

**Московский Государственный Университет  
им. М.В. Ломоносова**

**Химический Факультет**

***Влияние некоторых веществ на определение  
формиата ферментативным методом***

**Курсовая работа  
по аналитической химии  
студента 2XX группы**

XXXX X.X.

**Преподаватель**

XXXXXXXXXX X.X.

**Научный руководитель**

Федорчук В.В.

Москва - 1999

Введение .....	3
Литературный обзор .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Методы определения формиата .....	4
Качественные методы .....	4
Количественные методы .....	4
Классические методы .....	4
Гравиметрия .....	4
Титриметрия .....	4
Инструментальные методы .....	5
Спектрофотометрическое определение .....	5
Газожидкостная хроматография .....	5
Ионообменная хроматография .....	6
Хроматомасс-спектрометрия .....	6
Ферментативный метод определения формиата .....	6
Другие методы .....	8
Некоторые свойства НАД <sup>+</sup> -зависимой ФДГ .....	8
Общие свойства ФДГ .....	8
Ингибирование фермента .....	10
Список литературы .....	19
Экспериментальная часть .....	12
Материалы .....	12
Приготовление и подготовка растворов .....	12
Использованная аппаратура .....	12
Метод определения .....	12
Обсуждение результатов .....	13
Выводы .....	18

## Введение

Определение формиата в сложных смесях – важная задача, возникающая сейчас в самых разных областях человеческой деятельности. Формиат используется в пищевой промышленности в качестве консерванта. Он образуется на АЭС из углекислого газа и воды в результате радиолитического распада и способствует коррозии. Ион  $\text{HCOO}^-$  участвует в метаболических путях и поэтому его определение в физиологических жидкостях (крови, моче) уже активно используется в медицинской диагностике. Содержание муравьиной кислоты и ее гомологов в дождевой воде – одна из характеристик экологического состояния местности. Это далеко не полный перечень свидетельств того, что необходим точный и чувствительный метод определения концентрации формиата в многокомпонентных смесях.

Очень часто измерение концентрации формиат-иона традиционными методами (гравиметрия, титриметрия) невозможно из-за присутствия примесей, мешающих анализу. В настоящее время предложено много путей решения этой проблемы. Однако многие из них не обладают необходимым сочетанием простоты, чувствительности и селективности, в отличие от, например, предложенного в работе [10] ферментативного метода. Он основан на окислении формиат-иона до  $\text{CO}_2$  при сопряженном восстановлении  $\text{НАД}^+$  в  $\text{НАД*Н}$ . Эта реакция катализируется  $\text{НАД}^+$ -зависимой формиатдегидрогеназой. Ген этого фермента клонирован в клетки *E.coli* и, следовательно, рекомбинантный фермент может быть получен в необходимых количествах. Катализируемая реакция протекает в широком интервале температур и рН, и практически необратима из-за образования газообразного продукта реакции, при этом строго сохраняя стехиометрию. Рассматриваемый способ основан на измерении конечной концентрации  $\text{НАД*Н}$  спектрофотометрически (по изменению конечной оптической плотности раствора при 340 нм). Формиатдегидрогеназа абсолютно специфична по отношению к субстрату, что позволяет использовать данный метод в самых сложных химических и биологических смесях.

Однако одним из немногих недостатков описанного метода, как и всех ферментативных методов анализа, является возможность ингибирования фермента компонентами определяемой смеси. Цель данной работы – измерение констант ингибирования фермента различными веществами для определения того, насколько те или иные составные части смеси мешают определению формиат-иона.

# Литературный обзор

## Методы определения формиата

### Качественные методы

Из качественных методов анализа формиата известны следующие: реакция муравьиной кислоты с анилином (красное окрашивание); желто-красная окраска при взаимодействии с гидросульфитом натрия [2]; определение формиата на основе реакции с анизолом и нитратом свинца. Так как муравьиная кислота может быть рассмотрена и как альдегид (НО-СОН), для ее обнаружения пригодна реакция серебряного зеркала. В качестве более селективного метода для детекции формиата в смеси с уксусной, лимонной, винной кислот, спиртом и сахарами предложен метод, использующий восстановление смеси водородом в момент выделения ( $Mg + HCl$ ) и обработку гидразином и ферроцианидом [3].

Однако для данной работы большее значение имеют количественные методы анализа, рассматриваемые ниже.

### Количественные методы

#### Классические методы

##### *Гравиметрия*

К достоинствам гравиметрических методов относят их абсолютность, высокую точность, простоту и относительную дешевизну. Среди гравиметрических методов определения формиата известны следующие:

1. Образование нерастворимых в воде или спирте комплексов с двухвалентными металлами [2].
2. Окисление формиата в растворе с последующим осаждением карбонатов кальция или бария.
3. Восстановление муравьиной кислотой  $HgCl_2$  до  $Hg_2Cl_2$ .

Однако последние два метода плохи тем, что существует много веществ, помимо  $HCOO^-$ , способных окисляться до карбоната и восстанавливать  $HgCl_2$ .

##### *Титриметрия*

Один из методов этого рода – модификация вышеописанного гравиметрического метода. В данном случае хлорид ртути (II) не взвешивается, а определяется титриметрически, при этом используют его реакцию с бромом или йодом, оттитровывая остаток галогена мышьяковистой кислотой [4].

Другой широко известный метод определения формиата – перманганатометрия. Все модификации этого метода основываются на принципе обратного титрования.

