДК: 577.1+457.25

ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ОКИСЛЕНИИ (+) И (-) $[Ru(phru)(phen)_2]PF_6$ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ КОРНЕЙ ХРЕНА

Е.В. Иванова, А.Д. Рябов

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра химической энзимологии; email:
ivanka@enzyme.chem.msu.ru)

С использованием ионообменной хроматографии циклометаллический комплекс рутения $[Ru(phru)(phen)_2]PF_6$, где (phru = 2-фенилпиридин, phen = 1,10-фенантролин) был разделен на L- и D-октаэдрические изомеры. Выделенные изомеры были охарактеризованы с использованием УФ-видимой и КД-спектроскопии. Была изучена кинетика окисления $[Ru(phru)(phen)_2]PF_6$ пероксидом водорода в присутствии пероксидазы из корней хрена в интервале pH 5-9.

Превосходные окислительно-восстановительные свойства полипиридинных соединений рутения [1] хорошо известны. Комбинация иона рутения с ароматическим лигандным окружением привела к образованию высокообратимой молекулы с окислительно-восстановительным потенциалом, близким к биологическому. Используемая в данной работе группа субстратов представляет собой новый класс рутеноорганических соединений – циклометаллированные производные 2-фенилпиридина [1], содержащие ковалентную связь металл-углерод (рис. 1).

Наличие ковалентной связи рутений-углерод значительно понижает редокс-потенциал и обеспечивает жесткость структуре комплекса [1]. Пониженный ре-

докс-потенциал практически полностью исключает вероятность протекания побочных редокс процессов [2]. Жесткая структура молекулы медиатора снижает энергетические затраты медиатора на реорганизацию сольватной оболочки, сопутствующие изменению заряда металла [2]. За счет последнего свойства рутенациклы превращаются в высокоэффективные переносчики электронов в катализе оксидоредуктазами [1].

Механизм переноса электрона в катализе оксидоредуктазами мало известен. В рамках данной работы предполагалось исследовать природу слабых взаимодействий в механизме переноса электрона с активного центра фермента на рутениевый субстрат. Рутенациклические соединения $[Ru(phru)(LL)_2]PF_6$, где phru – 2-фенилпиридин, а LL – 2,2'-бипиридин или 1,10-фенантролин, была разделены на Λ и Δ оптические изомеры (рис. 2). Была исследована способность пероксидазы узнавать конфигурацию рутениевого субстрата.

Экспериментальная часть

Реагенты. Комплексы $[Ru(phru)(LL)_2]PF_6$, где phru – 2-фенилпиридин, а LL – 1,10-фенантролин, были синтезированы, как описано ранее [1].

Кроме того, в работе использовали следующие реагенты: носитель “Сефадекс SP C-25” (“Фармасия”, Швеция), “Дауэкс 1-X2 (AG 1-42)” (“Serva”, Герма-

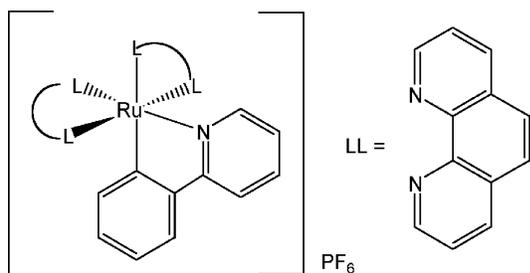


Рис. 1. Структурное строение $[Ru(phru)(phen)_2]PF_6$

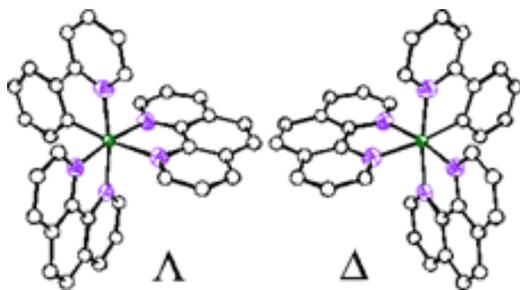


Рис. 2. Пространственное строение оптических L- и D-изомеров $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$

ния); элюент готовили нейтрализацией раствора 50 мМ *o*'*o*'-дибензоилвинной кислоты ("Флюка") двумя моль/экв. NaOH ("Ла Хема"); хлороформ ("Химмед", "ос.ч."); ацетонитрил ("Химмед", "ос.ч."); KPF_6 ("Флюка"); $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, K_2HPO_4 – компоненты буферных растворов ("Реахим", "ч.д.а.") использовали без предварительной очистки; перекись водорода ("Реахим", "ч.д.а.", 30%); пероксидаза из корней хрена (ПХ) ("Sigma", RZ = 2,8).

Приборы. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-160A с термостатом CPS-240A. Спектры кругового дихроизма были измерены на приборе "Jasco J-715". Измерения значений оптического отклонения проводили на *Autopol II*, (*Rudolf research analytical*).

