



УДК 541.124/128

ГИДРОЛИЗ *n*-НИТРОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ КАРБОНОВЫХ
КИСЛОТ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ НУКЛЕОФИЛЬНЫМ
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМ ВЕЩЕСТВОМ.
МИЦЕЛЛЯРНАЯ МОДЕЛЬ ДЕЙСТВИЯ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ*

*Левашов А. В., Мартинек К., Мевх А. Т.,
Дмитриева М. П., Березин И. В.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

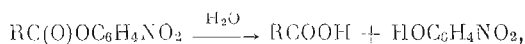
Изучен катализ мицеллами бромистого октадецилдиэтилоксиэтиламмония реакции гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров *N*-карбобензокси-*L*-тирозина и уксусной, валериановой и энантиовой кислот. Найдено, что механизм этой реакции включает в себя следующие стадии: гидрофобное связывание субстрата мицеллами — процесс, аналогичный образованию комплекса Михаэлиса в ферментативных реакциях; ацилирование алкоксильной группы в молекуле ПАВ сорбированным субстратом — процесс, аналогичный образованию ацилфермента, и гидролиз промежуточного ацилдетергента — процесс, аналогичный регенерации фермента. Исследованная мицеллярная реакция моделирует действие сериновых протеиназ как по механизму и его кинетическим проявлениям, так и по масштабам наблюдаемых ускорений.

Успехи в познании механизмов ферментативных реакций стимулируют в настоящее время создание искусственных многофункциональных катализаторов, воспроизводящих принципы действия ферментов [1, 2]. С этой точки зрения особый интерес представляет мицеллярный катализ [3], обнаруживающий ряд сходных черт с катализом ферментами. В данной статье описан катализ гидролитической реакции под действием функциональных мицелл ПАВ, содержащего алифатическую гидроксильную группу. Эту систему можно рассматривать как модель действия сериновых протеиназ, поскольку в активном центре этих ферментов атакующим нуклеофилом является гидроксильная группа остатка серина [4, 5]. Основная задача, поставленная в данном исследовании, сводится к тому, чтобы изучить реакционную способность алифатической гидроксильной группы, функционирующей в частично дегидратированной и относительно аполярной среде мицелл ПАВ. Как известно, мицеллярная среда по многим характеристикам напоминает среду поверхностного слоя белковых глобул [6, 7].

Нами был исследован катализируемый мицеллами бромистого октадецилдиэтилоксиэтиламмония $C_{13}H_{27}(C_2H_5)_2N^+CH_2CH_2ONBr^-$ гидролиз ря-

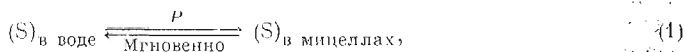
* Сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество; Н-ПАВ — нуклеофильное ПАВ (бромистый октадецилдиэтилоксиэтиламмоний); АН-ПАВ — ацилированное производное Н-ПАВ (ацилдетергент); ККМ — критическая концентрация мицеллообразования.

да *n*-нитрофениловых эфиров:

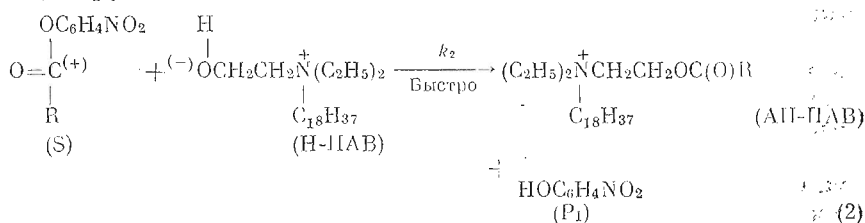


где R = CH₃, CH₃(CH₂)₂, CH₃(CH₂)₅, N-карбобензоксиг-*L*-тирозил. Ранее было обнаружено, что введение гидроксильной группы в молекулу катионного ПАВ приводит к заметному усилению мицеллярного катализа в реакциях гидролиза *n*-нитрофенилкарбоксилатов [8, 9]. Однако для объяснения наблюдаемого ускорения были предложены лишь гипотетические и противоречивые механизмы (ср. [10] и [11]). В предварительном сообщении [12] нами было показано, что алифатическая гидроксильная группа используемого мицеллообразующего ПАВ обнаруживает резко выраженные нуклеофильные свойства.

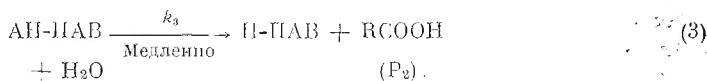
Химический механизм гидролиза. В условиях, когда начальная концентрация сложного эфира (*n*-нитрофенилгептанат) намного больше исходной концентрации мицеллообразующего нуклеофила, кинетика реакции гидролиза обнаруживает две фазы. Это видно по характеру кривых «продукт — время» (рис. 1, а): сначала происходит быстрый «выброс» *n*-нитрофенола, за которым следует более медленный процесс. Такую кинетическую картину можно было бы объяснить, например, тем [13], что продукты реакции (*n*-нитрофенол или гептановая кислота) ингибируют мицеллярный катализ. Однако мы убедились, что характер кинетики не изменяется, если добавить новую порцию субстрата в реакционную смесь, в которой уже завершилась реакция. В свою очередь полученный результат (двухфазная кинетика реакции, рис. 1, а) находит объяснение в рамках механизма, когда сложный эфир (S), будучи сольubilизированным мицеллой



сначала ацилирует ее:



Затем на последующей, более медленной стадии гидролизует промежуточный продукт — ацилдетергент:

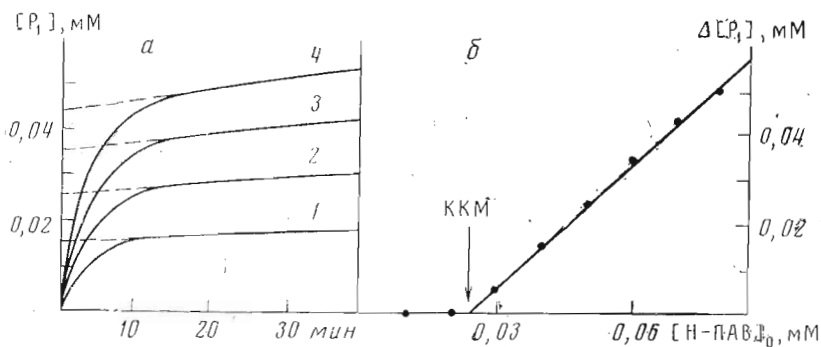


Кинетическое описание механизма (1) — (3) приводит к следующему уравнению для зависимости концентрации продукта P₁ от времени (см. раздел «Используемые кинетические уравнения»):

$$[P_1] = c(1 + k_{3, \text{м}}t), \quad (4)$$

где *c* — исходная концентрация Н-ПАВ за вычетом ККМ, т. е. *c* = [Н-ПАВ]₀ — ККМ, и *k*_{3, м} — константа скорости псевдопервого порядка для лимитирующей скорости стадии (3), протекающей в мицеллах. Теоретическое уравнение (4) адекватно описывает экспериментальные кривые зависимости [P₁] от *t* (рис. 1, а). На это указывают следующие два факта:

1) *n*-нитрофенол (продукт P₁), соответствующий первоначальному его «выбросу» (отрезок на оси ординат, см. рис. 1, а), образуется в эквимолярном количестве по отношению к исходной концентрации Н-ПАВ в



Вис. 1. Кинетика образования *n*-нитрофенола (P_1) при гидролизе *n*-нитрофенилгептаноата в присутствии мицелл Н-ПАВ (а) и зависимость количества первоначального «выброса» *n*-нитрофенола (по отрезкам на оси ординат, см. рис. 1, а) от концентрации Н-ПАВ (б). Условия опыта: 30°, 0,02 М боратный буфер, рН 8,5, 0,02 М КСl; 1% (по объему) диметилсульфоксид; $[S]_0 = 2,5 \cdot 10^{-4}$ М, $[Н-ПАВ]_0 \cdot (10^{-5}$ М): 1—4, 2—5, 3—6, 4—7

мицеллах. Это видно на рис. 1, б, на котором наклон прямой, описывающей зависимость между этими величинами, равен ~ 1 . Это означает, что в первой (предстационарной) фазе гидролиза происходит полное ацилирование мицелл *;

2) скорость более медленной (стационарной) фазы процесса полностью определяется гидролизом промежуточного ацилдетергента (АН-ПАВ). Чтобы показать это, мы специально синтезировали гептаноилпроизводное Н-ПАВ и измеряли эффективную константу скорости его гидролиза при концентрации гептаноил-Н-ПАВ больше ККМ. Найденное значение совпадает в пределах ошибок эксперимента с величиной, которая в соответствии с уравнением (4) следует из стационарной скорости суммарного процесса (1) — (3), измеренной по наклону линейного участка любой из кривых на рис. 1, а ** (табл. 1, значения $k_{3, м}$).

Следовательно, можно считать доказанным, что при гидролизе сложного эфира на нуклеофильных мицеллах образуется промежуточный ацилдетергент и его деацилирование (гидролиз) — стадия, лимитирующая скорость.

Механизм мицеллярного катализа на стадии образования ацилдетергента. Скорость гидролиза *n*-нитрофенилкарбоксилатов существенно зависит от концентрации ПАВ (рис. 1). Для того чтобы проанализировать эту зависимость, мы изучили скорость исследуемой реакции в условиях, когда начальная концентрация сложного эфира намного меньше исходной концентрации мицеллообразующего нуклеофила. Очевидно, при таком соотношении концентраций реагентов наблюдаемая в опыте скорость выделения *n*-нитрофенола не осложнена гидролизом промежуточного ацилдетергента и характеризует только ацилирование мицелл. Более того, при $[S]_0 \ll [Н-ПАВ]_0$ легко соблюдается важное для теоретического анализа

* Обращает на себя внимание тот факт, что некоторое количество Н-ПАВ в концентрации, близкой к ККМ, остается неацилированным, хотя можно было бы предполагать, что за счет быстрого обмена ПАВ между водой и мицеллами [3] все Н-ПАВ ацилируются полностью. По-видимому, образующиеся новые мицеллы, состоящие из АН-ПАВ, характеризуются очень плохой солюбилизующей способностью. С этой точки зрения можно также объяснить отсутствие каталитического эффекта мицелл АН-ПАВ в реакции щелочного гидролиза *n*-нитрофенилгептаноата.

** Кинетика мицеллярной реакции (1) — (3) в принципе могла бы быть осложнена щелочным гидролизом исходного *n*-нитрофенилового эфира, который, как известно, катализируется обычно катионными мицеллами [3, 7]. Однако мы убедились, что мицеллы синтезированного ацилдетергента (гептаноилпроизводного Н-ПАВ) не оказывают практически никакого влияния на щелочной гидролиз *n*-нитрофенилгептаноата.