Для количественного определения муравьиной кислоты также может быть использован бром, окисляющий кислоту или ее соли до бромидов, который потом оттитровывается аргентометрически [5].

Муравьиная кислота окисляется йодноватой, что также используется для ее анализа.

Так как соли карбоновых кислот – слабые основания, для их определения применим способ прямого титрования кислотой. Но при титровании в водной среде их сила недостаточна для появления на кривой титрования большого скачка. Поэтому оптимальным для этих солей является титрование в неводной среде. В качестве растворителей в этом случае чаще всего применяют ледяную уксусную кислоту или смеси, содержащие гликоли, например, раствор изопропанола в этиленгликоле.

*Кулонометрическое титрование.* Этот метод более удобен, чем обычное титрование, так как здесь совершенно не требуется стандартных растворов, кроме того, измеряемая величина в данном случае – не объем, а количество электричества, которое можно измерить более точно. Анализ легко автоматизировать, метод определения конечной точки титрования здесь такой же, что и в обычном титровании, поэтому можно использовать потенциометрию.

## **Инструментальные методы**

### ***Спектрофотометрическое определение***

Обычно карбоновые кислоты подвергаются ИКС-анализу после перевода их в соответствующие соли, так как отпадают трудности, связанные с межмолекулярными взаимодействиями. Однако процесс часто осложнен тем, что почти все молекулы, содержащие ковалентные связи, поглощают в инфракрасном диапазоне [6].

В ультрафиолетовом диапазоне у карбоновых кислот сколько-нибудь заметный максимум поглощения приходится на 250-280 нм, однако спектрофотометрия в этой области затруднена из-за крайне слабого поглощения ультрафиолетового излучения.

### ***Газожидкостная хроматография***

Этот метод требует, чтобы разделяемые компоненты были летучи и стойки при температуре разделительной колонки. Поэтому для определения карбоновых кислот указанным методом их вначале переводят в метиловые эфиры, имеющие более низкую температуру кипения. Для муравьиной кислоты иногда удобнее использовать не метиловый, а этиловый и более высокие эфиры, получение которых составляет стадию пробоподготовки ГЖХ [7].

Газожидкостная хроматография предъявляет множество требований к каждому из этапов анализа. Практически их совместное выполнение не всегда возможно, поэтому обычно относительная погрешность метода в лучшем случае не превышает 4%. К недостаткам метода также относится длительность и сложность пробоподготовки образцов. Метод ГЖХ не позволяет проводить совместное определение органических кислот в присутствии неорганических.

### ***Ионообменная хроматография***

Метод хорош тем, что позволяет отделить муравьиную кислоту от ее гомологов за счет ее малых размеров и относительно сильного отличия константы диссоциации. Предел обнаружения формиата при элюировании раствором соли бензойной или фталевой кислоты составляет около 0.5-1 мг/л, и около 0.05-0.5 мг/л, если в качестве эталона используются растворы самих кислот [7].

Небольшая модификация ИОХ – ионоэсклюзивная хроматография, применимая для неполярного разделения слабоионизированных соединений, в том числе карбоновых кислот. В качестве элюента здесь используются растворы некоторых кислот.

### ***Хроматомасс-спектрометрия***

Соединение масс-спектрометра с газожидкостным хроматографом может быть успешно применено при определении муравьиной кислоты в смесях. Хроматограф количественно разделяет многокомпонентные смеси, в то время как масс-спектрометр идентифицирует соединения. Так как масс-спектры одноосновных карбоновых кислот малоинтенсивны, для данного метода исследования их обычно переводят в более летучие эфиры [8]. Несмотря на все преимущества метода, он более эффективен при качественном анализе, так как при переходе исследуемой смеси в ионизационную камеру почти неизбежна частичная потеря компонентов с нарушением концентрационных соотношений [9].

### ***Ферментативный метод определения формиата***

Для определения формиата разработано несколько ферментных методов. Наиболее известен метод с тетрагидрофолатформилазой, а также методы определения формиата формиатдегидрогеназами, выделенными из гороха и *Pseudomonas oxalaticus*. Однако упомянутые методы страдают существенными недостатками. Кинетический метод, разработанный на основе малатдегидрогеназы из *E.coli*, малоспецифичен. Определение с тетрагидрофолатформилазой связано со значительной продолжительностью определения и с использованием труднодоступной тетрагидрофолиевой кислоты. Применение других ферментных методов ограничено из-за высокой лабильности используемых ферментов, это относится, в частности, к препаратам из *E.coli* и к формиатдегидрогеназе из *Pseudomonas ox-*

*alaticus*. Наиболее приемлемым методом является, таким образом, определение формиата при помощи формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 [10].

Предлагаемый метод специфичен по отношению к формиату. В отсутствие формиата НАД не восстанавливается в присутствии 0.1 М раствора метанола, этанола, формальдегида, ацетальдегида, молочной, уксусной, пировиноградной, малоновой кислот.

Определение формиата ферментативным методом проводится следующим образом. В кварцевые кюветы добавляют раствор НАД<sup>+</sup> в калий-фосфатном буфере с pH 8.0, содержащем также 0.01 М ЭДТА, затем необходимое количество формиата и буфер. Далее в кювету помещают раствор фермента, быстро перемешивают и снимают показания со спектрофотометра (абсолютное значение оптической плотности и ее приращение за минуту). Дожидаются полного окончания реакции и снимают конечное значение оптической плотности [11].

