

# ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) ХІІІ

## СОЕДИНЕНИЯ

1971

№ 11

УДК 541.64:542.952/.954

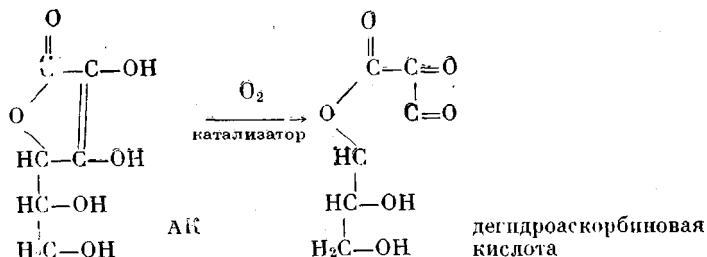
### АСКОРБАТОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА $\text{Cu}^{2+}$ И ПОЛИ-4-ВИНИЛПИРИДИНА, АЛКИЛИРОВАННОГО БРОМУКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

*Н. А. Венгерова, Ю. Э. Кириш, В. А. Кабанов*

В последнее время большое внимание исследователей привлекает изучение биологических и катализитических свойств ферментов и белков, содержащих ионы меди [1, 2]. Пока невозможно описать структуру участка локализации меди в любом медьсодержащем белке, неизвестен и механизм действия медьсодержащих ферментов, однако неоспоримо доказано, что ионы меди участвуют во всех окислительно-восстановительных реакциях, проводимых этими ферментами [1, 2].

Синтез и изучение простых полимерных аналогов, содержащих ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , могут способствовать выяснению природы связывания и активации ионов меди в ферментах и привести к созданию эффективных синтетических катализаторов окислительно-восстановительных процессов. Известен ряд работ, посвященных использованию синтетических полимеров как аналогов апоферментов, активных в комплексе с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в реакциях окисления различных соединений. Так, была исследована катализическая активность комплекса  $\text{Cu}^{2+}$  с поли-*L*-лизином в реакции окисления *L*- $\beta$ -3,4-дигидроксифенилаланина в сравнении с комплексом  $\text{Cu}^{2+}$  и низкомолекулярного аналога бутиламина [3]. Замечена активность хелата полиакрилгидроксамовой кислоты с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в реакции разложения перекиси водорода [4–6]. Значительное увеличение скорости окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона было достигнуто при использовании комплекса поли-*L*-гистидина с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  [7].

Для развития этого направления большой интерес должны представлять полимеры, которые в своем составе будут иметь кроме азотсодержащих группы, способные усилить связывание ионов металла и притяжение субстрата (карбоксильные, спиртовые, гидрофобные). Действительно, оказалось, что поли-4-винилпиридин (поли-4-ВП), частично алкилированный бромуксусной кислотой (БУК), значительно повышает активность ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в реакции окисления аскорбиновой кислоты (АК) молекулярным кислородом. Схема реакции окисления АК [8, 9]



Данная работа посвящена изучению указанной выше системы.

## Экспериментальная часть

Поли-4-ВП получали радикальной полимеризацией 4-винилпиридина (4-ВП), как это описано в работах [10, 11]. Полученный полимер фракционировали осаждением из метанольного раствора этилацетатом. Молекулярный вес фракции вычисляли по данным вискозиметрических измерений в 92%-ном этаноле при 25° [12]. Для получения полимерных четвертичных солей 1,05 г (0,01 M) поли-4-ВП и 2,78 г (0,02 M) БУК (марки ч.) растворяли в 50 мл смеси вода — метanol (2 : 1 по объему). Реакцию

Таблица 1

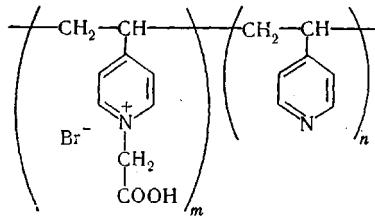
Зависимость степени алкилирования  $\beta$  поли-4-ВП от времени реакции с БУК

Молекулярный вес поли-4-ВП	Время реакции, часы									
	0,25	1	2	3	5	8	22	48	120	340
	$\beta$ , %									
8500	24				45		56			
75 000	20	34	37	44	45	51	60	66	72	83
230 000	24			45		62			93	80

проводили под аргоном при 30° с отбором проб через определенные промежутки времени. Пробу многократно промывали для удаления избытка БУК, затем водный раствор упаривали, полимер осаждали ацетоном и промывали эфиром. Доля пиридиниевых звеньев  $\beta$ , которые вступали в реакцию, определяли по содержанию брома [13].