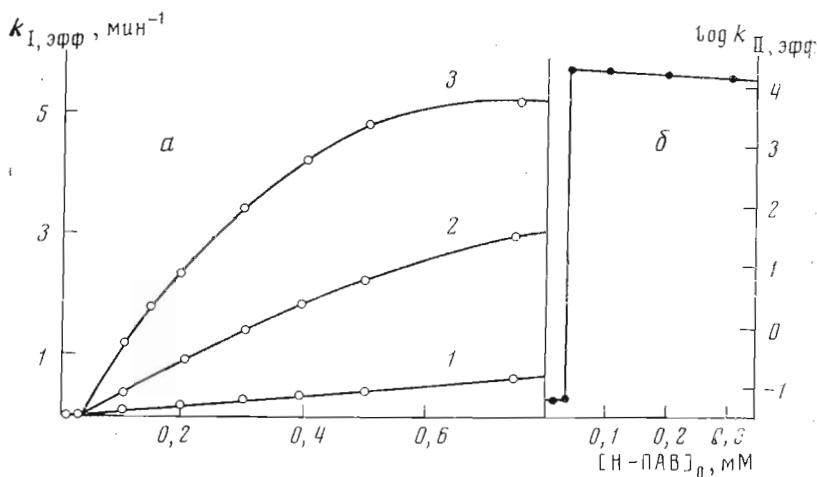


Рис. 2. Зависимость от концентрации Н-ПАВ эффективной константы скорости псевдопервого порядка алкоголиза *n*-нитрофениловых эфиров уксусной (1), валериановой (2) и энантовой (3) кислот (а), а также эффективной константы скорости второго порядка ($M^{-1} \text{ мин}^{-1}$) алкоголиза *n*-нитрофенилгептаноата (б). Условия опыта: 30°, рН 8,5 (0,02 М боратный буфер), 0,02 М КСl, 1% (по объему) диметилсульфоксид, $[S]_0 = (1-4) \cdot 10^{-5} \text{ М}$

[3] условие о разбавленных растворах реагентов как в водной, так и, что не менее важно, в мицеллярной «фазах». Как видно на рис. 2, а, ниже ККМ реакция практически не идет, а выше ККМ наблюдается существенное ускорение реакции, причем зависимость наблюдаемой константы скорости псевдопервого порядка ($k_{I,эфф}$, измеренной при $[S]_0 \ll \ll [N-PAB]_0$) от концентрации мицеллообразующего нуклеофила имеет вид кривой с насыщением. Масштаб эффекта, обусловленного мицеллообразованием одного из реагентов, показан на рис. 2, б, где в логарифмической шкале дана зависимость эффективной константы скорости второго порядка ($k_{II,эфф} = k_{I,эфф} / c$) от концентрации Н-ПАВ. Значение $k_{II,эфф}$ 0,0625 $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$, соответствующее реакции ниже ККМ, оценили, используя в качестве нуклеофила триэтилоксиэтиламмоний ($\text{Et}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), структурный аналог Н-ПАВ, не образующий мицелл. Как видно на рис. 2, б, в результате мицеллообразования эффективная константа скорости второго порядка возрастает более чем в 10^5 раз и принимает значение $k_{II,эфф}$ $1,9 \cdot 10^4 M^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Затем величина $k_{II,эфф}$ при возрастании концентрации Н-ПАВ снижается.

Все эти факты могут быть объяснены в рамках кинетической теории мицеллярного катализа [3, 14–16]. Механизм катализа можно приписать, как будет показано далее, в основном двум эффектам: концентрированию реагентов в мицеллах и кажущемуся сдвигу pK_a нуклеофила под действием поверхностного заряда мицеллы.

Согласно теории [3, 14–16], эффективную константу скорости псевдопервого порядка ацилирования Н-ПАВ, находящегося в мицеллах, можно записать при условии $[S]_0 \ll [N-PAB]_0$ в следующем виде:

$$k_{I,эфф} = \frac{k_{2,м} K_c}{V(1 + K_c)}, \quad (5)$$

где

$$k_{2,м} = \frac{k_{2,м}^0}{1 + [H^+]_в / K_{a, \text{каж}}}, \quad (6)$$

$$K_{a, \text{каж}} = K_{a, м} / P_{H^+} \quad (6')$$

(см. раздел «Используемые кинетические уравнения»).

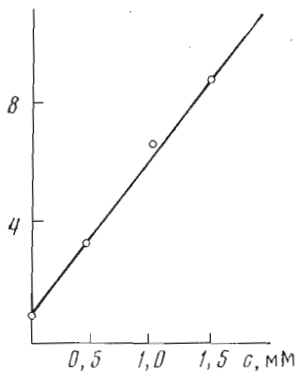
$S_{m, \delta} / S_{\delta}$ 

Рис. 3. Солюбилизация *n*-нитрофенилпентадата в водных растворах Н-ПАВ. Условия опыта: 30°, 0,02 М ацетатный буфер, рН 5,5, 1%¹⁰ (по объему) диметилсульфоксид

Ниже ККМ для величины $k_{1, \text{эфф}}$ справедливо более простое уравнение:

$$(k_{1, \text{эфф}}) \text{ в отсутствие мицелл} = k_{2, \text{в}} [\text{Н-ПАВ}]_0, \quad (7)$$

где $k_{2, \text{в}} = k_{2, \text{в}}^0 / (1 + [H^+]_{\text{в}} / K_{a, \text{в}})$. В последних уравнениях $k_{2, \text{в}}^0$ — константа скорости второго порядка ацилирования диссоциированной (анионной) формы нуклеофила, $K_{a, \text{в}}$ — соответствующая константа диссоциации, $P_{\text{Н}^+}$ — коэффициент распределения ионов водорода между водной и мицеллярной «фазами», V — мольный объем ПАВ и K — константа связывания сложного эфира мицеллами, равная $(P - 1)V$; индексы *m* и *v* обозначают принадлежность той или другой величины соответственно к мицеллярной или водной «фазам».

Из уравнений (5) — (7) вытекает, что ускорение реакции, наблюдаемое в присутствии мицелл, теоретически выражается следующим образом:

$$\frac{k_{11, \text{эфф}}}{(k_{11, \text{эфф}}) \text{ в отсутствие мицелл}} = \frac{k_{1, \text{эфф}}/c}{(k_{1, \text{эфф}}/[\text{Н-ПАВ}]_0) \text{ в отсутствие мицелл}} = \frac{k_{2, \text{м}}^0}{k_{2, \text{в}}^0} \cdot \frac{K}{V(1 + Kc)} \cdot \frac{K_{a, \text{м}}}{K_{a, \text{в}} P_{\text{Н}^+}}, \quad (8)$$

что справедливо при $pH \ll pK_{a, \text{кж}}$ и $pK_{a, \text{в}}$ и является обычным условием опыта (pH 8,5, рис. 5). В правой части уравнения (8) множитель (а) отражает изменение реакционной способности аниона нуклеофила (Н-ПАВ) при переносе его из воды в среду мицеллы; множитель (б) — вклад, который в наблюдаемое ускорение вносит концентрирование реагентов в мицеллах, и множитель (в) соответствует кажущемуся сдвигу $pK_{a, \text{нуклеофила}}$. Рассмотрим величины каждого из этих факторов по отдельности.