В основе метода лежит линейная зависимость оптической плотности раствора от изменения концентрации вещества, в согласии с законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$A = \varepsilon * l * c \text{ (или } \Delta A = \varepsilon * l * \Delta c)$$

где  $A$  – оптическая плотность,  $l$  – оптическая длина пути в сантиметрах,  $\varepsilon$  – коэффициент молекулярного поглощения (для НАД\*Н при  $\lambda=340$  нм эта величина составляет 622.0 л/(моль\*см)). Проведение спектрофотометрических измерений именно на этой длине волны связано с тем, что она характеризуется практически нулевым поглощением НАД<sup>+</sup>. Поглощение света ферментом не мешает определению, так как не меняется в ходе реакции. Поскольку до начала реакции растворы в кюветах характеризуются ненулевым поглощением, аналитическим сигналом в описываемом методе служит не абсолютное значение оптической плотности, а ее изменение. Конечная оптическая плотность измеряется тогда, когда ее приращение за минуту не превышает тысячной доли оптической единицы. Время анализа составляет, в зависимости от концентрации формиата, от единиц до нескольких десятков минут. Кроме того, время анализа обратно пропорционально концентрации фермента, однако, результат измерения от нее не зависит, что является одним из удобств метода.

Получены следующие аналитические характеристики метода:

- предел обнаружений составляет  $\sim 5 * 10^{-6}$  М;
- нижняя граница определяемых содержаний ( $C_H$ )  $\sim 10^{-5}$  М, верхняя граница  $\sim 10^{-4}$  М;
- относительное стандартное отклонение ( $S_r$ ) в процессе измерения не превышает 0.05, а в рабочем диапазоне концентраций остается на уровне 0.02.

Уместно заметить, что для хроматомасс-спектрометрии  $S_r \approx 0.1$ ,  $C_H \approx 2 \cdot 10^{-6}$ , для ионной хроматографии  $S_r \approx 0.03$ ,  $C_H \approx 5 \cdot 10^{-6}$ , то есть ферментативный метод составляет им вполне достойную конкуренцию. Более точные результаты ( $C_H \approx 10^{-6}$  М) могут быть получены модификацией описываемого метода (при флуорометрическом детектировании количества НАД\*Н). По сравнению с существующими ферментативными методами, данный метод отличается широким диапазоном определяемых концентраций, доступностью, стабильностью и высокой активностью используемых препаратов, простотой.

На стадии пробоподготовки необходимо удалить мешающие анализу вещества. При анализе биологических объектов такими являются, например, протеолитические ферменты, гидролизующие пептидные связи белка, а также ферменты, разрушающие или связывающие любую форму НАД<sup>+</sup> или формиат-иона. Белки в пробе можно разрушать нагреванием (до ~60°C) или воздействием сильной щелочи или кислоты. Значительным понижением рН можно также способствовать разрушению азид-иона, сильнейшего ингибитора формиатдегидрогеназы. Однако необходимо учесть, что перед началом анализа рН раствора должен быть близким к 7 или немного больше, в нем не должно быть сильных окислителей и восстановителей, желательно, чтобы раствор был дегазированным.

Источники погрешностей метода различаются в зависимости от концентрации субстрата. При низких количествах формиата наибольший вклад в погрешность вносят: точность мерных емкостей (пипеток и т.д.), окисление НАД\*Н и погрешности, связанные с недостаточной чистотой реактивов. При высоких содержаниях анализируемого компонента возрастает влияние инструментальных погрешностей [6]. В реальных системах причиной ошибок могут стать еще и недостаточно хорошо спланированные и проведенные пробоотбор и пробоподготовка.

### *Другие методы*

Кроме рассматриваемого в работе метода, существуют и другие ферментативные методы определения формиата, например, кинетические. В этом случае вывод о содержании в анализируемой пробе формиат-иона делается на основании начальной скорости реакции. Можно вести определение и по флуоресценции НАД\*Н в конечной точке.

## **Некоторые свойства НАД<sup>+</sup>-зависимой ФДГ**

### **Общие свойства ФДГ**

Формиатдегидрогеназы относятся к числу ферментов, играющих исключительно важную роль в метаболизме метилотрофных организмов. Они катализируют реакцию



НСОО<sup>-</sup> до СО<sub>2</sub>. Этот процесс представляет собой последнюю стадию в полиферментативной цепи окисления метанола до углекислого газа и является источником энергии для метилотрофных организмов при росте на метилсодержащих средах.

Большинство известных к настоящему времени формиаатдегидрогеназ состоят из двух идентичных субъединиц молекулярной массой 35-48 кДа каждая (1 килодальтон равен 1000 а.е.м.). Каждая такая субъединица имеет один активный центр и не содержит простетических групп и ионов металлов [12].

Скорость катализируемой реакции при фиксированном количестве фермента и избытке субстрата находится из классического уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$V = (V_m * [S]) / ([S] + K_m),$$

где  $[S]$  – концентрация субстрата,  $V_m$  – максимально возможная скорость реакции (при неизменных температуре, давлении и концентрации фермента), а  $K_m$  – константа Михаэлиса, чей кинетический смысл – численное значение концентрации субстрата, при котором скорость вдвое меньше  $V_m$ . Известные формиаатдегидрогеназы имеют близкие значения константы Михаэлиса по НАД<sup>+</sup> (60 – 110 мкМ) и по формиату (2 – 15 мкМ), однако удельная активность ФДГ из бактерий в несколько раз выше, чем у фермента из других источников [12]. Подавляющее большинство формиаатдегидрогеназ имеет достаточно широкий рН-оптимум активности. Максимальная скорость катализируемой реакции остается практически постоянной в диапазоне стабильности белка (рН 5.0 – 10.5), а константы Михаэлиса по НАД<sup>+</sup> и по формиату постоянны в интервале рН 6.0 – 9.0. При заметном изменении кислотности среды наблюдается ощутимое возрастание  $K_m$  как по НАД<sup>+</sup>, так и по формиату [13]. Общим для всех формиаатдегидрогеназ является также их относительно высокое содержание в клетках. Например, при культивировании на метаноле в качестве единственного источника углерода как бактерий, так и дрожжей, содержание ФДГ в этих клетках составляет до 18-20% от общего количества растворимых белков.

