АКУСТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Том XXIX 1983 Вып. 6

УДК 534.286–14

МЕХАНИЗМЫ РЕАКЦИЙ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ НЕКОТОРЫХ АДЕНОЗИНФОСФАТОВ

Валаева С. Р., Зиновьев О. И.

На основании нового экспериментального материала по акустическим исследованиям водного раствора 3′, 5′ АМФ уточняется механизм реакций переноса протона в водных растворах 5′ АМФ, 5′ АДФ и 5′ АТФ при pH 5. Определены константы скоростей и объемные эффекты реакции переноса протона в водных растворах 5′ АДФ и 5′ АТФ при pH 5.

В ряде проведенных ранее исследований [1–6] показано, что акустическая релаксация в водных растворах аденозинфосфатов вызывается реакциями переноса протона, процессами ассоциации и конформационными превращениями молекул аденозинфосфатов. Эти процессы наблюдаются при различных pH и в разных областях акустического спектра. Большой интерес вызывают реакции переноса протона. Они протекают с временами релаксации $\tau \sim 10^{-8}$ *с*. Механизм этих реакций, даже для наиболее полно исследованного раствора 5′АМФ при pH 5, не вполне ясен. Как известно, ионы 5′АМФ в этом водном растворе находятся в различных состояниях *A*, *B*, *C* и *D*:

$$A \to N_1-R-PO_4^{2-},\ C \to N_1-R-PO_4H^-,\ B \to {}^+HN_1-R-PO_4^{2-},$$
$$D \to {}^+HN_1-R-PO_4H^-, \qquad (1)$$

где N_1 — наиболее способный к протонированию атом азота основания, *R* — неионизованная часть иона. Согласно работе [1], в акустическом спектре растворов 5′АМФ в области pH 5 наблюдается одиночный релаксационный процесс, обусловленный реакциями

$$\begin{array}{ccccc} & & A + H^+ + C & & \\ & \rightleftarrows & & \rightleftarrows & \\ A + D & & \rightleftharpoons & & 2C \rightleftarrows C_2 \end{array} \qquad (2)$$

Перенос протона осуществляется как через растворитель, так и при взаимодействии различно ионизованных форм *A* и *D*. В то же время авторы работы [4] считают, что акустическая релаксация, наблюдаемая в водном растворе 5′АМФ при pH 5 обусловлена реакцией $A+D \rightleftharpoons 2C$. Таким образом, ни реакция ионизации ($C \rightleftharpoons A+H^+$), ни реакция димеризации ($2C \rightleftharpoons C_2$) в этих условиях не вносят вклада в поглощение звука.

Анализ проблемы, выполненный нами [6], показывает, что все три реакции (2) в рассматриваемых условиях можно с хорошей степенью точности считать нормальными [7]. Реакция $A+H^++C \rightleftharpoons 2C$ не может обусловливать наблюдаемый релаксационный процесс, так как с ее помощью не удается описать данные акустического эксперимента. Для ответа на вопрос о том, каков вклад реакций димеризации в наблюдаемый релаксационный процесс нужны дополнительные исследования. Поэтому нами были изучены акустические спектры растворов 3′, 5′АМФ. Молекулы циклического аденозинфосфата отличаются от молекул 5′АМФ тем, что в них отсутствует протон, способный в области pH 5 к протонированию атома N_1 азотистого основания. Следовательно, в растворе 3′, 5′АМФ должны протекать все те же процессы, что и в растворах 5′АМФ за исключением протонирования. Эксперимент показал отсутствие акустической релаксации в водном растворе 3′, 5′АМФ при pH 5 в диапазоне частот 0,8–10 МГц. Область акустической релаксации намечается при более низких часто-

тах [8]. Таким образом, если бы наблюдаемая нами акустическая релаксация в водных растворах 5′АМФ (и других аденозинфосфатов) обуславливалась процессами возникновения и разрушения ассоциатов, возникающих за счет взаимодействия незаряженных основных частей молекулы, то она должна была бы иметь место и в водном растворе 3′, 5′АМФ. Отсутствие акустической релаксации в водном растворе 3′, 5′АМФ при pH 5 доказывает, что наблюдаемый релаксационный процесс не связан со «стопочной» ассоциацией за счет взаимодействий между адениновыми основаниями молекул. Поэтому реакции димеризации также не дают вклада в наблюдаемую акустическую релаксацию.