В результате был получен ряд полимеров с разным содержанием алкилированных пиридиниевых колец (табл. 1).

Строение продукта взаимодействия поли-4-ВП и БУК можно представить в виде



где  $(m / m + n) \cdot 100\% = \beta$ . Низкомолекулярный аналог полимерного катализатора (ПК) — 4-этил-N-карбоксиметилпиридинийбромид (ЭКМП) получали смешиванием 4-этилпиридины (4-ЭП) и БУК в эфире при охлаждении, затем температуру повышали до 30° и нагревали в течение 10 час. Выпавшую соль трижды перекристаллизовывали из абсолютного этанола и сушили в вакууме. Элементарный анализ: вычислено, %: С 44,0; Н 4,88; N 5,7; Br 32,5; найдено, %: С 43,7; Н 4,9; N 5,7; Br 31,2.

Полностью замещенный полимер синтезирован по методу [14]. 0,153 г ( $9,5 \cdot 10^{-4}$  M) натриевой соли БУК растворяли в 2 мл смеси вода — метanol (1 : 1 по объему), пропускали аргон и добавляли 0,1 мл ( $9,5 \cdot 10^{-4}$  M) 4-ВП. Ампулу запаивали под аргоном и нагревали при 50° 4 часа, полимер осаждали ацетоном и промывали эфиром.

Поли-4-ВП, алкилированный метиловым эфиром бромуксусной кислоты (ПВБУК), получали реакцией 0,2 г поли-4-ВП ( $1,9 \cdot 10^{-4}$  M) и 0,58 г ( $3,8 \cdot 10^{-4}$  M) метилового эфира бромуксусной кислоты в метаноле при комнатной температуре в течение 7 дней. Затем полимер осаждали эфиром, несколько раз переосаждали и сушили. Концентрацию меди в водных (бидистиллат) растворах  $\text{CuSO}_4$  (х.ч.) определяли иодометрическим титрованием. L-аскорбиновая кислота (х.ч.) ( $a_F^{20} = 23,3^\circ$  в воде) при различных pH в ацетатном буфере (0,02 M) имеет следующие коэффициенты экстинкции  $\epsilon$  при  $\lambda = 265 \text{ мкм}$  (поглощение аскорбатмоноаниона [15]) и 23°.

pH	3,90	4,30	4,40	4,80	4,92	5,55	6,00
$\epsilon, \text{л.моль}^{-1}, \text{см}^{-1}$	7100	9400	10 000	12 000	13 400	14 400	14 800

Значения  $\text{pK}_a$  АК, найденные спектрофотометрическим титрованием [16] при 15, 20, 25, 30°, были равны соответственно 4,35; 4,30; 4,20; 4,15; ( $\pm 0,04$  pH). Литературные данные  $\text{pK}_a = 4,17$  при 25° [17]. Все измерения pH были выполнены на приборе ДПМ-60-М в терmostатированной ячейке.

Спектрофотометрические и кинетические измерения проводили при помощи двухлучевого регистрирующего спектрофотометра «Hitachi EPS-03» в термостатированных кварцевых кюветах.

Температуру поддерживали с точностью  $\pm 0,1^\circ$ .

Окисление АК изучали в ацетатном буфере, ионная сила  $I = 0,02 M$ . Раствор перед добавлением субстрата насыщали чистым кислородом в течение 8—10 мин. Известно [8], что в реакции окисления АК участвуют в основном аскорбат — моноганион (АА). Начальную скорость реакции определяли по падению оптической плотности раствора при  $\lambda = 265 \text{ мкм}$ .

Каталитический эффект полимера находили по разности начальной скорости окисления АА в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и полимера и начальной скорости окисления АА в присутствии только ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .

### Обсуждение результатов

**Общие кинетические закономерности.** Как видно из рис. 1, добавление полимера приводит к возрастанию каталитической активности ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Низкомолекулярные аналоги полимерного звена в аналогичных условиях не оказывают влияния. Полимеры в отсутствие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  не

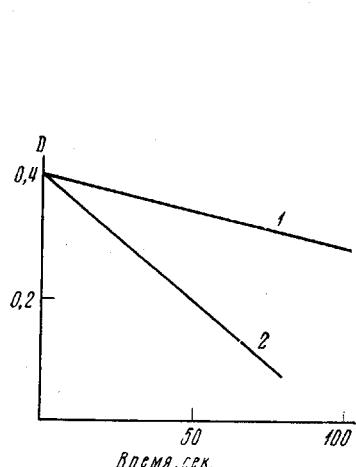


Рис. 1

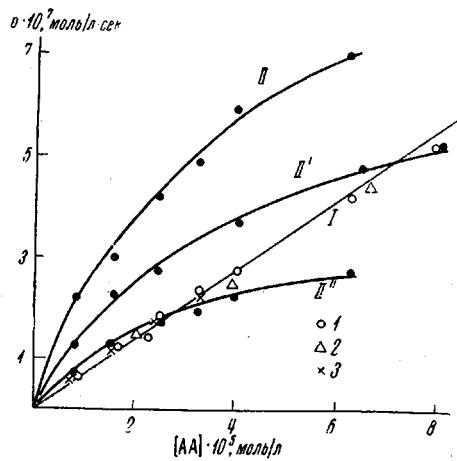


Рис. 2

Рис. 1. Изменение оптической плотности при  $\lambda = 265 \text{ мкм}$  (поглощение АА) в зависимости от времени реакции окисления АА в присутствии:

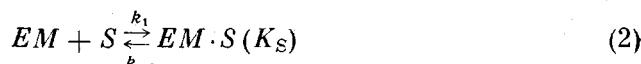
1 — ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (аналогичная кривая для ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и низкомолекулярных аналогов);  
2 — ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и полимеров. Здесь и на рис. 2—4 условия реакции:  $\text{pH} = 4,3$ , ацетатный буфер,  $0,02 M$ ,  $25^\circ$ , концентрации полимера и низкомолекулярных аналогов  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $\text{CuSO}_4 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$

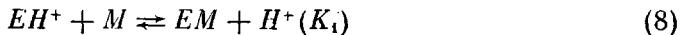
Рис. 2. Зависимости начальной скорости окисления аскорбиновой кислоты  $v$  от концентрации аскорбата AA:

I — в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (1); ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и 4-ЭП (2); ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и смеси (1 : 1 по молям) 4-ЭП и четвертичной соли ЭКМП (3); II—V — в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и полимеров различной степени замещения  $\beta$ : 20 (II), 44 (IV) и 60% (V)

ускоряют окисления АК. Зависимость скорости реакции от концентрации АА в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и полимеров разной степени алкилирования имеет тенденцию к насыщению (рис. 2). Последнее обычно характерно для реакций с участием ферментов, когда происходит образование промежуточного комплекса активного центра с субстратом (комплекса Михаэлиса).

В предположении об образовании комплекса Михаэлиса и об участии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в формировании каталитического центра полимера все возможные в системе равновесия записываются в следующем виде (с соответствующими константами равновесия):





где  $E$  — концентрация полимера или «активных» в связывании металла и субстрата мест в полимере;  $S$  и  $M$  — концентрации субстрата и металла (соответственно);  $EMS$  — комплекс субстрата с активным центром полимера, содержащим металл;  $P$  — продукт реакции, образующийся с константой  $k_2$ . Равновесия (5) и (6) можно не учитывать, исходя из линейной зависимости скорости окисления АК от концентрации АА в данном интервале концентраций (рис. 2).