Формиаатдегидрогеназы проявляют по отношению к формиату высокую специфичность, не окисляя метанол, ацетат, формальдегид и многие другие органические вещества. Бактериальные ферменты, в отличие от дрожжевых, обладающих исключительной специфичностью, могут использовать в качестве субстрата наряду с формиатом S-формилглутатион, а также ряд тиоэфиров муравьиной кислоты (которые, к счастью, быстро гидролизуются) [14]. Несмотря на преимущества дрожжевых ферментов, работы с ними затруднены из-за быстрой их инактивации.

Наиболее изученной и одной из наиболее устойчивых является формиаатдегидрогеназа, выделенная из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (ген этого фермента был

клонирован, секвенирован и экспрессирован в клетки *E.coli* в нашей лаборатории несколько лет назад). Молекула фермента представляет собой димер в виде вытянутого эллипсоида и имеет линейные размеры 105×55×45 Е [15]. При переходе от апо- к холо- форме белковая глобула становится более компактной, что все же не приводит к реорганизации структурных элементов.

Касаясь вопроса об инактивации фермента, необходимо заметить, что она связана в основном с термическим и химическими воздействиями на белковую глобулу, приводящими к ее заметным конформационным изменениям. Во избежание этих процессов необходимо бывает удалять из раствора определенные вещества (в том числе, ионы металлов добавлением ЭДТА), а также не допускать значительного повышения температуры, т.к. при 60°C наблюдается заметная термоинактивация. Для качества исследуемого метода важно, что в соответствующих условиях (4°C) формиатдегидрогеназа *Pseudomonas* sp.101 может храниться в растворе без видимой потери активности в течение 3-4 лет, как было показано в нашей лаборатории.

### Ингибирование фермента

Ближайшие структурные аналоги муравьиной кислоты (ацетат, пропионат, оксалат, пируват, метанол и гидразин) проявляют довольно слабое сродство к ФДГ ( $K_i > 0.5$  М). Однако многие простые неорганические анионы соперничают с формиатом за активный центр фермента. Их константы ингибирования различаются на несколько порядков. Тетраэдрические анионы, такие как перхлорат, фосфат, сульфат (за исключением тиосульфата), связываются достаточно слабо. Лучшими ингибиторами ФДГ являются линейные и плоские анионы с делокализованным отрицательным зарядом. Линейные трехатомные анионы, например, азид или  $SCN^-$ , могут считаться структурными аналогами продукта реакции,  $CO_2$ , а плоские анионы – как  $NO_2^-$  – аналогами формиат-иона. Азид – соединение, изоэлектронное  $CO_2$ , – сильнейший ингибитор формиатдегидрогеназы. Прочное связывание этого аниона, ведущее к образованию неактивного тройного комплекса, ФДГ-НАД<sup>+</sup>-азид, было исследовано флюорометрическим титрованием активных центров ФДГ.

На прочность связывания ингибиторов влияют следующие факторы:

1. Общая геометрия: линейные молекулы связываются лучше плоских, например,  $N_3^- \gg NO_2^-$ ,  $CO_2 > HCOO^-$ .
2. Природа центрального атома:  $SO_3^{2-} \gg NO_3^- \gg ClO_3^-$ .
3. Природа периферийных атомов:  $S_2O_3^{2-} > ClO_4^-$ .

Известно, что из-за большой электрофильности С-4 атома никотинамидного кольца НАД<sup>+</sup> образует аддукты с различными нуклеофилами, например, CN<sup>-</sup>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> и гидроксилмином. Сравнение констант связывания ингибитора с НАД<sup>+</sup> и с двойным комплексом ФДГ-НАД<sup>+</sup> позволяет оценить энергию стабилизации при образовании тройного комплекса ФДГ-НАД<sup>+</sup>-ингибитор, которая в случае HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> равна приблизительно 29 кДж/моль. Сильный стабилизирующий эффект достигается, когда формиат ( $K_d \sim 15$  мМ) замещается в тройном комплексе азидом ( $K_d \sim 0.5$  мкМ). Крайне прочное связывание линейных анионов в активном центре позволяет рассматривать эти комплексы как стабильные аналоги переходного состояния [12].

Все рассмотренные случаи ингибирования относятся к типу полного конкурентного ингибирования. В присутствии ингибитора скорость реакции равна

$$V_i = (V_m * [S]) / (K_m + [S] + (K_m / K_i) * [I]),$$

где  $K_i$  - константа ингибирования,  $[I]$  - концентрация ингибитора. Величина  $(K_m / K_i) * [I]$  называется степенью уменьшения скорости реакции в присутствии ингибитора. Константу ингибирования определяют графически по методу Диксона, то есть построением зависимости  $1/V_i$  от  $[I]$  (как легко убедиться, она линейна). Абсцисса точки пересечения таких прямых будет численно равна  $K_i$ , взятой с противоположным знаком [1].