Итак, проведенные нами дополнительные исследования подтвердили выводы авторов работы [4] о том, что акустическая релаксация, наблюдаемая в водных растворах 5′АМФ при pH 5, обусловлена только реакцией межмолекулярного переноса протона при непосредственном взаимодействии ионов:

$$A+D \rightleftharpoons 2C. \qquad (3)$$

Перейдем к обсуждению механизма реакций, обусловливающих акустическую релаксацию в водных растворах 5′АДФ и 5′АТФ в области pH 5. В выполненных ранее акустических исследованиях водных растворов 5′АДФ и 5′АТФ [2, 8, 9] обнаружена (в диапазоне частот 0,8—10 МГц) одна простая область акустической релаксации. Для этих растворов она лежит в том же диапазоне частот, что и для водных растворов 5′АМФ в области pH 5. Величина акустического поглощения зависит от pH раствора. Максимальное поглощение ультразвука соответствует pH 5. При этом pH молекулы 5′АДФ и 5′АТФ в водном растворе могут находиться в следующих четырех, различно ионизованных состояниях: A', B', C', D' (5′АДФ) и A'', B'', C'', D'' (5′АТФ). Эти ионизованные формы те же, что и в водном растворе 5′АМФ (1) (отличие их только в R — неионизованной части молекул, т. е. ионы A, A', A''; B, B', B'' и т. д. однотипны). Перечисленные факты и анализ зависимости акустического поглощения от pH растворов показывают, что механизм реакций, обусловливающих наблюдаемую акустическую релаксацию в водных растворах 5′АДФ и 5′АТФ в области pH 5, тот же, что и в водном растворе 5′АМФ. Иначе говоря, акустическая релаксация обусловлена реакциями межмолекулярного переноса протона:

$$5'\text{АДФ}: \quad A'+D' \underset{k'}{\overset{k}{\rightleftharpoons}} 2C', \qquad (4)$$

$$5'\text{АТФ}: \quad A''+D'' \underset{k'}{\overset{k}{\rightleftharpoons}} 2C''. \qquad (5)$$

На основании уравнений (4) и (5), закона действующих масс, уравнения материального баланса и полученной нами экспериментальной зависимости частот релаксации от концентрации 5′АДФ и 5′АТФ определены константы скоростей, объемные эффекты и концентрации реагентов реакций (4) и (5). Полученные значения представлены в таблице.

Проиллюстрируем расчет этих параметров на примере 5′АТФ. Исполь-

Таблица

Характеристики реакций переноса протона в водных растворах 5′АДФNa$_2$ и 5′АТФNa$_2$ при pH 5 и =22° С.

Раствор	C_0, М	$k\cdot10^{-9}$, л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$	$k'\cdot10^{-6}$, л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$	$C_{A'}$, М	$C_{C'}$, М	$C_{C_1'}$, М	$C_{C_2'}$, М	$C_{Д'}$, М	$\lvert\Delta V\rvert$
	0,03	3	7	0,001	0,026	0,026	—	0,003	24
5′АДФNa$_2$	0,04	3	7	0,001	0,035	0,030	0,003	0,003	23
	0,06	3	7	0,001	0,053	0,039	0,007	0,004	25
				$C_{A''}$	$C_{C''}$	$C_{C_1''}$	$C_{C_2''}$	$C_{D''}$	
	0,02	3	8	0,001	0,018	0,018	—	0,001	16
5′АТФNa$_2$	0,03	3	8	0,001	0,027	0,027	—	0,002	22
	0,06	3	8	0,002	0,054	0,037	0,008	0,002	24