Концентрирование реагентов определяется фактически равновесием (1). Распределение реагента между водой и мицеллами можно изучить в независимом от кинетики опыте, исследуя, например [3], зависимость растворимости субстрата *S* от концентрации мицеллообразующего нуклеофила (при низких значениях рН, когда реакция ацилирования практически не идет). Экспериментальные данные представлены на рис. 3. Из тангенса угла наклона прямой можно найти константу связывания (*K*) сложного эфира с мицеллами, как это следует из уравнения (12). Найденное значение *K* приведено в табл. 1.

В результате связывания происходит фактически концентрирование сложного эфира вблизи мицеллообразующего нуклеофила. В области высоких концентраций Н-ПАВ следует ожидать, что практически все молекулы сложного эфира находятся в мицеллах. Это положение и находит отражение в том, что при высоких концентрациях Н-ПАВ эффективная константа скорости псевдопервого порядка достигает максимального (и постоянного) значения (рис. 2, а). Эффект насыщения прослеживается также и в рамках теоретического уравнения (5), показывающего, что константа связывания *K* может быть найдена как абсцисса точки, соответствующей половине максимальной скорости реакции (рис. 4, а). Более точным, однако, представляется подход, аналогичный методу Лайнуивера — Берка (см. раздел «Экспериментальная часть»). На рис. 4, б приведены экспериментальные данные (рис. 4, а) в координатах уравнения (19),

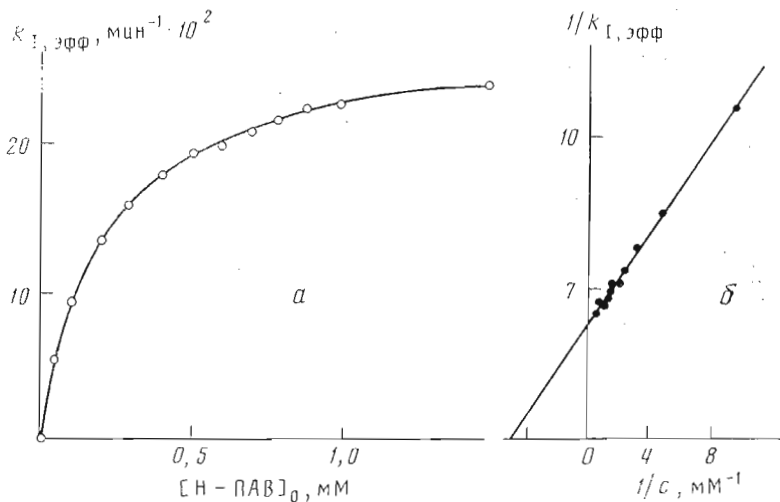


Рис. 4. Зависимость от концентрации Н-ПАВ эффективной константы скорости псевдопервого порядка реакции алкоголиза *n*-нитрофенилгептаоата (а) и линейная анаморфоза кривой на рис. а в координатах уравнения (19) (б). Условия опыта: 30°, 0,02 М боратный буфер, рН 8,5, 0,2 М KNO_3 , 1% (по объему) диметилсульфоксид, $[\text{S}]_0 = 0,03$ мМ

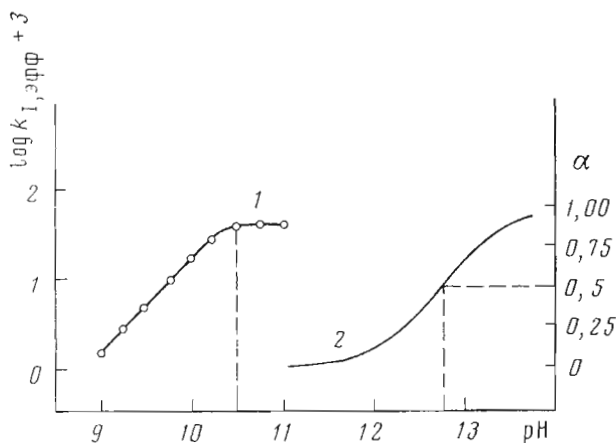


Рис. 5. Зависимость эффективной константы скорости псевдопервого порядка реакции алкоголиза *n*-нитрофенилацетата в присутствии мицелл Н-ПАВ от рН (1) и кривая потенциометрического титрования бромистого триэтилоксиэтиламмония (1М) при 30° (2). 1. Условия опыта: 30°, 0,02 М боратный буфер, 1% (по объему) диметилсульфоксид, $[\text{S}]_0 = 0,04$ мМ, $[\text{H-ПАВ}]_0 = 0,1$ мМ. 2. На оси ординат отложена степень нейтрализации (α)

приведенного в разделе «Экспериментальная часть». Соответствующие константы K и $k_{2,м}/V$, найденные по наклону прямой и отрезку, отсекаемому на оси абсцисс, сведены в табл. 1.

При обсуждении данных, приведенных в табл. 1, прежде всего необходимо подчеркнуть хорошее соответствие величин констант связывания K , найденных разными методами. Это указывает на справедливость теоретического уравнения (5)*. Следовательно, на основании уравнения (8)

* В уравнении (5) коэффициент распределения R_{H^+} в принципе не постоянная величина, а зависит от концентрации противоионов и, следовательно, от c [3, 15]. Чтобы избежать этого осложняющего влияния, значения K из кинетических данных (в рамках уравнения (5)) нами были определены при высокой ионной силе раствора (0,2 М KNO_3 ; рис. 4), когда поверхностный заряд катионных мицелл практически полностью нейтрализован [16, 18].