Кинетическая обработка оставшихся уравнений в условиях стационарного состояния приводит к выражению для скорости реакции [18].

$$v = \frac{k_2 [E]}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]_0}\right) \left[1 + \frac{K \left(1 + \frac{[S]_0}{K'_s}\right)}{[M]_0 \left(1 + \frac{[S]_0}{K_m}\right)}\right]}, \quad (10)$$

где  $K = K_A + \frac{H^+}{K_1}$ ,  $[S]_0$  и  $[M]_0$  — начальные концентрации субстрата и

металла соответственно,  $K_m = K_s + k_2 / k_1$  — константа Михаэлиса. Из выражения (10) следует, что  $K_m$  должна зависеть от концентрации ионов меди. Однако ранее экспериментально показано [10], что в действительности  $K_m$  не зависит от концентрации  $Cu^{2+}$ . В рамках приведенной выше схемы это возможно только при условии, что значения  $K_s'$  и  $K_m$  близки. Тогда выражение (10) становится

$$v = \frac{k_2 [E]}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]_0}\right) \left(1 + \frac{K}{[M]_0}\right)} \quad (11)$$

При постоянной концентрации ионов  $Cu^{2+}$  получаем

$$v = \frac{v'_{\max}}{1 + K_m/[S]_0}, \quad (12)$$

где  $v'_{\max}$  — максимальная скорость при избытке субстрата и при данной концентрации ионов  $Cu^{2+}$ .

$$v'_{\max} = \frac{k_2 [E]}{1 + K/[M]_0} \quad (13)$$

При постоянной концентрации субстрата

$$v = \frac{v''_{\max}}{1 + K/[M]_0}, \quad (14)$$

где  $v''_{\max}$  — максимальная скорость при избытке ионов  $Cu^{2+}$  и при данной концентрации субстрата

$$v''_{\max} = \frac{k_2 [E]}{1 + K_m/[S]_0} \quad (15)$$

Определив значения начальных скоростей из кинетических кривых для полимеров с различной степенью алкилирования  $\beta$  при постоянной концентрации ионов  $Cu^{2+}$  и построив зависимости  $1/v$  от  $1/[S]_0$  (рис. 3), можно найти  $K_m$  и  $v'_{\max}$ . Как видно из рис. 4,  $v'_{\max}$  линейно уменьшается с увеличением степени алкилирования одинаковым образом для всех молекулярных весов.

Полимер с  $\beta = 100\%$  совсем не активен. Следовательно, неалкилированные пиридиновые звенья в ПК ответственны за каталитические свойства. Данный вывод подтверждается также и тем, что ПК, обработанный метилиодидом, теряет каталитическую активность вследствие исчезновения незамещенных пиридиновых колец [10]. Отсутствие каталитического эффекта ПВБУКМ ( $\beta = 20\%$ ) дает основание полагать, что кроме свободных пиридинов, в катализе участвуют и карбоксильные группы.

Как следует из рис. 4, б, некоторое уменьшение  $K_m$  с увеличением  $\beta$  указывает, по-видимому, на то, что карбоксильные группы способствуют связыванию субстрата.

На основании полученных данных можно предположить, что возрастание эффективности катализа ионами  $Cu^{2+}$  связано с образованием в макро-

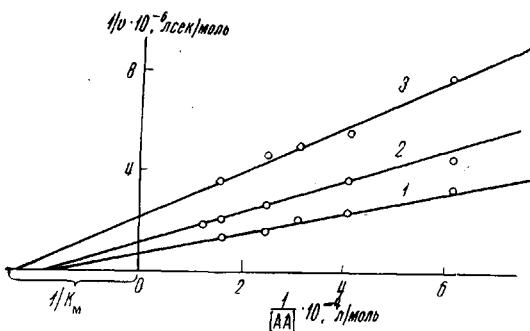


Рис. 3. Зависимости  $v$  от концентрации AA в координатах Лайнувера — Берка в присутствии полимеров с  $\beta$ : 20 (1), 44 (2) и 60% (3)

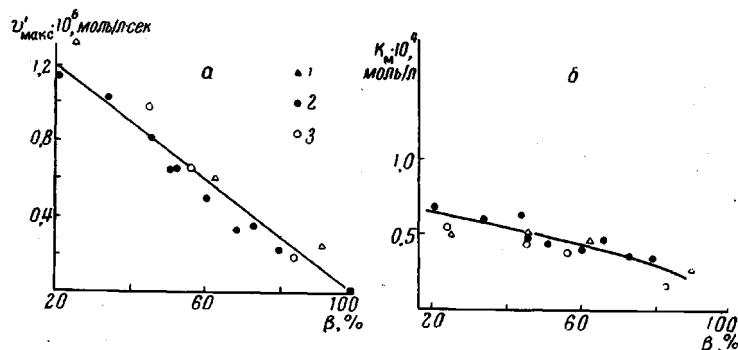
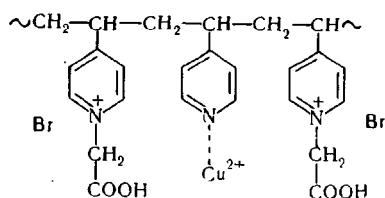