Одна группа соединений занимает особое место среди ингибиторов ФДГ. Пиридоксаль ( $K_i \sim 0.9$  мМ) соперничает с формиатом как в свободном ферменте, так и в двойном неактивном комплексе ФДГ-НАД<sup>+</sup>. Размеры молекулы пиридоксаля и родственных соединений наводят на мысль, что они связываются не в активном центре, а в каком-то другом месте, являясь, таким образом, аллостерическими ингибиторами [12].

В результате проведенного литературного обзора было выяснено, что некоторые вещества – ингибиторы формиатдегидрогеназы – могут существенно замедлить время анализа и повлиять на точность его результатов. Поэтому измерение констант ингибирования этих веществ необходимо для выяснения того, в каких концентрациях их присутствие в определяемой смеси недопустимо. Было решено измерить константы ингибирования четырех веществ – азид-иона, роданид-иона, нитрит-иона и нитрат-иона.

# Экспериментальная часть

## Материалы

В экспериментах по определению констант ингибирования использовались: никоти-намидадениндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>) фирмы “Sigma” (Германия), ЭДТА фирмы “Merck”, отече-ственные реактивы марки “ч.д.а”: КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, КОН, НСООNa, NaN<sub>3</sub>, КSCN, NaNO<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub>.

В качестве катализатора использовалась рекомбинантная формиатдегидрогеназа из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 с удельной активностью 15 ед/мл.

## Приготовление и подготовка растворов

Для приготовления растворов, необходимых в ходе эксперимента, была использована дистиллированная вода. Все измерения проводились в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе с рН 7.0.

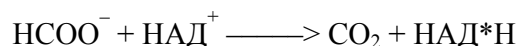
Стандартный раствор формиата с концентрацией 0.5 М был приготовлен растворени-ем навески соли в воде. Стандартные растворы азида с концентрацией 10<sup>-5</sup> и 10<sup>-6</sup> М готови-лись разведением 10<sup>-4</sup> М раствора соли, который, в свою очередь приготовили растворени-ем навески в воде. Растворы других ингибиторов готовились также. Использовались сле-дующие растворы: 10<sup>-4</sup> и 10<sup>-3</sup> М роданид, 10<sup>-3</sup> и 0.01 М нитрит, 0.01 и 0.1 М нитрат.

## Использованная аппаратура

Спектрофотометрические определения проводились в кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре “Beckman DU-8B” (США) с кюветным отделением, термо-статуируемым при 37°С и точностью определения 0.001. В работе были использованы весы “Sartorius” (Германия) с точностью взвешивания 0.01 мг.

## Метод определения

Измерения начальных скоростей реакций проводились в калий-фосфатном буфере. Готовили 5 серий по 7 кювет, так что в каждой серии концентрация формиата была одина-ковой, а концентрация ингибитора менялась от 0.1  $K_i$  до 10  $K_i$ . В различных сериях концен-трация формиата была разной и менялась от 5 до 50 мМ. Концентрация НАД<sup>+</sup> в кювете бы-ла 2 мг/мл, что составляет более 30  $K_m$ . Реакция инициировалась добавлением в кювету аликвоты фермента. Измерение проводилось спектрофотометрически по накоплению про-дукта реакции НАД\*Н на длине волны 340 нм при 37°С. При этом протекала ферментатив-ная реакция:



Далее с помощью программы “Sigma Plot 4.0” строилась зависимость в координатах  $1/V_i$  от  $[I]$ . Для построения одной прямой использовалось 7 точек, соответствующих семи различным концентрациям ингибитора. Абсцисса точки пересечения полученного семейства из пяти прямых давала значение константы ингибирования с обратным знаком, как описано выше.

### Обсуждение результатов

Целью эксперимента явилось определение констант ингибирования четырех веществ – азида, роданида, нитрата и нитрита. В результате были получены следующие данные (см. также рис. 1-4).

Таблица 1. Результаты эксперимента

Ингибитор	Азид	Роданид	Нитрит	Нитрат
$K_i$	$4.38 \cdot 10^{-8}$	$2.52 \cdot 10^{-5}$	$8.88 \cdot 10^{-4}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$
$I_{50}$	$4.38 \cdot 10^{-8}$	$2.52 \cdot 10^{-5}$	$8.89 \cdot 10^{-4}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$
$S_r$	0.0671	0.0380	0.0875	0.0381
$\delta = (t_{p,i} \cdot S_r) / n$	$3.08 \cdot 10^{-9}$	$1.00 \cdot 10^{-6}$	$8.16 \cdot 10^{-5}$	$9.90 \cdot 10^{-6}$