можно оценить тот вклад, который вносит в катализ сближение реагентов, обусловленное фактически концентрированием сложного эфира в нуклеофильных мицеллах. Вычисление множителя (b), входящего в уравнение (8), приводит к ускорению в $1,25 \cdot 10^4$ раз (при $c \rightarrow 0$ и принимая $V = 0,4$ по аналогии с другими ПАВ [17]).

Кажущийся сдвиг pK_a нуклеофила на мицеллах обусловлен прежде всего тем, что в поверхностном слое катионных мицелл понижена концентрация ионов водорода по сравнению с окружающим мицеллы буферным раствором и, следовательно, $pH_+ < 1$ (см. уравнение (6') и более подробно работу [3]). Кажущееся значение pK_a для Н-ПАВ в мицеллах нами было найдено из зависимости мицеллярного гидролиза *n*-нитрофенилацетата от pH. Анализ кривой 1 на рис. 5 в рамках уравнений (5) — (6) приводит к величине $pK_{a, \text{каж}} \approx 10,5 \pm 0,5$ (среднеарифметическая ошибка по данным трех серий измерений). Значение $pK_{a, \text{в}}$ было найдено методом потенциометрического титрования бромистого триэтилоксиэтиламмония ($\text{Et}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ONHBr}^-$). Это соединение, являющееся структурным аналогом Н-ПАВ, не содержит октадецильной группы и поэтому не образует мицелл. Из кривой 2 на рис. 5 следует значение $pK_{a, \text{в}} \approx 12,8 \pm 0,3$ (среднеарифметическая ошибка по данным 5 измерений). Индукционное влияние заряженного атома азота приводит к тому, что найденное значение $pK_{a, \text{в}}$ по крайней мере на единицу меньше значений, свойственных алифатическим спиртам [11], но, в свою очередь, оно превышает более чем на полторы единицы значение $pK_{a, \text{каж}}$, характеризующее диссоциацию нуклеофила в мицеллах. Этот кажущийся сдвиг pK_a и вносит свой вклад в ускорение реакции, наблюдаемое при образовании мицелл (выше ККМ, рис. 2), как это следует из уравнения (8) (см. множитель b). Величина кажущегося сдвига pK_a , обусловленного переносом нуклеофила из воды в среду мицеллы, не выходит за рамки значений pH_+ (порядка 0,1—0,01), ожидаемых для катионных мицелл [3]. Поэтому нет оснований полагать, что истинное значение pK_a нуклеофила в мицеллах отличается от pK_a в воде.

Как видно из проведенного анализа, суммарный вклад обоих рассмотренных факторов (концентрирование сложного эфира в мицеллах и кажущийся сдвиг pK_a мицеллообразующего нуклеофила) в ускорении реакции образования ацилдетергента теоретически должен приводить в пределе (при $c \rightarrow 0$; см. уравнение (8)) к величине $k_{II, \text{эфф}}/k_{II, \text{эфф}}^0$ в отсутствие мицелл, равной примерно $4 \cdot 10^6$. Это значение практически полностью покрывает наблюдаемый эффект (рис. 2, б). Поэтому нет оснований полагать, что истинная константа скорости алкоксильного аниона в мицеллах ($k_{2, \text{м}}^0$) существенно отличается от величины $k_{2, \text{в}}^0$, характеризующей ее реакционную способность в воде. Следовательно, этот анион с высоколокализованным зарядом расположен в мицеллах так, что он полностью сохраняет водное окружение.

Механизм мицеллярного катализа на стадии гидролиза ацилдетергента. Стадия (3) явно протекает по механизму щелочного гидролиза, поскольку эффективное значение соответствующей константы скорости ($k_{3, \text{м}}$) закономерно возрастает, как нами было показано, с увеличением pH. В свою очередь, однако, константа скорости гидролиза гептаноилпроизводного Н-ПАВ (табл. 1) более чем на порядок превышает значение константы скорости псевдопервого порядка щелочного гидролиза гептаноилхолина ($4,6 \cdot 10^{-4}$ мин⁻¹) $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{COOCH}_2\text{CH}_2\dot{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$, не образующего мицелл. Последняя величина нами была оценена для условий нашего эксперимента (30°, pH 8,5) из данных работ [19, 20]. Ускорение реакции щелочного гидролиза, наблюдаемое для мицеллообразующего сложного эфира (гептаноилпроизводного Н-ПАВ), находит объяснение в том, что в поверхностном слое катионных мицелл повышена локальная концентрация гидроксильных ионов [3, 6, 7].

Константы скорости и равновесия для схемы (1)–(3)^а.

Условия: 30°, 0,02 М боратный буфер, рН 8,5; 0,02 М КСl; 1% (по объему) диметилсульфоксид

Сложный эфир	$k_2, \text{м K/V}, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$	K, M^{-1}	$k_2, \text{м/V}, \text{мин}^{-1}$	$k_3, \text{м} \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	Примечание
<i>n</i> -Нитрофенилацетат	1150 35	400 70	2,85 0,5		б в
<i>n</i> -Нитрофенилвалерат	5000	1000	5,0		б
<i>n</i> -Нитрофенилгептаноат				7 ± 2 5,0 ± 0,5	г д
	19000 1350	1900 5000	10 0,27		б в
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир N-Z-L-Тур	240 000	10000	24		е б

а. Приведенные величины получены обработкой соответствующих линейных зависимостей по методу наименьших квадратов и использованием ЭВМ, причем было найдено, что средне-квадратичные ошибки не превышают 10%.

б. Вычислено по уравнению (5) из данных, измеренных при $[S]_0 \ll [II\text{-ПАВ}]_0$ и низкой ионной силе (0,02 М КСl).

в. Вычислено по уравнению (5) из данных, измеренных при $[S]_0 \ll [II\text{-ПАВ}]_0$ и высокой ионной силе (0,2 М КNO₃).

