

УДК 541.64 : 547.582

**ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ БУФЕРА НА КИНЕТИЧЕСКИЕ  
ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА *n*-НИТРОФЕНИЛАЦЕТАТА,  
КАТАЛИЗИРУЕМОГО ПОЛИОКСИЭТИЛЕНОВЫМ ЭФИРОМ  
*N*-БЕНЗОИЛ-*L*-ГИСТИДИНА**

***И. Н. Топчиева, А. Б. Соловьева, Б. И. Курганов,  
В. А. Кабанов***

В предыдущих работах [1, 2] были описаны катализитические свойства полиоксигидролиза *N*-бензоил-*L*-гистидина (ПОБГ), изучение которых в различных условиях позволило обнаружить высокую чувствительность полимерного катализатора к степени ассоциации и конформационным превращениям, происходящим при изменении температуры и рН-среды. Характерным свойством ПОБГ как катализатора является его способность образовывать неактивные ассоциаты при концентрации катализатора, превышающей критическую концентрацию ассоциации. Причиной ассоциации является взаимодействие неполярных бензоильных остатков дизамещенных цепей полиоксигидролиза (ПОЭ). Субстрат *n*-нитрофенил-ацетат (НФА) и продукт реакции *n*-нитрофенол (НФ) активируют ПОБГ, вызывая диссоциацию неактивных ассоциатов на активные мономеры. Кинетически этот процесс обнаруживается по наличию индукционного периода на кинетических кривых гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ. Функцию катализитически активного компонента смеси моно- и дизамещенных цепей ПОЭ также выполняют двузамещенные молекулы ПОЭ.

Принимая во внимание возможность сближения имидазольных групп в дизамещенных цепях ПОЭ за счет неполярного взаимодействия бензоильных остатков, можно допустить два механизма катализитического действия имидазольных групп ПОБГ — обычный нуклеофильный катализ, осуществляемый одной имидазольной группой, либо механизм согласованного катализа с участием двух имидазольных групп, например нуклеофильно-электрофильного катализа. Одним из наиболее удобных и прямых путей решения этой проблемы является анализ рН-зависимости скорости гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ.

#### Экспериментальная часть

Синтез ПОБГ проводили по методу, описанному в работе [2]. Использовали два препарата ПОБГ, в которых модификация концевых гидроксильных групп остатками *N*-бензоил-*L*-гистидина (БГ) проведена на 35 и 30% соответственно (в расчете на один конец).

Метиловый эфир *N*-бензоилгистидина (МЭБГ) был синтезирован по методу получения метиловых эфиров аминокислот, описанному в работе [3]. К суспензии 250 мг МЭБГ ( $10^{-2} M$ ) в 10 мл абсолютного метанола, охлаждаемой смесью сухого льда с ацетоном, добавляли при перемешивании 5 мл метанола, содержащего 0,12 мл ( $10^{-2} M$ ) хлористого тионила. После стояния смеси при комнатной температуре в течение суток метанол отгоняли на роторном испарителе. Полученное соединение перекристаллизовывали из смеси абсолютных метанола и эфира; т. пл. 158° (по литературным данным [3] 160°).

Спектрофотометрическое титрование имидазольных групп в ПОБГ проводили в растворе 0,001 M *трис*-HCl (в интервале pH = 2,5–9,3) и в системе *трис*-KOH (в интервале pH = 9,7–10,1) при ионной силе  $\mu = 10^{-2}$ , которую поддерживали постоянной при помощи NaCl. Концентрация ПОБГ составляла  $1,8 \cdot 10^{-4}$ , концентрация МЭБГ —  $2,9 \cdot 10^{-4}$  M. Измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре EPS-03 (Япония) при  $\lambda = 221$  мк. Кинетические измерения проводили, как описано в работе [2].

Фосфатный буфер готовили из 0,01 M раствора  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 0,01 M раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [4]. Боратный буфер готовили из  $2 \cdot 10^{-2}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  и  $10^{-1}$  M HCl (ионная сила  $\mu = 10^{-2}$ ) [4].

Модификацию имидазольных групп в ПОБГ бромуксусной кислотой в фосфатном и боратном буферах проводили по методу, описанному в работе [2].