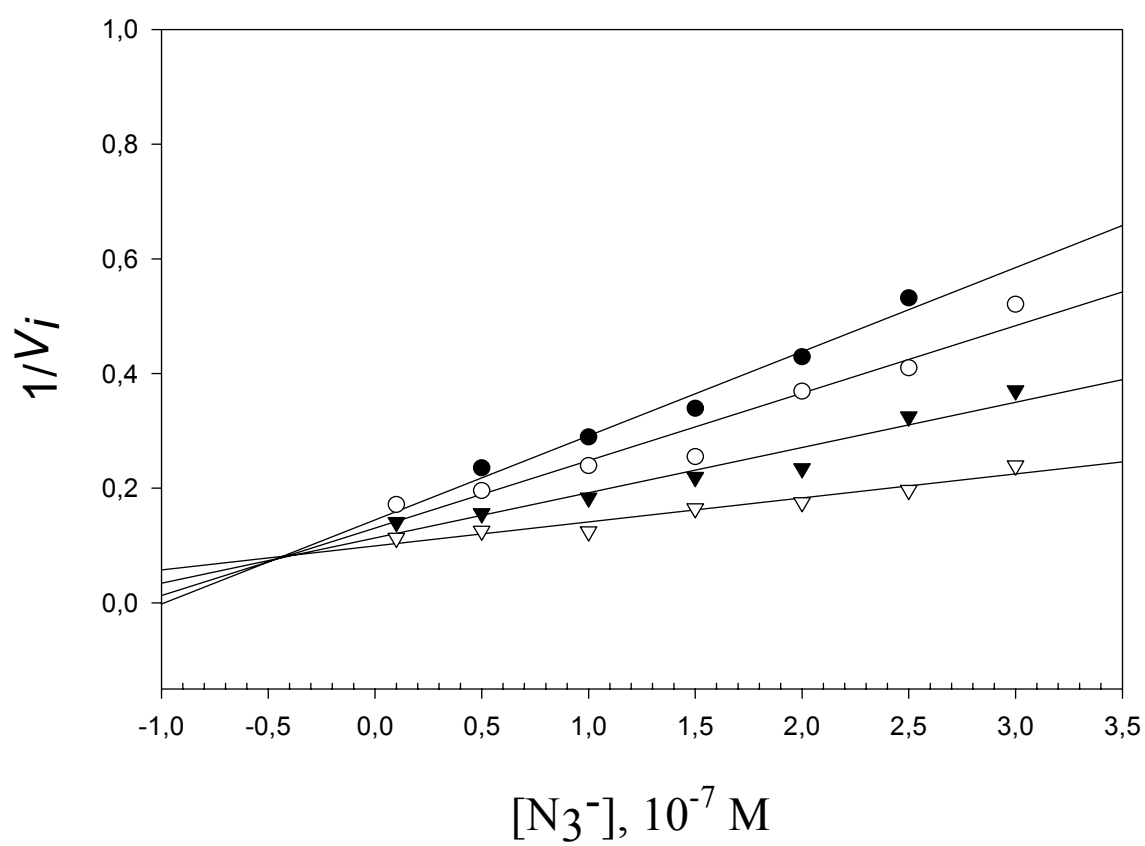
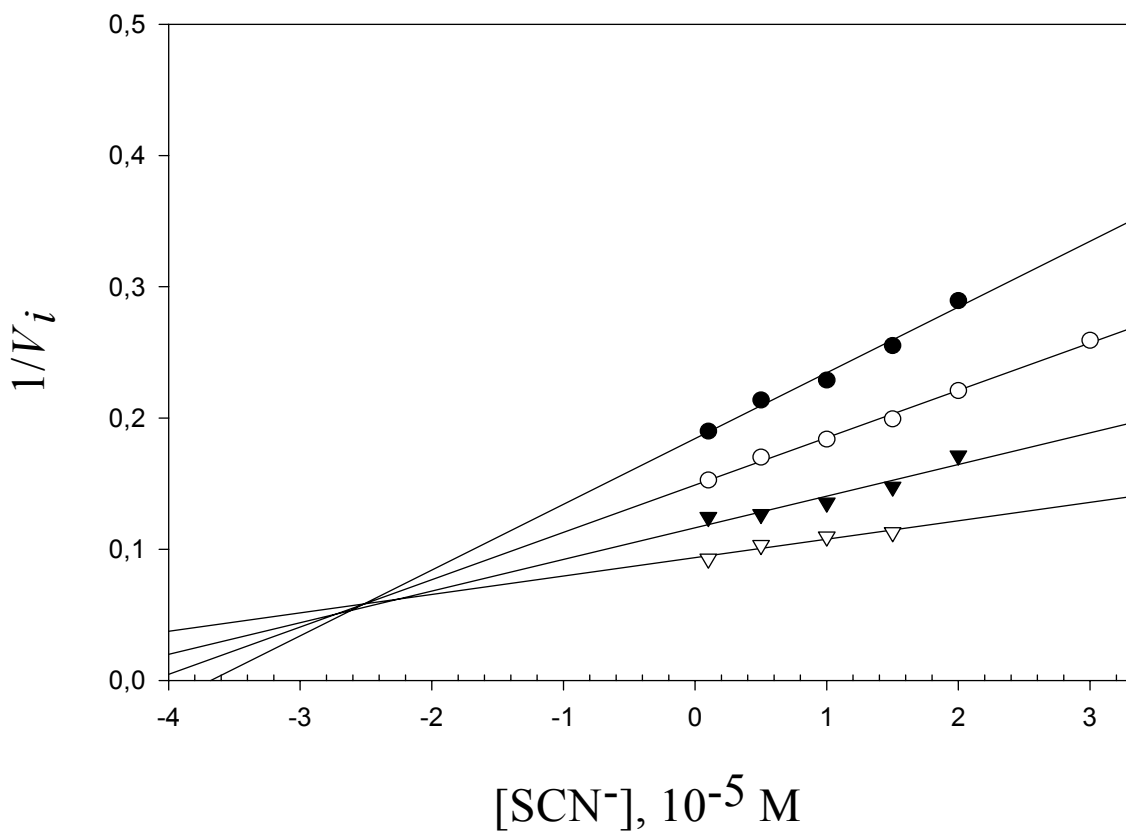


