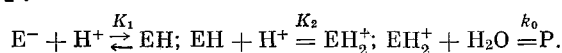


Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, Н. Н. УГАРОВА,
М. М. СИЛАЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА
УРИДИН-2',3'-ЦИКЛОФОСФАТА В СИСТЕМЕ
ВОДА — ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД

В настоящей работе изучена реакция кислотного гидролиза уридин-2',3'-циклофосфата в системе вода — ДМСО * переменного состава. Детальный анализ влияния среды на реакцию гидролиза циклофосфатов ранее не проводился, хотя реакции в неводных средах с участием циклофосфатов могут служить хорошей моделью для изучения возможности одностадийного синтеза олигорибонуклеотидов при использовании в качестве субстратов рибонуклеаз рибонуклеозид-2',3'-циклофосфатов.

Кинетические параметры реакции гидролиза уридин-2',3'-циклофосфата в воде при малых концентрациях ионов водорода были получены Абрашем с сотрудниками (1), который предложил следующую схему кислотного гидролиза ЦФ:



Согласно данной схеме лимитирующей стадией реакции является взаимодействие воды с молекулой ЦФ, протонированной по эфирному кислороду (EH_2^+). При постоянных концентрациях воды и ионов водорода кинетика реакции следует первому порядку по концентрации ЦФ:

$$d[ЦФ] / dt = -k_{экс}[ЦФ].$$

Функциональная связь $k_{экс}$ с константами схемы реакции может быть легко найдена, если принять во внимание условие материального баланса $[ЦФ] = [E^-] + [EH] + [EH_2^+]$ и считать, что процесс протекает при установившемся равновесии протонизации с участием одной молекулы воды в лимитирующей стадии:

$$k_{экс} = \frac{(k_0/K_1K_2) \cdot a_H^2 a_{H_2O}}{1 + (a_H/K_1) + (a_H^2/K_1 \cdot K_2)} \quad (1)$$

где a_H и a_{H_2O} — активности ионов водорода и молекул воды соответственно.

Уридин-2',3'-циклофосфат натрия («Реанал») использовали без дополнительной очистки. Растворы заданной кислотности готовили разбавлением концентрированной соляной кислоты о.с.ч. Ионную силу создавали хлористым калием х.ч. Для приготовления рабочих растворов использовали дважды перегнанную воду и спектроскопически чистый ДМСО, очищенный по методике (2). Кинетические кривые получали методом спектрофотометрии при $20 \pm 0,1^\circ C$. Рабочие смеси готовили непосредственно перед опытом из запасных растворов ЦФ, кислоты и смеси вода — ДМСО. Необходимые объемы запасных растворов отбирали с точностью $\pm 5 \cdot 10^{-4}$ мл, вносили их в кварцевую кювету ($l = 1$ или $0,25$ см), тщательно перемешивали и регистрировали изменение оптической плотности раствора во вре-

* В работе использованы следующие сокращения и обозначения: ДМСО — диметилсульфоксид, ЦФ — уридин-2',3'-циклофосфат, МФ — уридин-2',3'-монофосфат, м.д. или x_2 — молярная доля ДМСО в смеси вода — ДМСО.

мени при 280 мμ на двухлучевом спектрофотометре фирмы «Юап» (Франция), способном регистрировать сравнительно небольшие изменения оптической плотности раствора на фоне высокой исходной оптической плотности ($D_0 \sim 2$).

Константу скорости реакции ($k_{\text{экс}}$) определяли графически из линейной зависимости $\lg(D_\infty - D)$ от времени, где D и D_∞ — оптическая плотность раствора в момент времени t и после окончания реакции соответственно.

Активность ионов водорода находили по формуле: $a_{\text{H}} = m_{\text{H}} \cdot \gamma_{\text{H}} \cdot m \cdot \gamma_{\text{H}}$, где a_{H} — активность ионов водорода, отнесенная к стандартному состоянию в воде, m_{H} — моляльная концентрация ионов водорода, γ_{H} — концентрационный коэффициент активности, который находили по уравнению Дебая — Хюккеля второго приближения (³), $m \cdot \gamma_{\text{H}}$ — сольватационный коэффициент активности, значения которого для смеси вода — ДМСО брали из работы (²). Активность воды находили по формуле: $a_{\text{H}_2\text{O}} = \gamma_{\text{H}_2\text{O}} [\text{H}_2\text{O}]$, используя литературные значения $\gamma_{\text{H}_2\text{O}}$ для системы вода — ДМСО (⁴).

Гидролиз ЦФ, по данным Абрама (¹), в водных растворах характеризуется первым порядком по ЦФ. Измерения при $x_s = 0,45$ показали, что первый порядок по ЦФ сохраняется и в системе вода — ДМСО. Как было показано, $k_{\text{экс}}$ мало зависит от ионной силы раствора, поэтому влияние ионной силы на скорость гидролиза ЦФ не учитывали. Измерения по выяснению возможности протекания обратной реакции — образования ЦФ из МФ показали, что в условиях наших экспериментов при различных x_s (0; 0,45; 0,70; 0,93) образования заметных количеств ЦФ из МФ не происходит.