Измерения электрофоретической подвижности  $U$  ПОЭ проводили на приборе для высоковольтного электрофореза фирмы Лабор (Венгрия) на бумаге ватман № 3 в 0,01 M фосфатном, *трис*-HCl- и боратном буферах. Пятна проявляли раствором иода в эфире.  $U$  вычисляли по формуле  $U = rd / tV$ , где  $r$  — расстояние от стартовой линии до середины пятна, см;  $d$  — ширина бумаги, см;  $t$  — время опыта, мин.;  $V$  — напряжение, в.

### Результаты и их обсуждение

**Катализическое действие ПОБГ в *трис*-HCl- боратном и фосфатном буферах.** Скорость гидролиза НФА в присутствии ПОБГ (под скоростью катализической реакции  $v$  подразумевали скорость на стационарном участке) в *трис*-HCl-буфере была изучена в интервале pH от 7,0 до 9,0 при 25° (рис. 1). Из рисунка видно, что скорость гидролиза растет с увеличением pH.

Очевидно, что при анализе pH-зависимости скорости гидролиза НФА необходимо прежде всего учесть изменение степени диссоциации имидазольной группы. Известно, что имидазол является амфотерным электролитом и в зависимости от pH может существовать в виде катиона ( $\text{IMH}^+$ ), нейтрального соединения ( $\text{IM}$ ) и аниона ( $\text{IM}^-$ )



( $pK_1 = 7,0$  и  $pK_2 = 14,0$ \*). Анионная форма имидазола также способна катализировать гидролиз НФА. Если считать, что катализически активной группой в ПОБГ является имидазол в нейтральной форме и пренебречь равновесием  $\text{IM} \rightleftharpoons \text{IM}^-$  (что вполне допустимо, если учесть большую разницу в  $pK_1$  и  $pK_2$ ), то зависимость скорости катализической реакции от pH должна подчиняться следующему уравнению:

$$v = k[\text{S}]_0[\text{IM}] = k[\text{S}]_0 \frac{[\text{IM}]}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{IM}}}} = \frac{v_{\text{пп}}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{IM}}}}, \quad (1)$$

где  $k$  — константа скорости гидролиза НФА,  $[\text{IM}]$  — концентрация нейтрального имидазола,  $[\text{IM}]_0$  — общая концентрация имидазола ( $[\text{IM}]_0 = [\text{IM}] + [\text{IMH}^+]$ ),  $[\text{S}]_0$  — начальная концентрация субстрата,  $K_{\text{IM}}$  — константа диссоциации имидазола и  $v_{\text{пп}} = \lim_{[\text{H}^+] \rightarrow 0} v$ . Если это уравнение выполняется, то зависимость  $1/v$  от  $[\text{H}^+]$  должна иметь линейный характер. Соответствующие расчеты показывают, что в случае гидролиза НФА в *трис*-HCl-буфере, катализируемом ПОБГ, зависимость  $1/v$  от  $[\text{H}^+]$  обна-

\*  $pK_2$  был рассчитан нами по следующей формуле [5]:  $pK_2 = A pK_1 + B$ , где  $A = 0,94$  и  $B = 7,43$ .

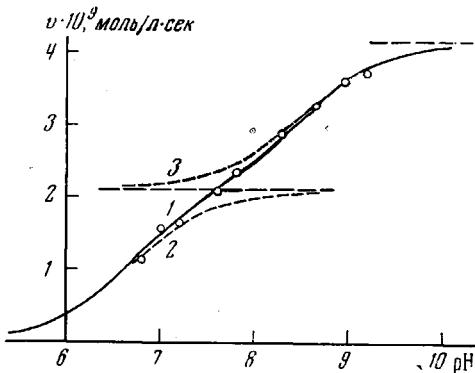


Рис. 1. pH-Зависимости скорости гидролиза НФА в присутствии ПОБГ, рассчитанные по уравнению (2) 1, (3) 2 и (4) 3 при концентрациях  $2,4 \cdot 10^{-4}$  НФА и  $3,2 \cdot 10^{-5}$  M ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, 25°; 0,01 M *трис*-HCl буфер. Точки — экспериментальные данные

руживает отклонение от линейности, в то время как при использовании в качестве катализатора МЭБГ экспериментальные точки в указанных координатах ложатся на прямую линию (рис. 2). Константа диссоциации  $K_{1M}$  для МЭБГ, соответствующая произведению отсекаемого на оси ординат отрезка на обратное значение наклона прямой, оказалась равной  $8,0 \cdot 10^{-7}$  моль ( $pK_1 = 6,1$ ).