г. Вычислено по уравнению (4) из данных рис. 1.

д. Определено в независимом эксперименте по скорости щелочного гидролиза гептаноил-Н-ПАВ (начальная концентрация 1 мМ, что выше ККМ).

е. Определено по зависимости растворимости субстрата от концентрации Н-ПАВ при рН 5,5 (рис. 3, уравнение (12)).

Таблица 2

Эффективные константы скорости второго порядка ($\text{M}^{-1} \text{мин}^{-1}$) ацилирования различных нуклеофилов (условия — см. табл. 1)

Сложный эфир	α -Химотрипсин, k_2/K_S	Н-ПАВ в мицеллах, $k_2, \text{м K/V}$	Анион Н-ПАВ в мицеллах, $k_2^0, \text{м K/V}$	$\text{Et}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{Et}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}^-$	ОП-
<i>n</i> -Нитрофенилацетат	2,1 · 10 ⁸ (а)	1,1 · 10 ⁸	1,1 · 10 ⁸ (в)	—		
<i>n</i> -Нитрофенилгептаноат	4,6 · 10 ⁸ (а)	1,9 · 10 ⁸	1,9 · 10 ⁸ (в)	6,25 · 10 ⁻² (г)	1,25 · 10 ⁸ (д)	2,94 · 10 ⁸ (е)
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир N-Z-L-Тур	{ $\geq 10^7$ $< 1,5 \cdot 10^7$ (б) }	2,4 · 10 ⁸	2,4 · 10 ⁷ (в)			

а. 25°, рН 7,8 [22]; см. также литературу в работе [23].

б. См. литературу в работе [24].

в. Вычислено из данных, измеренных при рН 8,5 с использованием pK_a , равн. 10,5 (рис. 5).

г. Этому же значению соответствует, в первом приближении, реакционная способность Н-ПАВ ниже ККМ.

д. Вычислено из данных, измеренных при рН 8,5 с использованием pK_a , б 12,8 (рис. 5).

е. По данным работ [22, 25].

Аналогии между ферментативным и мицеллярным катализом. Мицеллообразование одного из реагентов (Н-ПАВ) приводит, как видно на рис. 2, б, к ускорению реакции (более чем в 10⁵ раз), достигающему «ферментативного масштаба» (ср. [21]). Более того, сравнение абсолютных значений констант скоростей, проведенное в табл. 2, показывает, что алкоксильный анион, находящийся в поверхностном слое мицеллы, обнаруживает весьма близкую реакционную способность с α -химотрипсином при их ацилировании *n*-нитрофениловыми эфирами различных карбоновых кислот и в том числе N-карбобензоксид-*L*-тирозина (исходное состояние субстрата — в воде).

Наряду с этими формальными показателями можно указать также и на более глубокие аналогии между мицеллярным (в данной системе) и

ферментативным (α -химотрипсиновым) катализами. В той и другой системе реакция идет в три стадии: сначала происходит сорбция субстрата на катализаторе (на мицелле или соответственно на белковой глобуле), затем сорбированная молекула сложного эфира ацилирует нуклеофильную (в том и другом случае алифатическую гидроксильную) группу катализатора и, наконец, идет гидролиз промежуточного ацилпроизводного. Последняя стадия является стадией, лимитирующей скорость. Именно это обстоятельство позволяет, в частности, оттитровать концентрацию «активных центров» катализатора, как это для функциональных мицелл показано на рис. 1, а ранее было предложено для гидролитических ферментов Бендером [26].

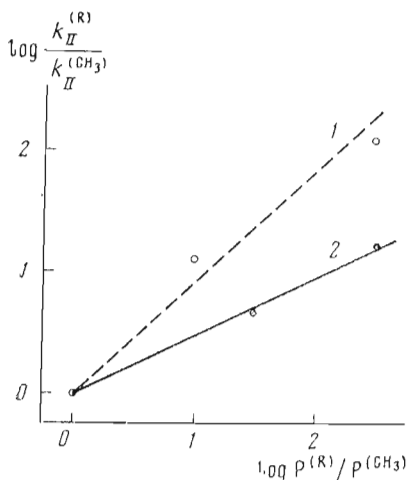


Рис. 6. Относительные константы скорости второго порядка реакции ацилирования *n*-пирофенилкарбоксилатами ($R\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -ацетат, бутират, валерат, гептаоат) в зависимости от относительной гидрофобности субстрата для различных нуклеофилов. 1 — ацилирование α -химотрипсина (k_2/K_S по данным работ [22, 23]); точки на прямой соответствуют реакции ацилирования бензимидазольного аниона в поверхностном слое катионных мицелл ($k_{2,M}K/V$ по данным работы [16]); 2 — ацилирование алкоксильной группы в мицеллах Н-ПАВ ($k_{2,M}K/V$ по данным табл. 1). Исходное состояние субстрата — в воде. В качестве показателя гидрофобности субстратной группы R приняты значения парциального коэффициента распределения в системе вода—октанол [27]

Специфичность функциональных мицелл, состоящих из Н-ПАВ, так же как и α -химотрипсина [21], определяется гидрофобным взаимодействием между субстратом и катализатором, что видно на рис. 6, на котором отложена зависимость относительных значений константы скорости второго порядка ацилирования α -химотрипсина и Н-ПАВ в мицеллах от показателя гидрофобности боковой группы R в молекуле сложного эфира ($R\text{COOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$). В качестве показателя гидрофобности приняты значения парциальных коэффициентов распределения (P) группы R между водой и октанолом [27]. Из наблюдаемых в опыте линейных зависимостей следует, что для того и другого катализатора справедливо утверждение: чем гидрофобнее субстрат, тем быстрее протекает химическая реакция. Однако наклон прямой 2 (рис. 6), соответствующей мицеллярной реакции, несколько меньше, чем в случае ферментативного процесса (прямая 1). Это связано, очевидно, с тем, что алкоксильный анион в мицелле, состоящей из Н-ПАВ, расположен в сильно гидратированном поверхностном слое [23, 28]. Действительно, если нуклеофил несколько углублен в мицеллу, как это имеет место в случае N-бензимидазольного аниона [28], то специфичность мицеллярного катализа (по данным работы [16]) вполне может соответствовать ферментативному (прямая 1).