Рис. 1. Ингибирование формиатдегидрогеназы NaN<sub>3</sub>



**Рис. 2. Ингибирование формиатдегидрогеназы KSCN**

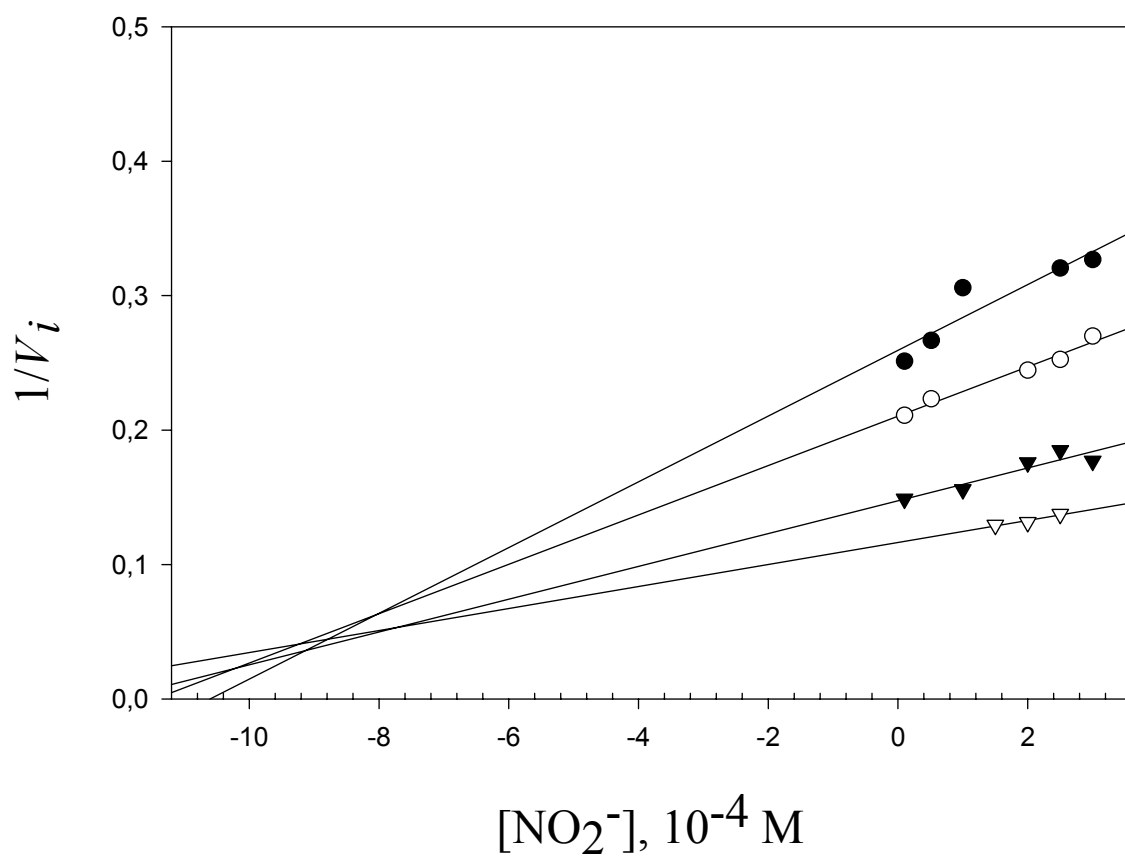
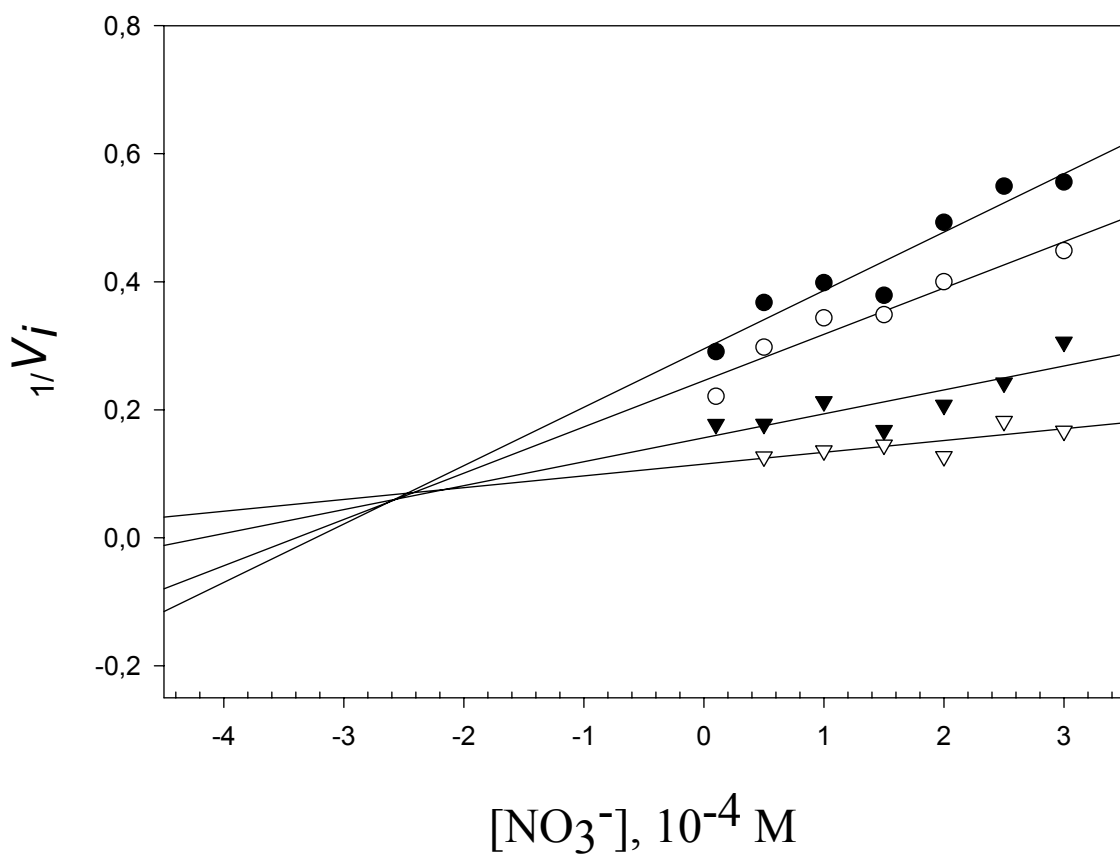