Рис. 4. Зависимость  $v'_{\max}$  (а) и  $K_m$  (б) реакции окисления АК от  $\beta$  поли-4-ВП бромуксусной кислотой. Молекулярный вес фракций:

1 — 230 000, 2 — 75 000, 3 — 8500

молекуле активных центров, содержащих пиридиновые кольца, окруженные карбоксиметиленовыми заместителями. Пиридин, как известно [19], дает комплекс с ионами  $Cu^{2+}$ , и активный центр полимера можно представить следующим образом:



Определение константы диссоциации комплекса ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и полимера. Для расчета кинетических характеристик активного центра полимера необходимо знать константы диссоциации комплекса  $\text{Cu}^{2+}$  и групп, входящих в этот центр.

Из уравнений (1), (7), (8)  $K_A \cdot K_1 = K_a$ , где  $K_A$  и  $K_1$  — константы диссоциации комплексов  $\text{Cu}^{2+}$  с пиридином и с протонированным пиридином соответственно, а  $K_a$  — константа кислотной диссоциации пиридина в полимере. Графический анализ зависимости  $1/v$  от  $1/[\text{Cu}^{2+}]$  (см. уравнение (14)) позволяет найти константу  $K$  и  $v''_{\max}$  ( $K = K_A + H^+/K_1$ ). С другой стороны,  $K$  можно определить из расчета угла наклона  $\varphi$  прямой (рис. 4) и уравнения (15).

$$\operatorname{tg} \varphi = \frac{k_2}{1 + K/[M]_0}$$

Полученные данные находятся в хорошем соответствии и приведены в табл. 2.

Для определения истинных констант диссоциации  $K_A$  и  $K_1$  необходимы  $pK_a$  пиридиновых оснований в полимере в зависимости от степени алкилирования  $\beta$ . Методом потенциометрического титрования натриевых солей полимеров различных степеней алкилирования были измерены условные значения  $pK_a$  пиридинов в полимерах при степенях ионизации  $\alpha_i$ , соответствующих  $\text{pH} = 4,3$  ( $\text{pH}$ , при которых проводили все основные исследования). Ниже приведены соотношения между степенью замещения  $\beta$ , степенью ионизации  $\alpha_i$  и  $pK_a$  пиридинов в полимерах

$\beta, \%$	37,4	45,0	51,5	66,0	72,0
$\alpha_i$	0,55	0,76	0,65	0,85	0,83
$pK_a$	4,4	4,8	4,5	5,1	5,0

Вычисленные значения  $-\lg K_A$  лежат в пределах 3,0 — 3,3, а  $-\lg K_1$  — 1,5 — 1,75. Для комплекса ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и 4-метилпиридина известно, что  $-\lg K_A = 2,56$  [19] и 2,82 [20].

Таблица 2  
Константа диссоциации  $K$  комплекса полимера с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , полученная разными методами

Метод расчета	$K \cdot 10^3$ моль/л	$-\lg K$
Графический анализ по уравнению (14) $\beta = 45\%$	$2,5 \pm 0,5$ [8]	2,6
Графический анализ по уравнению (14) $\beta = 66\%$	$2,7 \pm 0,5$	$2,57 \approx 2,6$
Из рис. 4 и уравнения (15)	4,8	2,3

Условия реакции:  $\text{pH} = 4,3$ , ацетатный буфер,  $I = 0,02 M$ ,  $25^\circ$ .

Активность ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , связанных с полимером, на 2,5 порядка превышает активность  $\text{Cu}^{2+}$  в отсутствие полимера, но все же на два порядка меньше, чем у активного центра аскорбатоксидазы. Природный медьсодержащий белок церулоплазмин оказывается даже менее активным, чем полимер.