Зависимость $k_{\text{экс}}$ от активности ионов водорода была изучена в водном растворе и в смеси вода — ДМСО ($x_s = 0,70$) в диапазоне концентраций ионов водорода 0,05—0,50 г-ион/кг. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что характер зависимости $k_{\text{экс}}$ от a_{H} при $x_s = 0$ и $x_s = 0,70$ различен. В водном растворе $k_{\text{экс}}$ является сложной функцией a_{H} . Порядок реакции по ионам водорода уменьшается от 1,8 при $a_{\text{H}} = 0,04$ —0,10 г-ион/кг до 1,1 в диапазоне $a_{\text{H}} = 0,20$ —0,30 г-ион/кг. При $x_s = 0,70$ во всей изученной области a_{H} порядок реакции по ионам водорода близок к 1.

Из анализа уравнения (1) следует, что характер зависимости $k_{\text{экс}}$ от a_{H} при постоянном значении x_s действительно определяется изменением порядка реакции по ионам водорода, который должен равняться двум при $a_{\text{H}} \ll K_1$, $a_{\text{H}} \ll K_2$ и единице при $a_{\text{H}}^2 \ll K_1 K_2$ и $a_{\text{H}} > K_1$. Следовательно, в водных растворах величины a_{H} (0,04—0,30 г-ион/кг) много меньше K_2 и меньше или сопоставимы с K_1 , поэтому порядок реакции по ионам водорода уменьшается от 1,8 до 1,1 при возрастании a_{H} . В смеси вода — ДМСО при $x_s = 0,70$ наблюдаемый первый порядок по ионам водорода во всем изученном диапазоне a_{H} (3—15 г-ион/кг) является следствием того, что a_{H} значительно превышает K_1 , но меньше K_2 . Обработка экспериментальных данных, показанных на рис. 1 и 2, с помощью уравнения (1) позволила найти численные значения констант K_1 , K_2 и k_0 при $x_s = 0$ и 0,70, которые и показаны ниже:

	$x_s = 0$	$x_s = 0,70$
K_1, M	$0,4 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
K_2, M	$2,0 \pm 0,2$	100 ± 10
$k_0, M^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$	$(0,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$

Данные показывают, что при изменении x_s от 0 до 0,70 величина K_1 уменьшается, а K_2 — сильно возрастает. По-видимому, это связано с изменением сольватации, а следовательно, и коэффициентов активности молекулы ЦФ и ее различных ионизированных форм при переходе от воды к смеси вода — ДМСО. Об этом свидетельствуют также заметные изменения в коэффициентах экстинкции ЦФ при различных x_s , которые наблюдались нами в смесях вода — ДМСО.

Зависимость $k_{\text{экс}}$ от состава среды была изучена при двух постоянных концентрациях кислоты (0,0622 М и 0,2460 М). Значения x_s изменялись от нуля до 1. Зависимость $k_{\text{экс}}$ от x_s (рис. 2) в обоих случаях проходит через ярко выраженный максимум в области $x_s = 0,3-0,5$. Следует также отметить резкое изменение $k_{\text{экс}}$ в области x_s , меньших 0,1. Интерпретация полученной экспериментальной зависимости $k_{\text{экс}}$ от x_s может быть проведена с учетом изменения активности воды и ионов водорода при варьировании x_s . На рис. 3 представлена зависимость a_{H} и $a_{\text{H}_2\text{O}}$ от x_s для системы вода — ДМСО при концентрации кислоты 0,2460 М. С ростом x_s активность ионов водорода резко возрастает, а концентрация и активность воды — па-

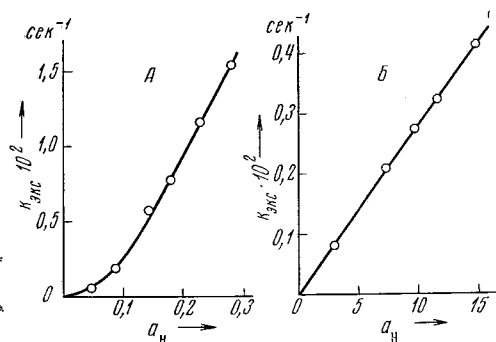


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость $k_{\text{экс}}$ от a_{H} при $x_s = 0$ (А) и при $x_s = 0,70$ (Б)

Рис. 2. Зависимость $k_{\text{экс}}$ от x_s . 1 — при $[\text{H}^+] = 0,0622 \text{ M}$, 2 — при $[\text{H}^+] = 0,2460 \text{ M}$, 3 — вид функции $a_{\text{H}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}} = f(x_s)$ при $[\text{H}^+] = 0,2460 \text{ M}$

Рис. 3. Зависимость активности ионов водорода (1), концентрации воды (2) и активности воды (3) от x_s при $[\text{H}^+] = 0,2460 \text{ M}$