зуя общее выражение для времени релаксации [10]

$$1/\tau = k \prod_i C_i^{\nu_i} \sum_i \frac{\Delta\nu_i^2}{C_i}, \qquad (6)$$

где k — константа скорости прямой (или обратной) реакции, C_i — концентрации реагентов прямой (или обратной) реакции, ν_i — соответствующие стехиометрические коэффициенты, получим для реакции (5)

$$1/\tau = k' C_{C''} (C_{C''}/C_{A''} + C_{C''}/C_{D''} + 4) \qquad (7)$$

Концентрации форм $C_{C''}$, $C_{A''}$, $C_{D''}$, входящие в уравнение (7), оценим, исходя из данных о pK_N ($pK = -\lg K$) и pK_{P_2} [2] ($pK_N = 4{,}2 \pm 0{,}1$; $pK_{P_2} = 6{,}8 \pm 0{,}1$). При 22° С и pH=5,45±±0,05 (при этом pH наблюдается максимум акустического поглощения) получаем

$$C_{C''}/C_{A''} = 22{,}1, \quad C_{C''}/C_{D''} = 17{,}8. \qquad (8)$$

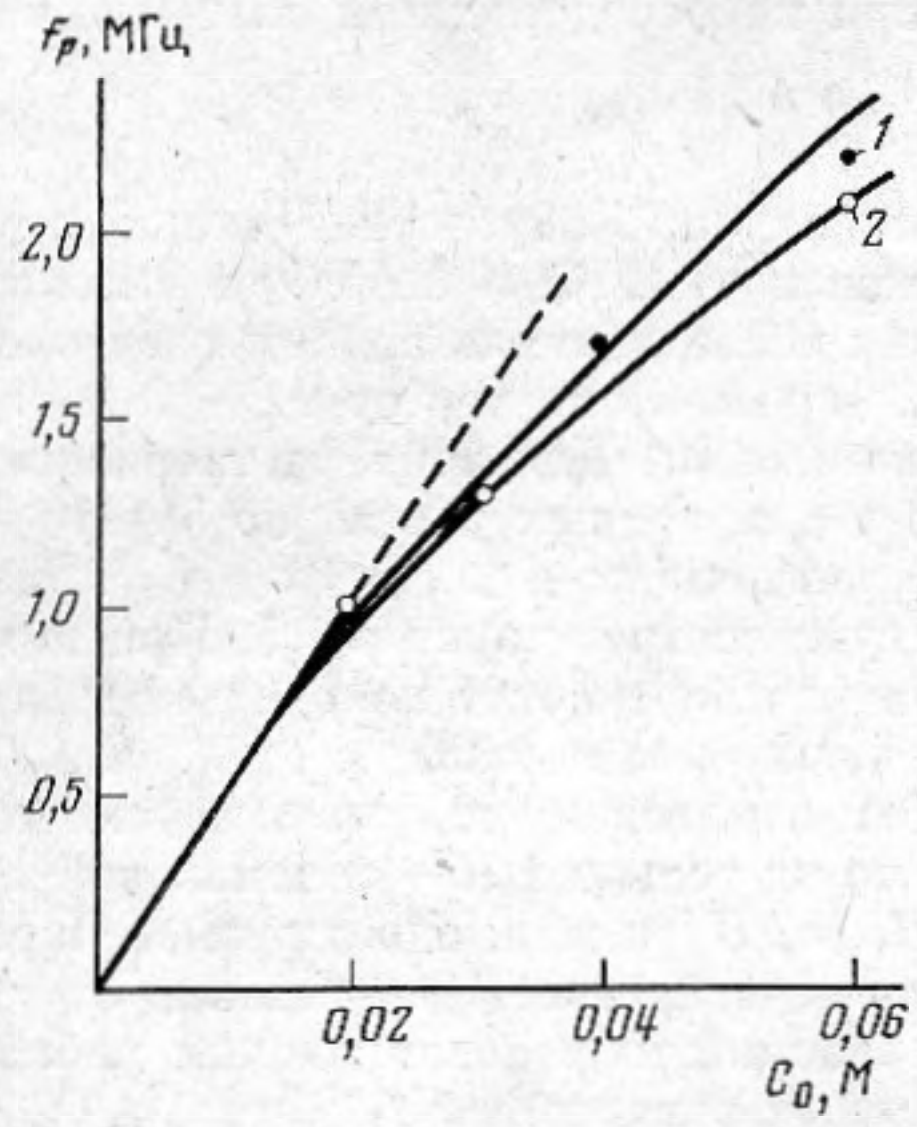
Учитывая это, имеем

$$1/\tau = 44 k' C_{C''}. \qquad (9)$$

Из уравнения материального баланса, с учетом (8), следует

$$C_0 = C_{A''} + C_{C''} + C_{D''} = 1{,}1 C_{C''}. \qquad (10)$$

Величина $C_{C''}$ отличается от C_0 на 10%. Поэтому в пределах погрешности эксперимента мы должны были бы наблюдать линейную зависимость $1/\tau$ от C_0. Полученная нами экспериментальная зависимость $1/\tau$ от C_0 представлена на фигуре. Из фигуры видно, что линейность имеет место лишь до концентраций $C_0 \leqslant 0{,}02$ М. Далее наблюдается отклонение от линейности, которое увеличивается с увеличением концентрации 5′АТФ в растворе. В рамках нашей схемы можно объяснить это отклонение от линейности влиянием реакции димеризации той формы, концентрация которой наиболее велика, т. е. формы C'' (8). Как было сказано выше, анализ эксперимента по исследованию циклического аденозинфосфата показывает, что реакция $2C_{C_1''} \rightleftharpoons C_{C_2''}$ не проявляется в акустическом спектре в исследуемом диапазоне частот и pH. Здесь мы учитываем лишь влияние димеризации на концентрацию ионизованных форм. Используя линейную часть графика зависимости f_P от C_0 (фигура), определяем k' с помощью следующей системы уравнений:



Зависимость частоты релаксации f_P от концентрации C_0 нуклеотида в растворе. Сплошные кривые построены теоретически. t=22° С, pH 5; 1–5′АДФNa$_2$, 2 – 5′АТФNa$_2$

$$1/\tau_1 = 44 k' C_{C''}, \quad C_0 = 1{,}1 C_{C''}. \qquad (11)$$

Здесь τ_1 и C_0 определяются из линейной части графика (фигура). Для определения $C_{A''}$, $C_{D''}$, $C_{C''}$, $C_{C_1''}$, $C_{C_2''}$ составим следующую систему уравнений:

$$\left.\begin{aligned} &1/\tau_2 = 44 k' C_{C_1''}, && K_{P_2} = \frac{C_{A''} C_{\text{H}}}{C_{C''}}, \\ &C_{C''} = C_{C_1''} + 2C_{C_2''}, && C_0 = C_{A''} + C_{C_1''} + C_{D''} + 2C_{C_2''}. \\ &K_N = \frac{C_{C''} C_{\text{H}}}{C_{D''}}. \end{aligned}\right\} \qquad (12)$$

Здесь τ_2 — экспериментально измеренные величины времен релаксации,

соответствующие нелинейной части графика зависимости $1/\tau$ от C_0 (фигура). Результаты (11) и (12) представлены в таблице.

Для оценки объемного эффекта реакции (5) используем выражение для релаксационной силы [10]

$$\varepsilon=\rho v_0^2(\Delta V-(V_M\theta\Delta H)/C_P^0)^2[RT(1/C_{A''}+1/C_{D''}+4/C_{C''})]^{-1}, \quad (13)$$

где ρ — плотность раствора, v_0 — скорость звука при $\omega\to 0$, ΔV — объемный эффект реакции, обусловливающей акустическую релаксацию, ΔH — энтальпия реакции, θ — коэффициент температурного расширения, V_M — молярный объем раствора, C_P^0 — теплоемкость при постоянном давлении. Поскольку данные о θ и C_P^0 для водных растворов 5′АТФ и 5′АДФ в литературе отсутствуют, мы положили их равными соответствующим значениям для воды [11]. Тепловой эффект реакции оценили, воспользовавшись данными, приведенными в [12]. Проведя такую оценку, получили, что $V_M\theta\Delta H/C_C^0\sim 1$ см$^3\cdot$моль$^{-1}$. Вычисленные значения объемных эффектов представлены в таблице.