Некоторое возрастание  $-\lg K_A$  в рассматриваемых пределах позволяет сделать вывод о том, что связывание  $\text{Cu}^{2+}$  в полимере сильнее, чем у низкомолекулярного аналога, вероятно, из-за присутствия карбоксиметиленовых заместителей. Далее, определив константы равновесия  $\text{Cu}^{2+}$  и полимера, полезно провести сопоставление каталитической активности полимерного катализатора (ПК) и ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (низкомолекулярные аналоги не влияют на скорость окисления АК в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$ ) в расчете на моль истинных активных центров (комплексно связанных с полимером ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ). Из табл. 3 видно, что активность ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , связанных с полимером, на 2,5 порядка превышает активность ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в отсутствие полимера, но все же на два порядка меньше, чем у активного центра аскорбатоксидазы. Природный медьсодержащий белок церулоплазмин оказывается даже менее активным, чем полимер.

Влияние pH раствора на катализические свойства ПК. Связывание ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с полимером осуществляется пиридиновыми основаниями. Поэтому pH реакционной среды должно существенно влиять на катализическую активность ПК. Измерения каталитической активности ПК (рис. 5) в интервале  $\text{pH} = 3,2 - 5,6$  показали, что с уменьшением pH скорость окисления АА падает, вероятно, из-за вытеснения протонами ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , комплексно связанных с полимером. Отношение скорости  $v'_{\max}$  к количеству комплексно связанных с полимером ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (активных центров), т. е. константа первого порядка, остается величиной приблизительно постоянной ( $4,5 - 2,0 \text{ сек}^{-1}$ ) в данном интервале pH. При  $\text{pH} = 3,2$  каталитическая активность ПК пропадает.

Интересно отметить, что аналогичное поведение замечено и у фермента аскорбатоксидазы [23]. Выдерживание фермента при  $\text{pH} < 5,7$  приводит к падению каталитической активности и уменьшению числа ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .

Фермент полностью теряет свою активность при  $\text{pH} = 3,45$ . Следовательно, титрование ионами водорода основных групп в ПК (пиридиновых) и основных групп в ферменте (предположительно имидазольных) вытесняет ионы  $\text{Cu}^{2+}$  из активного центра и уничтожает активность.

Термодинамические параметры реакции окисления АК. Для выяснения механизма действия ПК —  $\text{Cu}^{2+}$  в реакции окисления

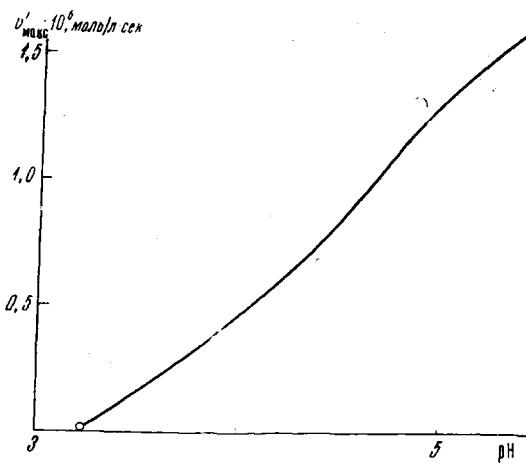


Рис. 5. Зависимость  $v'_{\max}$  реакции окисления АК в присутствии полимера ( $\beta = 44\%$ ) от pH-среды. Условия реакции: ацетатный буфер  $0,02 M$ ,  $25^\circ$ , концентрация полимера  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $\text{CuSO}_4 - 3 \cdot 10^{-5}$  моль/л

Таблица 3

Сравнение каталитической активности комплекса ПК —  $\text{Cu}^{2+}$ , ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и медьюсодержащих белков

Катализатор	$K_M \cdot 10^4$ , моль/л	$k^{**}$ , л/моль·сек	Активность каталитического центра $***$ , $\text{сек}^{-1}$	pH
$\text{Cu}^{2+}$	—	$2,2 \cdot 10^2$	—	4,3
ПК — $\text{Cu}^{2+}$	$0,3 - 0,8$	$(0,7 - 1,0) \cdot 10^5$	8,5	4,3
Аскорбатоксидаза * [21]	2,4	—	$1,67 \cdot 10^3$	5,6
Церуллоплазмин [21]	0,13	—	$2,5 \cdot 10^{-2}$	6,0

\* В ферменте активны шесть атомов  $\text{Cu}^{2+}$  [22].