Экспериментальная часть

Материалы. Н-ПАВ получали кватернизацией диэтиламиноэтанола бромистым октадецилом путем кипячения с обратным холодильником в этаноле [29] и очищали трехкратной перекристаллизацией из смеси эфир — этанол. Бромистый триэтилоксиэтиламмоний получали кватернизацией диэтиламиноэтанола бромистым этилом в бромистом этиле при комнатной температуре. Ацилированное производное Н-ПАВ (гептаноилдетергент) получали действием гептаноилхлорида на Н-ПАВ в среде

хлористого метилена и очищали трехкратной перекристаллизацией из смеси эфир — этанол. *n*-Нитрофенилацетат синтезировали по ранее описанной методике [30]; *n*-нитрофенилвалерат и *n*-нитрофенилгептаноат был синтезирован В. Н. Доровской описанным методом [31], *n*-нитрофениловый эфир *N*-карбобензокси-*L*-тирозина, препарат фирмы «ВДН» (Англия), использовали без дальнейшей очистки.

Определение ККМ. Величину ККМ для Н-ПАВ определяли по солюбилизации нерастворимого в воде красителя судана I. При рН 8,5 и 30° ККМ равна $8,0 \cdot 10^{-5}$ М.

Титрование Н-ПАВ (определение pK_a) проводили с помощью рН-стата «Radiometer TTT-1с» (Дания).

Кинетические измерения проводили в двухлучевых спектрофотометрах «Hitachi» EPS-3 (Япония) и «Hitachi — Perkin — Elmer» 124 (Япония), следя за образованием *n*-нитрофенолятного иона (400 нм).

*Определение константы связывания *n*-нитрофенилгептаноата с мицеллами Н-ПАВ по растворимости.* Измерения проводили по методике, описанной в работах [3, 14] при рН 5,5 и 30°. В этих условиях в исследуемой системе химическая реакция практически не идет и субстрат равномерно распределен между водной и мицеллярной фазами:

$$[S]_m/[S]_v = P. \quad (9)$$

При этом его общая концентрация определяется выражением

$$[S]_0 = [S]_m cV + [S]_v (1 - cV), \quad (10)$$

где $[S]_m$ и $[S]_v$ — концентрации субстрата в мицеллярной и водной фазах, c — концентрация ПАВ, уменьшенная на величину ККМ, V — мольный объем ПАВ. Из уравнений (9) и (10) следует:

$$[S]_0/[S]_v = 1 + (P - 1)cV. \quad (11)$$

Полагая, что закон распределения (9) выполняется вплоть до концентрации субстрата, равной его растворимости, левую часть в выражении (11) можно заменить отношением растворимости субстрата в присутствии ПАВ ($S_{m,v}$) к растворимости его в воде (S_v). Таким образом получим выражение

$$S_{m,v}/S_v = 1 + Kc, \quad (12)$$

согласно которому константу связывания K , определяемую соотношением

$$K = (P - 1)V, \quad (13)$$

удобно определять по тангенсу линейной зависимости $S_{m,v}/S_v$ от c (рис. 3).

Используемые кинетические уравнения. Скорость образования спиртового продукта (P_1) в мицеллярной реакции, протекающей по схеме (1) — (3), определяется следующим уравнением:

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_{2,m} [S]_m [H-ПАВ]_m cV + k_{2,v} [S]_v [H-ПАВ]_v (1 - cV), \quad (14)$$

где k_2 — константы скорости второго порядка, $[S]$ и $[H-ПАВ]$ — текущие концентрации реагентов, индексы m и v указывают на принадлежность той или другой величины к мицеллярной и водной «фазам». В условиях опыта (рис. 2) вторым членом в правой части уравнения (14), отражающим скорость реакции в водной фазе, можно пренебречь.

Анализ уравнения (14) существенно зависит от соотношения концентраций реагентов. При избытке субстрата, т. е. при $[S]_0 \gg [H-ПАВ]_0$, необходимо найти $[H-ПАВ]_m$ как функцию времени. Для этого нужно учесть, во-первых, уравнение материального баланса по нуклеофильному реагенту:

$$[H-ПАВ]_0 = [H-ПАВ]_v (1 - cV) + [H-ПАВ]_{0,m} cV,$$

где $[H-ПAB]_{0, M} = [H-ПAB]_M + [AH-ПAB]_M$ — общая концентрация детергента в мицеллах, равная $1/V$ (если полагать, что мольный объем слабо зависит от природы ПАВ [17]), и, во-вторых, записать уравнение для изменения концентрации нуклеофила в мицелле:

$$\frac{d[H-ПAB]_M}{dt} = \frac{k_{3, M}}{V} - (k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M) [H-ПAB]_M. \quad (15)$$

Интеграл дифференциального уравнения (15) дает искомое выражение:

$$[H-ПAB]_M = \frac{k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M \exp^{-t(k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M)}}{V (k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M)}. \quad (16)$$

После подстановки уравнения (16) в (14) и интегрирования имеем

$$[P_1] = \frac{k_{2, M} k_{3, M} [S]_M ct}{k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M} + \left(\frac{k_{2, M} [S]_M}{k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M} \right)^2 \times \\ \times (1 - \exp^{-t(k_{3, M} + k_{2, M} [S]_M)}) c. \quad (17)$$

При условии $k_{3, M} \ll k_{2, M} [S]_M$ уравнение (17) существенно упрощается и принимает вид (4).