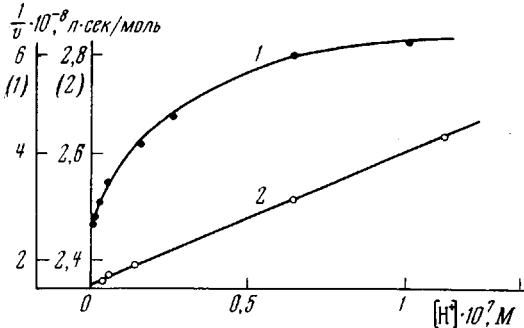


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость обратной скорости гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ (1) и МЭБГ (2), в *трис*-HCl-буфере, от концентрации водородных ионов при концентрациях  $2,4 \cdot 10^{-4}$  НФА,  $3,2 \cdot 10^{-5}$  ПОБГ, содержащего 35% имидазольных групп, и  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M МЭБГ

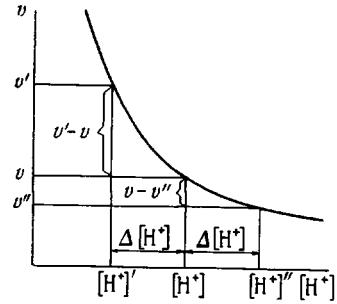


Рис. 3

Рис. 3. Расчет  $K$  по формуле (5)

Неприменимость уравнения (1) в случае гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ, в *трис*-HCl-буфере может быть обусловлена тем, что наряду с имидазольной группой в каталитическом процессе участвует другая группа основного характера. В том случае, когда в системе имеется два независимо действующих катализатора, каждый из которых активен только в не-протонированной форме, зависимость  $v$  от pH должна иметь следующий вид:

$$v = v_1 + v_2 = \frac{v_{1\text{пп}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1}} + \frac{v_{2\text{пп}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_2}}, \quad (2)$$

где индексы 1 и 2 соответствуют двум катализически активным группам.

Это уравнение содержит четыре параметра  $v_{1\text{пп}}$ ,  $v_{2\text{пп}}$ ,  $K_1$  и  $K_2$ , которые могут быть рассчитаны следующим образом. При достаточно больших значениях  $[H^+]$  уравнение (2) упрощается ( $K_1 > K_2$ )

$$v = v_1 = \frac{v_{1\text{пп}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1}} \quad (3)$$

и, следовательно, параметры  $v_{1\text{пп}}$  и  $K_1$  могут быть рассчитаны, исходя из параметров прямой, проведенной в координатах  $1/v - [H^+]$ . После нахождения  $v_{1\text{пп}}$  и  $K_1$  параметры  $v_{2\text{пп}}$  и  $K_2$  рассчитываются из экспериментальных данных, представленных в координатах

$$1 / [v - v_{1\text{пп}} / (1 - [H^+] / K_1)] - [H^+]$$

Однако использование в качестве буферного раствора системы *трис*-HCl не позволяет проводить измерения ниже pH = 6,8. При отсутствии значений  $v$  при достаточно больших  $[H^+]$  анализ уравнения (2) может быть проведен следующим образом.

При достаточно малых  $H^+$  уравнение (2) упрощается

$$v = v_{1\text{пп}} + \frac{v_{2\text{пп}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_2}} \quad (4)$$

Для нахождения  $K_2$  представим экспериментальные данные в виде зависимости  $v$  от  $[H^+]$ . Возьмем на кривой произвольную точку с координатами  $\{v; [H^+]\}$  (рис. 3).