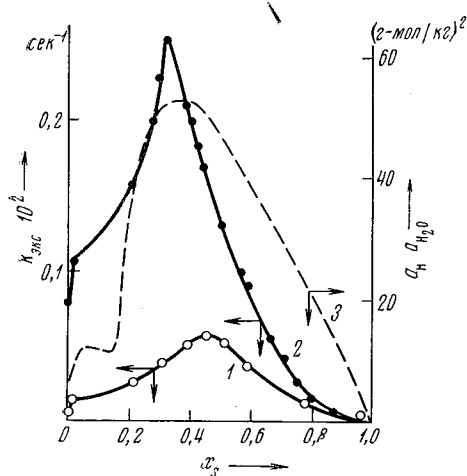


Рис. 2

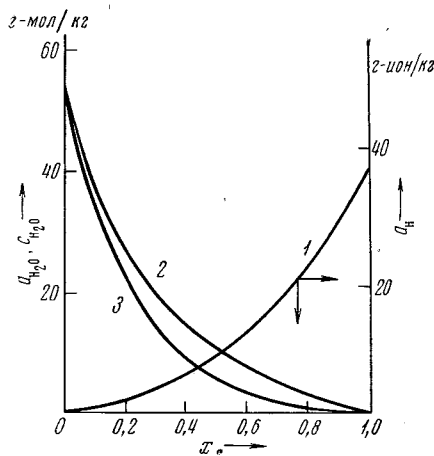


Рис. 3

дают. Согласно уравнению (1), $k_{\text{экс}}$ является функцией произведения $a_{\text{H}}^n \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}$, где $1 \leq n \leq 2$ для условий нашего эксперимента. На рис. 2 (кривая 3) показана зависимость функции $a_{\text{H}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}$ от x_s в 0,2460 М растворе кислоты. Следует отметить примечательное сходство кривой 3 с полученной на опыте зависимостью $k_{\text{экс}}$ от x_s (кривая 2).

Наглядную физическую картину обнаруженной зависимости $k_{\text{экс}}$ от x_s можно дать на основе следующих соображений. С увеличением x_s уменьшаются концентрация и коэффициент активности воды и, следовательно, уменьшается активность воды (рис. 3). Это может быть связано с ясно выраженной тенденцией к образованию комплексов между водой и ДМСО^(5, 6), поскольку водородная связь $\text{SO} \dots \text{HO}$ прочнее водородной связи $\text{HO} \dots \text{HO}$ ⁽⁷⁾. Так при $x_s \sim 0,3$ образуется соединение состава $(\text{CH}_3)_2\text{S} = \text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ^(5, 6). Сильное диполь-дипольное взаимодействие способно даже вызывать частичную ионизацию и образование ионной пары $\text{HO}^- \dots \text{HO} =$

$=\dot{S}(\text{CH}_3)_2$ (⁶). Уменьшение активности воды приводит к уменьшению сольватации ионов водорода, в результате чего их активность резко возрастает (рис. 3, см. также (²)). Это влечет за собой возрастание скорости реакции до тех пор, пока одновременное падение активности воды не оказывает существенного влияния на ход процесса. При определенных значениях x_s скорость реакции начинает лимитироваться активностью воды, что и приводит к уменьшению $k_{\text{экс}}$ с ростом x_s . ДМСО также заметно влияет на сольватацию различных ионизированных и неионизированных форм ЦФ, присутствующих в растворе, что приводит к изменениям K_1 и K_2 с ростом x_s . Кроме того, ДМСО способен изменять нуклеофильность агентов, участвующих в реакции. Что касается резкого увеличения $k_{\text{экс}}$ при малых x_s , то известно, что в присутствии неэлектролитов, особенно таких как ДМСО, на кривых зависимости свойств системы вода — неэлектролит от состава раствора наблюдаются изломы или изгибы в области $x < 0,2$. Рассчитанная зависимость $a_{\text{H}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}$ от x_s (рис. 2, кривая 3) имеет двойной излом в том же диапазоне значений x_s . Область с $x_s < 0,2$ для смесей воды с неводными растворителями относится к области стабилизации структуры воды (⁸), что приводит к аномально резкому возрастанию функции $a_{\text{H}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}$, а следовательно, и к аномально высокому увеличению $k_{\text{экс}}$ при малых значениях x_s .

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
23 VI 1972.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. I. Abrash, C. S. Cheung, J. C. Davis, *Biochemistry*, **6**, 1298 (1967).
² Д. Гехеб, Кандидатская диссертация, МГУ, 1971. ³ Р. Г. Бейтс, Определение рН, теория и практика, Л., 1968. ⁴ D. Geheb, N. F. Kasanskaja, I. W. Berezin, *Ber. Buns.-Ges. phys. Chem.*, **76**, 160 (1972). ⁵ J. J. Lindberg, J. Kenttamaa, *Suomen Kemistilehti*, **B33**, 104 (1960). ⁶ D. Martin, A. Weise, H. J. Nicolas, *Angew. Chem.*, **79**, 340 (1966). ⁷ Е. П. Соколова, Н. А. Смирнов, А. Г. Морачевский, *Химия и термодинамика растворов*, в. 1, Л., 1964. ⁸ В. И. Яшкичев, О. Я. Самойлов, *ЖСХ*, **3**, 211 (1962).