\*\*  $k$  — константа второго порядка.

\*\*\* Число солей субстрата, превращенных молем активных центров в 1 сек.

АК существенно знать термодинамические величины, характеризующие отдельные элементарные стадии. С этой целью нами была изучена температурная зависимость скорости окисления АК в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и ПК (полученного из фракции поли-4-ВП ( $M_w = 75\,000$ ) и БУК;  $\beta = 45\%$ ) и ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в отсутствие ПК. С повышением температуры для

ПК — Cu<sup>2+</sup> наблюдается возрастание  $K_m$ , определяющей (при  $k_{-1} / k_1 > k_2 / k_1$ ) прочность связывания субстрата у активного центра ПК — Cu<sup>2+</sup>, т. е. связывание уменьшается. Из температурной зависимости  $K_m$  вычислены эффективные термодинамические величины образования комплекса Михаэлиса (табл. 4).

Для расчета  $\Delta F_m$  использовали уравнение  $\Delta F_m = -RT \ln K_p$ , где  $K_p = 1 / K_s \approx 1 / K_m$  — константа равновесия образования полимер-субстратного комплекса ( $K_s$  — истинная константа диссоциации комплекса EMS).

Таблица 4  
Термодинамические параметры реакции

Катализатор	$\Delta F_m$ , ккал/моль	$\Delta H_m$ , ккал/моль	$\Delta S_m$ , э. ед.	$\Delta F^*$ , ккал/моль	$\Delta H^*$ , ккал/моль	$\Delta S^*$ , э. ед.
Cu <sup>2+</sup>	—	—	—	14,3	18,2	13,1
ПК — Cu <sup>2+</sup>	—	—	—	—	—	—
$\beta = 45\%$	-5,2	-9,4	-14,0	15,6	19,0	11,4

Тогда,  $-RT \ln 1 / K_s = \Delta F_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$ , где  $\Delta F_m$  — свободная энергия образования комплекса Михаэлиса,  $\Delta H_m$  и  $\Delta S_m$ , соответствующие энталпии и энтропии.

Скорость окисления молекул АК, адсорбированных активными центрами ПК — Cu<sup>2+</sup>, растет с повышением температуры. Используя уравнение Эйринга, мы рассчитали  $\Delta F^*$  (свободная энергия образования активированного состояния),  $\Delta H^*$  и  $\Delta S^*$  (энталпия и энтропия активации реакции окисления) (табл. 4). Были определены также соответствующие параметры для реакции окисления АК в присутствии только ионов Cu<sup>2+</sup>. Из табл. 4 видно, что значения  $\Delta F^*$  окисления АК ионами Cu<sup>2+</sup> и ПК — Cu<sup>2+</sup> близки. Следовательно, можно полагать, что ускорение окисления в присутствии ПК — Cu<sup>2+</sup> вызывается, в основном, образованием комплекса Михаэлиса.

Интересно отметить, что подобная причина ускорения реакции наблюдалась и при гидролизе сложных эфиров в присутствии поли-4-ВП, алкилированных гидрофобными галоидалкилами [24]. В последнем случае эффект ускорения объяснялся «экстракцией» субстрата в активные центры полимера вследствие гидрофобного взаимодействия, тогда как в случае реакции окисления АК ПК — Cu<sup>2+</sup> ускорение, по-видимому, обусловлено электростатическим взаимодействием АА и полимера.

Вполне вероятно, что необходимым условием построения активного центра ПК должна быть некоторая ориентация групп, ответственных за катализ, и групп, ответственных за притяжение субстрата. Последнее, по-видимому, может реализоваться с наибольшей эффективностью в случаях, когда лиганды входят в состав макромолекулы.

### Выводы

1. Реакцией алкилирования поли-4-винилпиридина бромуксусной кислотой синтезирован полимер, который на несколько порядков повышает катализическую активность ионов Cu<sup>2+</sup> в реакции окисления аскорбиновой кислоты молекулярным кислородом.
2. Кинетическое поведение полимерных катализаторов описывается уравнениями ферментативной кинетики.
3. Показана роль незамещенных пиридиновых звеньев в связывании ионов Cu<sup>2+</sup> и в катализе реакции окисления аскорбиновой кислоты.
4. Определены константы диссоциации комплекса ионов Cu<sup>2+</sup> и полимеров различной степени алкилирования, определены термодинамические параметры реакции окисления.