Найдем значения  $v$ , при концентрациях ионов водорода  $[H^+]'$  и  $[H^+]''$ , равноудаленных по оси абсцисс от исходной точки:  $[H^+]' = [H^+] - \Delta[H^+]$  и  $[H^+]'' = [H^+] + \Delta[H^+]$ . Обозначим значения  $v$  при  $[H^+]'$  и  $[H^+]''$  через  $v'$  и  $v''$  соответственно. Константа диссоциации может быть рассчитана по следующей формуле [6]:

$$K = \Delta[H^+] \frac{(v' - v) + (v - v'')}{(v' - v) - (v - v'')} - [H^+] \quad (5)$$

Значения рК<sub>2</sub>, рассчитанные подобным образом при различных рН, представлены на рис. 4, а. Уменьшение величины рК<sub>2</sub> с ростом  $[H^+]$  связано с тем, что первый член в уравнении (4) становится меньше  $v_{1\text{пр}}$ . Экстраполяция значений рК<sub>2</sub> к нулевой концентрации  $[H^+]$  дает истинное значение рК<sub>2</sub>, которое оказалось равным 8,5. После нахождения  $K_2$  экспериментальные данные представляли в координатах  $v - 1 / (1 + [H^+] / K_2)$  (рис. 4, б). Прямая, проведенная через точки при достаточно больших значениях  $1 / (1 + [H^+] / K_2)$ , соответствует уравнению (4): ее наклон позволяет определить  $v_{2\text{пр}}$ , а отсекаемый отрезок —  $v_{1\text{пр}}$  ( $v_{1\text{пр}} = 2,10 \cdot 10^{-9}$  и  $v_{2\text{пр}} = 2,03 \cdot 10^{-9}$  моль/л·сек). Наконец, для определения  $K_1$  экспериментальные данные представляли в координатах

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{v_{1\text{пр}}}{v - \frac{v_{2\text{пр}}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_2}\right)}} - 1 \\ \end{array} \right\} - [H^+].$$

(рис. 4, в). Наклон получаемой прямой равен  $1 / K_1$  (рК<sub>1</sub> = 6,7). На рис. 1 точки соответствуют экспериментальным данным, а сплошная кривая 1 рассчитана по уравнению (2) при следующих значениях параметров:  $K_1 = 2 \cdot 10^{-7}$ ,  $K_2 = 3,2 \cdot 10^{-9}$  М,  $v_{1\text{пр}} = 2,10 \cdot 10^{-9}$  и  $v_{2\text{пр}} = 2,03 \cdot 10^{-9}$  моль/л·сек. Нижняя горизонтальная пунктирная линия соответствует  $v_{1\text{пр}}$ , верхняя —  $(v_{1\text{пр}} + v_{2\text{пр}})$ . Нижняя пунктирная кривая 2 соответствует первому слагаемому в уравнении (2), верхняя кривая 3 — второму плюс  $v_{1\text{пр}}$ .

Таким образом, рН-зависимость скорости гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ, в тристо-НCl-буфере можно количественно описать, исходя из предположения о том, что в качестве катализически активных групп выступают две основные невзаимодействующие группы с рК = 6,7 и 8,5 соответственно. Первое значение рК относится к имидазольной группе.

Была сделана попытка определить константы диссоциации имидазольной группы в ПОБГ и МЭБГ спектрофотометрическим методом. Соответствующие данные приведены на рис. 5 в виде зависимости оптической плотности при 221 мкм ( $D_{221}$ ) от рН. Эта зависимость должна подчиняться следующему выражению, аналогичному по форме уравнению (4):

$$D = D_{1\text{пр}} - (D_{1\text{пр}} - D_{2\text{пр}}) / (1 + [H^+] / K), \quad (6)$$

где  $D_{1\text{пр}}$  и  $D_{2\text{пр}}$  — значения оптической плотности, соответствующие плато в области малых и больших значений рН. Во избежание ошибок, связанных с определением предельных значений оптической плотности при крайних значениях рН, мы воспользовались изложенным выше методом расчета констант диссоциации, не требующим предварительного нахождения величин  $D_{1\text{пр}}$  и  $D_{2\text{пр}}$ . Ввиду того, что изменение оптической плотности изучалось в очень большом интервале значений рН, расчет константы диссоциации удобнее проводить по следующей формуле:

$$K = [H^+] \cdot \{x - (D' - D) / (D - D'')\} / \{x \cdot (D' - D) / (D - D'') - 1\}, \quad (7)$$