Разделение стереоизомеров $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$. Разделение рутения(II) осуществлялось хроматографически [3] на колонке с ионообменным носителем "Сефадекс SP C-25", уравновешенной 50 мМ *o*'*o*'-дибензоилтарtratом натрия (pH 8,0). Слежение за прохождением и полнотой разделения ярко окрашенных фракций велось визуально. Выделение стереоизомеров проводили экстрагированием равным объемом хлороформа. Дополнительную очистку выделенных изомеров от *o*'*o*'-дибензоилтартата натрия проводили хроматографически на анионообменном носителе "Дауэкс I-X2 (AG I-42)" элюентом следующего состава: 70% 1 М водного раствора KPF_6 и 30% ацетонитрила.

Кинетические измерения

За скоростью реакции следили спектрофотометрически по убыванию оптической плотности в интервале длин волн 470–490 нм, соответствующих поглощению Ru(II) [4]. Для исследования стереоселективности ферментативного окисления соединений рутения(II) пероксидом водорода в присутствии пероксидазы из корней хрена к буферному раствору, содержащему стереоизомер рутения(II) в концентрации 5×10^{-5} М, добавляли перекись водорода так, чтобы концентрация пероксида водорода в кювете составляла 2×10^{-4} М. Реакцию инициировали добавлением раствора пероксидазы из корней хрена. Концентрация ПХ в кювете составляла 3×10^{-9} М. Значения наблюдаемых констант скорости

рассчитывали из полной кинетической кривой по уравнению (1)

$$A(t) = A_{\infty} + (A_0 - A_{\infty}) \times e^{-kt} \quad (1)$$

Результаты и обсуждение

Выделение и характеристика стереоизомеров $[Ru(phpy)(LL)_2]PF_6$. Состоящий из трехмерно сшитых молекул D-глюкозы, сефадекс SP C-25 обычно используют для гель-фильтрации [5] при разделении белков. Этот носитель обладает элементом хиральности. В сочетании с оптически активным *o*'*o*'-дибензоил тарtratом натрия в качестве элюента эта система обладает способностью эффективно разделять стереоизомеры полипиридинных комплексов переходных металлов [3].

При pH > 7,0 носитель, модифицированный $-O-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$, проявляет анионообменные свойства [5] и легко связывает внешнесферные лиганды комплексов. Строение использованного в работе $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$ (рис. 1) [1] сходно со строением полипиридинных комплексов рутения, использованных в работе [3].

Эффективная длина разделяющей колонки для $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$ составляла 15 см. Такая эффективность разделения по сравнению с их полипиридинными аналогами [3] может достигаться за счет того, что растворимость $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$ ниже растворимости $[Ru(phen)_3]PF_6$, и связывание с носителем эффективнее.

Выделенные стереоизомеры были охарактеризованы спектрально. Электронные спектры 1 и 2 фракций на примере $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$ представлены на рис. 3. Характеристические пики стереоизомеров совпадали друг с другом и хорошо соотносились со спектрами кругового дихроизма рис. 4. Из-за сильного поглощения рутенациклических соединений в видимой области оптическое отклонение соответствующих фракций удалось оценить только качественно. Первая выделенная фракция имела знак (+), а вторая (-).

Представленные данные хорошо согласуются с литературными. При соотнесении полученных данных с [3]

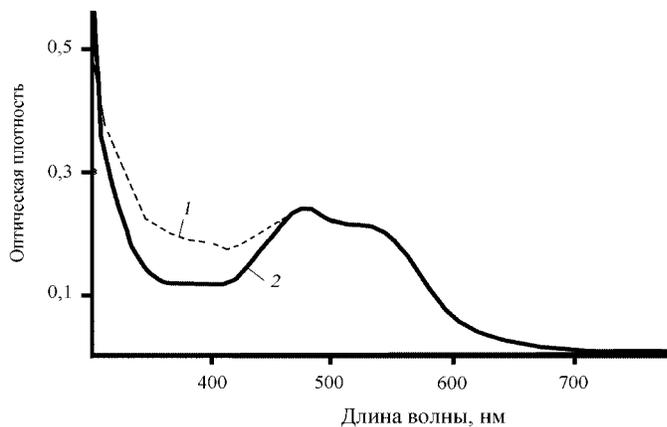


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма оптических изомеров $[Ru(phpy)(phen)_2]PF_6$. Метанольный раствор, $[Ru^{II}]$, М: 1 – $3,8 \times 10^{-5}$; (+); 2 – $2,5 \times 10^{-5}$ (-)

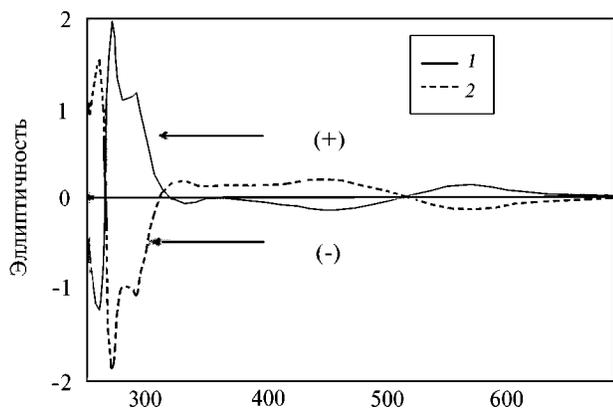


Рис. 4. Электронные спектры октаэдрических изомеров $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Метанольный раствор, $[\text{Ru}^{\text{II}}]$, M: 1 – $3,8 \times 10^{-5}$ (+), 2 – $2,5 \times 10^{-5}$ (–)