5. Высказано предположение, что причиной ускорения реакции окисления в присутствии ионов  $Cu^{2+}$  и полимера служит образование тройного комплекса полимер — металл — субстрат, причем в связывании полимера с субстратом принимают участие карбоксильные группы.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
14 V 1970

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Я. Фриден, Горизонты биохимии, изд-во «Мир», 1964, стр. 354.
2. The Biochemistry of Copper, ed. J. Peisach, P. Aisen, W. E. Blumberg. Acad. Press, N. Y., 1966.
3. M. Hatano, T. Nozawa, S. Ikeda, T. Jamamoto, Kogyo Kagaku Zasshi, **72**, 474, 1969.
4. T. Nozawa, I. Nose, M. Hatano, S. Kambara, Makromolek. Chem., **112**, 73, 1968.
5. M. Hatano, T. Nozawa, T. Jamamoto, S. Kambara, Makromolek. Chem., **115**, 1, 1968.
6. M. Hatano, T. Nozawa, T. Jamamoto, S. Kambara, Makromolek. Chem., **115**, 10, 1968.
7. I. Pecht, A. Levitzki, M. Anbar, J. Amer. Chem. Soc., **89**, 1587, 1967.
8. M. M. Taqui Khan, A. E. Martell, J. Amer. Chem. Soc., **89**, 4176, 1967.
9. A. E. Martell, Pure Appl. Chem., **17**, 129, 1968.
10. Н. А. Венгерова, Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, **190**, 131, 1970.
11. Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, **177**, 112, 1967.
12. A. G. Boyes, U. P. Strauss, J. Polymer Sci., **22**, 463, 1956.
13. В. А. Климова, Основные микрометоды анализа органических соединений, изд-во «Химия», 1970.
14. В. А. Кабанов, К. В. Алиев, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., **A10**, 1618, 1968.
15. E. Racker, Biochim. et biophys. acta, **9**, 577, 1952.
16. А. Альберт, Е. Сержент, Константы ионизации кислот и оснований, изд-во «Химия», 1964, стр. 64.
17. Краткая химическая энциклопедия, т. I, изд-во «Советская энциклопедия», 1961, стр. 299.
18. М. Дикусон, Э. Уэбб, Ферменты, изд-во «Мир», 1966, стр. 379.
19. R. J. Buehlm an, F. H. Verhoeck, J. Amer. Chem. Soc., **70**, 1401, 1948.
20. C. J. Hawkins, D. D. Perrin, J. Chem. Soc., 1962, 1351.
21. S. Osaki, J. A. McDermott, D. A. Johnson, E. Frieden, The Biochemistry of Copper, ed. J. Peisach, P. Aisen, W. E. Blumberg. Acad. Press, N. Y., 1966, p. 559.
22. C. R. Dawson, The Enzymes, v. 8, ed. P. Boyer, R. H. Hardy, K. Myrbäck. Acad. Press, N. Y., 1963, p. 297.
23. C. R. Dawson, The Biochemistry of Copper, ed. J. Peisach, P. Aisen, W. E. Blumberg. Acad. Press, N. Y., 1966, p. 305.
24. Ю. Э. Кирш, С. К. Плужнов, Т. С. Шомина, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., **A12**, 186, 1970.

---

#### ASCORBATE OXIDASE TYPE ACTIVITY OF THE COMPLEX OF $Cu^{2+}$ AND POLY-4-VINYLPYRIDINE ALKYLATED BY BROMOACETIC ACID

N. A. Vengerova, Yu. E. Kirsh, V. A. Kabanov

#### Summary

A study has been made of poly-4-vinylpyridine N-alkylated by bromoacetic acid to various substitution degrees  $\beta$ , which enhances considerably the catalytic activity of the  $Cu^{2+}$  ions in the oxidation reaction of ascorbic acid by molecular oxygen. The role of unsubstituted pyridine units in catalysis is established and the role of carboxymethylene substituents is discussed. The dissociation constants of the complex of the polymer and  $Cu^{2+}$  ions are determined, as well as the thermodynamic reaction parameters.

---