где  $D$ ,  $D'$  и  $D''$  соответствуют значениям оптической плотности при концентрации ионов водорода  $[H^+]$ ,  $[H^+] / x$  и  $x[H^+]$  ( $x$  — постоянный множитель). Очевидно, что при подобном выборе абсцисс вспомогательных точек последние располагаются на одинаковом расстоянии от центральной точки по оси рН, равной  $\lg x$ . Оказалось, что константа диссоциации, рассчитанная по формуле (7) как для имидазольной группы ПОБГ, так и МЭБГ, не является постоянной величиной и растет с увеличением рН (например, для ПОБГ при рН = 4 рК = 4,3, а при рН = 9 рК = 8,5). Таким образом, спектрофотометрический метод оказался непригодным для оценки рК имидазольной группы в ПОБГ и МЭБГ, что, по-видимому, обусловлено влиянием бензоильной группы на спектральные свойства имидазольной группы [7]. Тем не менее интересно привести значение рК, соответствующее рН, при котором  $D = D_{1\text{пр}} - (D_{1\text{пр}} - D_{2\text{пр}}) / 2$ . Очевидно, при выполнении этого соотношения рК численно равен рН. Они оказались равными 7,2 для ПОБГ и 6,7 для МЭБГ, т. е. находятся в разумном согласии с соответствующими значениями рК, определенными на основании кинетических данных.