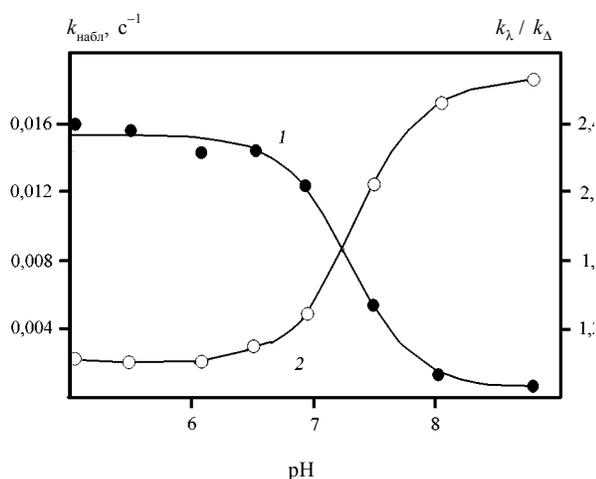
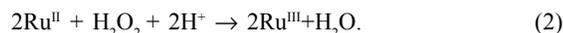


Рис. 5. pH-зависимости активности ПХ в катализе реакции окисления $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ перекисью водорода (1); зависимость стереоселективности ПХ от pH (2). $[\text{Ru}] = 5 \times 10^{-5}$ M, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \times 10^{-4}$ M, $[\text{ПХ}] = 3 \times 10^{-9}$ M, 50 мМ фосфатный буфер, $t = 25^\circ$

выделенным изомерам были приписаны абсолютные конфигурации: Λ и Δ первой (+) и второй (–) фракции соответственно (рис. 2).

Влияние pH на стереоселективность окисления оптических изомеров рутения (II) пероксидом водорода в присутствии ПХ. С целью выявления детального механизма переноса электрона с активного центра

фермента на рутениевый субстрат в природных системах, а также разделения влияния стерических затруднений, унаследованных от конфигурации составляющих белок L-аминокислот, и селективности, связанной с участием различных кислотных остатков в связывании рутениевого субстрата в активном центре фермента, было исследовано влияние pH на стереоселективность реакций, катализируемых ПХ. Реакция, катализируемая ПХ, описывается уравнением (2):



Скорость реакции окисления (+) и (–) изомеров $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ пероксидом водорода в присутствии ПХ была измерена при различных pH в интервале от 5,0 до 9,0. Зависимость фактора стереоселективности (отношения наблюдаемых констант скорости k_{Λ}/k_{Δ}) от pH представлена на рис. 5. В интервале pH от 5,0 до 7,0 скорость окисления $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ не зависела от конфигурации изомера. При значениях pH выше 7,0 более предпочтительной оказывалась Λ – конфигурация (+) $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Значение фактора равно 1 в интервале pH от 5,0 до 7,0 и быстро возрастает до 2,5 при pH выше 7,0. Что примечательно, фактор энантиоселективности возрастает в том же интервале pH, когда значения абсолютных скоростей реакции окисления Ru(II) значительно снижаются, т.е. стереоселективность тем выше, чем ниже активность фермента. Это говорит в пользу того, что для эффективного участия в катализе ПХ, рутениевые комплексы не связываются с активным центром пероксидазы. Стереоселективность, наблюдаемая при высоких значениях pH, может быть вызвана нативной селективностью, обусловленной хиральностью элементов строения белка – аминокислот.

Вид зависимости фактора стереоселективности от pH имеет вид, схожий с найденной ранее для планарно-хиральных ферроценов [6], но чувствительность ПХ к октаэдрической хиральности выше, чем к планарной.

Выделены $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ – оптические изомеры Λ и Δ . Охарактеризованы по сопоставлению полученных данных с литературными выделенным октаэдрическим изомерам приписаны абсолютные конфигурации. Установлена pH зависимость стереоселективности окисления $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phpy})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ пероксидом водорода в присутствии ПХ. Стереоселективность наблюдалась при $\text{pH} > 8,0$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ryabov A. D., Sukharev V. S., Alexandrova L. et al. // Inorg. Chem. 2001. **40**. P. 6529.
- Marcus V. R. A. // Angew. Chem. 1993. **8**. P. 1161.
- Fletcher N. C., Junk P. C., Reitsma D. A. et al. // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1998. P. 133.
- Ryabov A. D., Firsova Y. N., Goral V. N. et al. // Inorganic reaction Mechanisms. 2001. P. 343.
- Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliot W. et al. Data for Biochemical Research. Oxford, 1986.
- Ryabov A. D., Firsova Y. N., Goral V. N. et al. // Chem. Eur. J. 1998. **4**. P. 806.