Используя полученные результаты, метод наименьших квадратов, строим по уравнениям (7)—(12) теоретическую кривую, наиболее близко воспроизводящую экспериментальную зависимость частоты релаксации f_P от концентрации C_0 (фигура). При этом получили следующие значения для константы реакции димеризации: $K_{5'\text{АДФ}}=4\ M^{-1}$ и $K_{5'\text{АТФ}}=6\ M^{-1}$. Полученные значения по порядку величины согласуются с [13].

Для определения констант скоростей k при разных температурах надо знать зависимость константы равновесия K от температуры. Воспользовавшись такой зависимостью, приведенной в [12, 14], получили следующие значения констант скоростей для реакций (4) и (5): для 5′АДФNa$_2$ при $t=5°$ С $k=2\cdot 10^9$ л$\cdot$моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$, $k'=7\cdot 10^6$ л$\cdot$моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$, при $t=50°$ С $k=4\cdot 10^9$ л$\cdot$моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$, $k'=7\cdot 10^6$ л$\cdot$моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$; для 5′АТФNa$_2$ при $t=5°$ С $k=2\cdot 10^9$ л$\cdot$моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$, $k'=7\cdot 10^6$ л$\cdot$моль$^{-1}\cdot$с$^{-1}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lang J., Sturm J., Zana R.* Ultrasonic absorption in aqueous solutions of nucleotides and nucleosides. 11. Kinetics of protn exchange in 5'AMP.— J. Phys. Chem., 1974, v. 78, № 1, p. 80–86.
2. *Lang J., Viv S., Zana R.* Ultrazonic absorption and Kinetics of proton exchange in solutions of 5'ADP and 5'ATP.— Acoustical Soc. of Amer., Suppl. № 1, 1975, v. 57.
3. *Брагинская Ф. И.* Изучение релаксационных процессов в водных растворах нуклеозидов методом ультразвуковой спектроскопии.— Акуст. ж., 1974, т. 20, № 5.
4. *Rhodes L. M., Schimmel P. R.* Intermolecular proton transfer reaction between base and phosphate moieties of mononucleotides in solution.— J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 8, p. 2609–2611.
5. *Hemmes P., Oppenheimer L., Frank J.* Ultrasonic Relaxation Evaluation of the Thermodynamics of Syn-Anti Glycosidic Isomerization in Adenosine.— J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 19, p. 6023–6026.
6. *Зиновьев О. И., Валаева С. Р., Пулатова Л. Ф., Куранов К. В.* Акустическая спектроскопия — метод изучения кинетики реакций переноса протона в водных растворах некоторых биологически активных веществ.— В кн.: Современные проблемы физической химии. М.: Изд-во МГУ, 1980, т. 12, с. 219–231.
7. *Шахпаронов М. И.* Механизмы быстрых процессов в жидкостях. М.: Высшая школа, 1980, с. 44–48.
8. *Валаева С. Р.* Исследование водных растворов аденозинфосфатов методами акустической спектроскопии.— Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 1980.
9. *Артыков А. А., Валаева С. Р., Зиновьев О. И., Сарвазян А. П., Шахпаронов М. И.* Акуст. ж., 1983, т. 29, № 5, с. 585–589.
10. *Бауэр Г.* Феноменологическая теория релаксационных явлений в газах.— В кн.: Физическая акустика / Под ред. Мэзона У. Т. 2, ч. А. М.: Мир, 1968, с. 61–151.
11. Справочник химика. Т. 3. М.: Химия, 1965.
12. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И.* Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970, с. 192–193.
13. *Сухоруков Б. И., Гуковский И. Я., Петров А. И., Гуковская А. С., Маевский А. А., Гусенкова Н. М.* Внутри- и межмолекулярные взаимодействия и самоорганизация азотистых оснований нуклеотидов и полинуклеотидов в упорядоченные структуры. Влияние ионизации и солевого состава среды. Пущино, 1979. 17 с. Препринт, НЦБИ АН СССР в Пущине.
14. *Карапетянц М. Х.* Химическая термодинамика. М.: Химия, 1975, с. 391.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова
химический факультет

Поступила в редакцию
2.VII.1981
после исправления
23.XI.1982