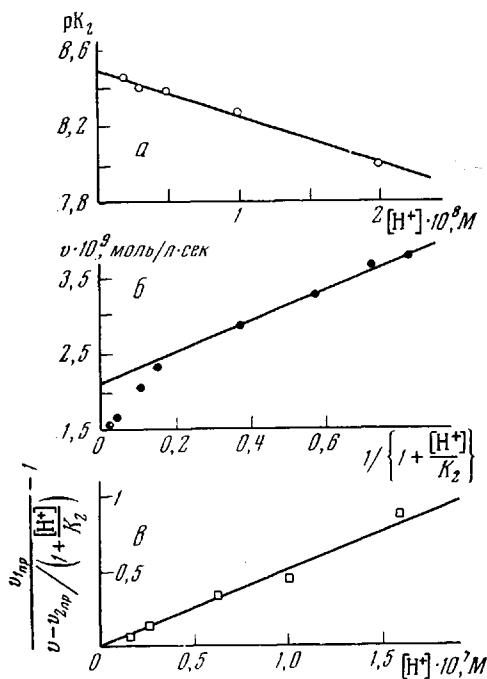


Рис. 4

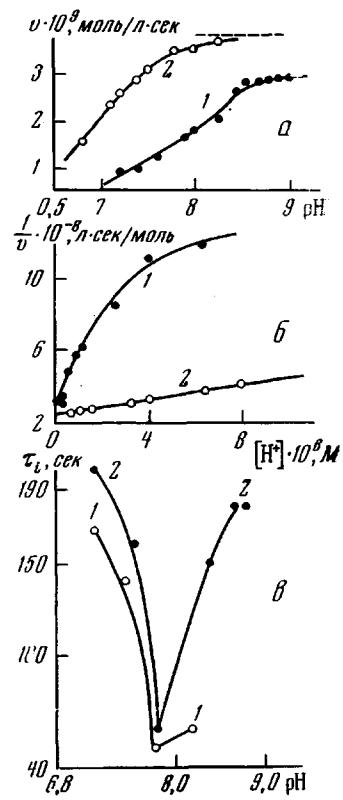


Рис. 6

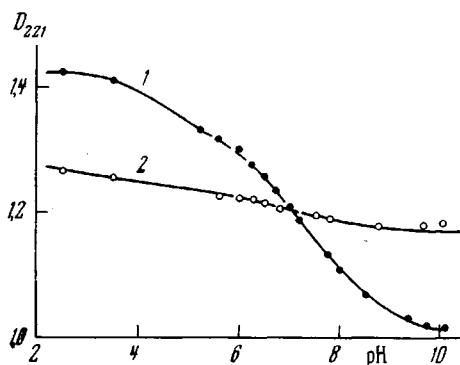


Рис. 5

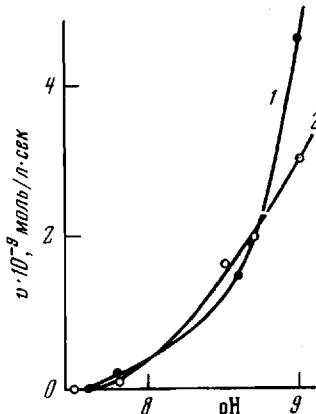


Рис. 7

Рис. 4. Расчет параметров уравнения (2): а —  $pK_2$ , б —  $v_{1\text{пр}}$  и  $v_{2\text{пр}}$ , в —  $K_1$   
 Рис. 5. Зависимость оптической плотности при  $\lambda = 221 \text{ мкм}$  от pH для  $1.9 \cdot 10^{-4} \text{ МОБГ}$ , содержащего 35% имидазольных групп (1) и  $28 \cdot 10^{-4} \text{ М МЭБГ}$  (2) в  $0.001 \text{ М}$  *трис*- $\text{HCl}$ -буфере при  $\text{pH} = 2.5$ — $9.3$  и в растворе  $0.001 \text{ М}$  *трис*-КОН при  $\text{pH} = 9.7$ — $10.1$   
 Рис. 6. pH-Зависимость скорости гидролиза НФА (а, б) в присутствии ПОБГ, содержащего 20% имидазольных групп, и индукционных периодов (в) на кинетических кривых в боратном (1) и фосфатном (2) буферах при  $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ МНФА}$  и  $3.2 \cdot 10^{-5} \text{ МПОБГ}$ ;  $25^\circ$

Рис. 7. pH-Зависимость скорости гидролиза НФА в системе ПОЭ — *трис*- $\text{HCl}$ -буфер (1) и ПОЭ — боратный буфер (2) при  $4.0 \cdot 10^{-4} \text{ МНФА}$  и  $3.2 \cdot 10^{-5} \text{ МПОЭ}$ ;  $25^\circ$

Для выяснения вопроса о том, связаны ли отклонения рН-зависимости скорости гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ, от уравнения (1) с природой буфера, нами был изучен гидролиз НФА в боратном и фосфатном буферах при различных значениях рН. рН-Зависимости скорости гидролиза НФА в присутствии ПОБГ в обоих буферах представлены на рис. 6, а. Зависимость  $1/v$  от  $[H^+]$  для боратного буфера так же, как и в случае *тристрис*-HCl-буфера, обнаруживает отклонение от линейности (кривая 1 на рис. 6, б). Обращают на себя внимание более низкие значения скоростей каталитического гидролиза НФА в боратном буфере по сравнению с фосфатным буфером, что, по-видимому, связано с ингибирующим действием борной кислоты на имидазольный катализ [8]. Детальный анализ зависимости  $v$  от рН в боратном буфере показывает, что уравнение (2) в этом случае не выполняется, поэтому не представлялось возможным оценить вклад имидазольного катализа в общую скорость процесса. В то же время аналогичная зависимость в фосфатном буфере подчиняется уравнению (1), что подтверждается спрямлением экспериментальных данных в координатах  $1/v$  от  $[H^+]$  (прямая 2 на рис. 6, б). Значение рК имидазольной группы ПОБГ, рассчитанное из этих данных, составляет 6,9. Кинетические кривые гидролиза НФА в обоих буферах характеризуются наличием индукционных периодов, величины которых проходят через минимум в интервале рН от 7,2 до 8,8 (рис. 6, в). Отметим, что рН-зависимость индукционного периода в *тристрис*-HCl-буфере имеет такой же характер [2].

**Гидролиз НФА в системах ПОЭ — *тристрис*-HCl-буфер, ПОЭ — боратный буфер и ПОЭ — фосфатный буфер.** Принимая во внимание аномальный характер рН-зависимости скорости гидролиза НФА в присутствии ПОБГ в *тристрис*-HCl- и боратном буфере и учитывая возможность участия компонентов буферных растворов в гидролизе НФА, были поставлены контрольные опыты по изучению гидролиза НФА в указанных буферах в присутствии ПОЭ. В кювете сравнения проводили гидролиз НФА в соответствующих буферах.