В условиях избытка H-ПАВ, т. е. при $[H-ПAB]_0 \gg [S]_0$, уравнение (14) следует записать по-другому:

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_{I, \text{эфф}} [S] = k_{2, M} [S]_M [H-ПAB]_{0, M} cV. \quad (18)$$

Из уравнения (18) для наблюдаемой константы скорости псевдопервого порядка имеем при $P \gg 1$ выражение (5), если учесть, что $[S]_M = [S]P/(1 + (P - 1)cV)$, как это следует из выражений (9) и (10), и $[H-ПAB]_{0, M} = 1/V$. Уравнение (5) аналогично уравнению Михаэлиса — Ментен, и его параметры ($k_{2, M}/V$ и K) могут быть определены графически, например, по методу Лайнуивера — Берка с помощью линейной анаморфозы:

$$\frac{1}{k_{I, \text{эфф}}} = \frac{V}{k_{2, M} K} \cdot \frac{1}{c} + \frac{V}{k_{2, M}}, \quad (19)$$

как это показано на рис. 4.

Так как в реакции ацилирования спиртов в качестве нуклеофила выступает анион [13] (рис. 5, I), необходимо принять во внимание, что в поверхностном слое катионных мицелл концентрация ионов водорода понижена по сравнению с водой в соответствии с обычным законом распределения: $[H^+]_M/[H^+]_0 = P_{H^+}$, где $P_{H^+} < 1$. В результате простых преобразований уравнения (18) можно прийти к выражениям (5) и (6).

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1073—1084.
2. Березин И. В., Мартычек К. (1971) Журн. Всес. о-ва им. Менделеева, 16, 411—420.
3. Березин И. В., Мартычек К., Яценковский А. К. (1973) Усп. химии, 42, 1729—1756.
4. Blow D. M., Steitz T. A. (1970) Ann. Rev. Biochem., 39, 63—100.
5. Мосолов В. В. (1971) Протеолитические ферменты, «Наука», М.
6. Cordes E. H., Gitler C. (1973) in Progress in Bioorganic Chemistry (Kaiser E. T., Kezdy F. J., eds.), v. 2, J. Wiley & Sons, Inc., Toronto — N. Y.
7. Фендлер Е., Фендлер Дж. (1973) в сб. Методы и достижения в физико-органической химии, «Мир», М.
8. Meyer G. (1972) Tetrahedron Lett., 4581—4584.
9. Chevion M., Katzenhendler J., Sarel S. (1972) Israel J. Chem., 10, 975—978.
10. Gani V., Lapinte C., Viout P. (1973) Tetrahedron Lett., 4435—4438.
11. Bunton C. A., Ionescu L. G. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 2912—2917.
12. Martinek K., Levashov A. V., Berezin I. V. (1975) Tetrahedron Lett., 1275—1278.
13. Дженкс В. (1972) Катализ в химии и энзимологии, «Мир», М.

14. Yatsimirski A. K., Martinek K., Berezin I. V. (1971) *Tetrahedron*, **27**, 2855—2868.
15. Martinek K., Yatsimirski A. K., Osipov A. P., Berezin I. V. (1973) *Tetrahedron*, **29**, 963—969.
16. Martinek K., Osipov A. P., Yatsimirski A. K., Berezin I. V. (1975) *Tetrahedron*, **31**, 709—718.
17. Corkill J. M., Goodman J. F., Walker T. (1967) *Trans. Faraday Soc.*, **63**, 768—772.
18. Яцимирский А. К., Осипов А. П., Мартинек К., Березин И. В. (1975) *Колл. журн.*, **37**, № 3, 526—532.
19. Larsson L. (1954) *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1017—1020.
20. Nogami H., Awazu S., Iwatsura M. (1963) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **11**, 1251—1255.
21. Березин И. В., Мартинек К. (1975) *Биооргани. химия*, **1**, № 4, 520—531.
22. Marshall T. H., Akgun A. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6019—6023.
23. Мартинек К., Кирш Ю. Э., Стронгина А. А., Доровска В. Н., Яцимирский А. К., Березин И. В., Кабанов В. А. (1971) *Докл. АН СССР*, **199**, 148—151.
24. Philipp M., Bender M. (1973) *Nature New Biol.*, **241**, 44.
25. Malhotra O. P., Philip G. (1966) *Biochem. Zs.*, **346**, 386—402.
26. Bender M. L., Begue-Canton M. L., Blcakeley R. L. et al. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 5890—5913.
27. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) *Chem. Rev.*, **71**, 525—616; (1972) *J. Org. Chem.*, **37**, 92—113.
28. Мартинек К., Осипов А. П., Яцимирский А. К., Березин И. В. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, № 4, 469—478.
29. Scott A. B., Tartar H. V. (1943) *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 692—701.
30. Chattaway F. D. (1931) *J. Chem. Soc.*, 2495—2496.
31. Fife T. H. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 4597—4600.

Поступила в редакцию
15.V.1975

HYDROLYSIS OF *p*-NITROPHENYL CARBOXYLATES CATALYSED BY A NUCLEOPHILIC SURFACTANT. A MICELLAR MODEL OF ACTION OF SERINE PROTEINASES

LEVASHOV A. V., MARTINEK K., MEVKH A. T.,
DMITRIEVA M. P., BEREZIN I. V.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State
University, Moscow*

Catalysis of *p*-nitrophenyl carboxylates hydrolysis by the micelles of octadecyldiethylhydroethylammonium bromide, $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Et}_2\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{Br}^-$, has been studied. The mechanism of the reaction includes the following steps: (1) hydrophobic binding of the substrate by the micelles, a process analogous to the Michaelis complex formation; (2) acylation of the alkoxide group in the detergent molecule by the sorbed substrate, a process analogous to acylenzyme formation; (3) hydrolysis of acyldetergent, a process analogous to regeneration of an enzyme upon deacylation. The micellar model studied has a definite similarity to serine proteinases catalysis both with respect to the mechanism and by formal kinetic manifestation as well as by order of magnitude of rate acceleration.