Рис. 3. Ингибирование формиатдегидрогеназы  $\text{NaNO}_2$





**1 нс. 7. Згацирированије формиитпвесиоросепизаи  $1/V_i$  и  $[NO_3^-]$**

Константы вычислялись следующим образом: по параметрам прямых, найденным методом наименьших квадратов, искались всевозможные попарные точки их пересечения. Среднее значение абсцисс таких точек и давало константу ингибирования с обратным знаком.

В процессе обработки данных были вычислены относительное стандартное отклонение ( $S_r$ ) и доверительный интервал ( $\delta$ ) измерения константы ингибирования для каждого вещества. Видно, что  $S_r$  не превышало 0.1, а в лучшем случае было порядка 0.04. Константы для нитрата и роданида были определены с большей точностью, чем для нитрита и азида.

В отличие от литературных данных, в результате проведенного эксперимента было найдено, что  $K_i$  нитрита больше  $K_i$  нитрата.

В химическом анализе иногда используют величину  $I_{50}$  (или ее отрицательный десятичный логарифм  $pI_{50}$ ), равную концентрации ингибитора, при которой скорость реакции снижается вдвое по сравнению со скоростью реакции в отсутствие ингибитора [16]. В случае полного конкурентного ингибирования  $I_{50}$  связана с константой ингибирования следующим образом:

$$I_{50} = K_i * (1 + [S]/K_m).$$

Из этого выражения видно, что в случае полного конкурентного ингибирования  $I_{50}$  не может служить мерой ингибирующей способности эффектора при произвольной концентрации субстрата. Однако для оценки значения  $I_{50}$  можно принять концентрацию субстрата равной нижней границе определяемых содержаний (см. табл. 1). При таких концентрациях ингибитор существенно замедляет ферментативную реакцию и может увеличить время анализа в несколько раз.

## **Выводы**

Проведенный эксперимент показал, что ферментативному определению формиата мешают: азид в концентрации  $4.38 \cdot 10^{-8}$  М, роданид в концентрации  $2.52 \cdot 10^{-5}$  М, нитрит в концентрации  $8.89 \cdot 10^{-4}$  М, нитрат в концентрации  $2.47 \cdot 10^{-4}$  М. В количествах, превышающих данные, эти вещества недопустимо замедляют ферментативную реакцию и делают определение формиата практически невозможным.

## Список литературы

1. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд. МГУ. 1976.
2. Бауэр Э. Анализ органических соединений. М.: Изд. иностр. лит., 1953.
3. Кульберг Л.М., Иванова З.В. Открытие некоторых органических кислот при их совместном присутствии // Журн. анал. химии. 1946. Вып. 1. С. 311.
4. Oberhauser F., Hensinger W. Iber die quantitative Bestimmung der Ameisensdure // Z. anorg. allg. Chem. 1927. Bd. 160. S. 366-372.
5. Joseph A.F. // J. Soc. chem. industry. 1910. V. 29. P. 1189.
6. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. М.: Мир. 1989.
7. Горяев М.И., Евдакова Н.А. Справочник по газожидкостной хромато-графии органических кислот. Алма-Ата. Наука. 1977.
8. Полякова А.А., Хмельницкий Р.А. Масс-спектрометрия в органической химии. Л.: Химия. 1972.
9. Тахистов В.В. Практическая масс-спектрометрия органических соединений. Л.: Изд. ЛГУ. 1977.
10. Авторское свидетельство № 1271873.
11. Попов В.О., Родионов Ю.В., Егоров А.М., Березин И.В. Определение формиаата с помощью бактериальной формиаатдегидрогеназы // Журн. анал. химии. 1978. Т. 33. Вып. 2. С. 364 – 366.
12. Popov V.O., Lamzin V.S. NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase // J. Biochem. 1994. Vol. 301. P. 625 – 643.
13. Попов В.О., Родионов Ю.В., Березин И.В. NAD<sup>+</sup>-зависимая формиаатдегидрогеназа метилотрофных бактерий // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. С. 117 – 129.
14. Тишков В.И., Галкин А.Г., Егоров А.М. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 317. С. 345 – 348.
15. Тишков В.И. Механизм действия формиаатдегидрогеназы метилотрофных бактерий. Диссертация кандидата хим. наук. М.: Изд. МГУ. 1984.
16. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука. 1965.