Известно, что дизамещенный фосфат-ион ускоряет гидролиз НФА [9]. Можно было ожидать, что в случае связывания этого иона полимерной цепью произойдет изменение его каталитической эффективности. Оказалось, что введение ПОЭ не приводит к изменению скорости гидролиза НФА при проведении его в фосфатном буфере в большом интервале концентраций субстрата. Тот факт, что в присутствии ПОЭ не наблюдается различия в скоростях гидролиза НФА в фосфатном буфере указывает, по-видимому, на отсутствие связывания фосфат-ионов на полимерной цепи.

Гидролиз НФА в системе ПОЭ — *тристрис* в интервале рН = 7,2—8,6 протекает с такой же скоростью, что и гидролиз в *трисе* ( $v = 0$ ), при концентрации субстрата  $3,3 \cdot 10^{-4} M$ , т. е. концентрации, использованной при изучении рН-зависимости скорости гидролиза НФА в присутствии ПОБГ в *тристрис*-HCl буфере. Однако при несколько большей концентрации субстрата, а именно  $[S] = 4 \cdot 10^{-4} M$ , наблюдается ускорение гидролиза в системе *тристрис* — ПОЭ при значениях рН, больших 7,8 (кривая 1, рис. 7). Известно, что *тристрис*-(оксиметил)аминометан реагирует с НФА с образованием N- и O-ацилированных продуктов и выделением НФ [10]. Поскольку сам ПОЭ не обладает каталитической активностью по отношению к НФА, увеличение скорости гидролиза можно объяснить большей эффективной реакционной способностью связанного *тристриса* по отношению к НФА по сравнению со свободным *тристрисом*.

Таким образом, можно считать, что второй член в уравнении (2) и соответствующая ему расчетная кривая 3 на рис. 1 (рК = 8,5) характеризует участие связанного *тристриса* в реакции деацилирования НФА. Действительно, согласно литературным данным [10], рК аминогруппы *тристриса* составляет 8,1.

Однако из представленных выше данных следует, что кинетические эффекты, обусловленные участием в процессе гидролиза связанного *тристриса*,

неодинаковы в системах *трист* — ПОЭ и *трист* — ПОБГ: система *трист* — ПОБГ более эффективна, чем система *трист* — ПОЭ. Это, по-видимому, связано с изменением физического состояния полимерных цепей ПОЭ при введении концевой бензоилгистидиновой группировки [2].

Далее нами был изучен гидролиз НФА в системе ПОЭ — боратный буфер. Оказалось, что система ПОЭ — боратный буфер также обладает повышенной эффективностью в реакции гидролиза НФА по сравнению со свободными компонентами буфера. Так же, как и для системы ПОЭ — *трист* при  $[S]_0 = 3,3 \cdot 10^{-4} M$  (концентрация, при которой была снята кривая 1 на рис. 6, а) введение ПОЭ в боратный буфер не приводило к увеличению скорости гидролиза по сравнению со спонтанным гидролизом. Однако при несколько большей концентрации субстрата ( $4 \cdot 10^{-4} M$ ) система ПОЭ — боратный буфер заметно ускоряет гидролиз НФА при значениях pH, больших 7,8 (кривая 2 на рис. 7). Специальными опытами по изучению гидролиза НФА в фосфатном буфере в присутствии добавок тетрабората натрия было показано, что введение добавок ускоряет гидролиз НФА. Поэтому ускорение гидролиза НФА в системе ПОЭ — боратный буфер и аномальный характер pH-зависимости скорости гидролиза НФА в присутствии ПОБГ в этом буфере можно объяснить большей эффективностью связанных компонентов буфера по сравнению со свободными.

Таким образом, при изучении кинетического поведения ПОБГ в *трист*-HCl- и боратном буфере необходимо учитывать эффекты, обусловленные связыванием компонентов буфера полимерной цепью.

#### Электрофоретическая подвижность ПОЭ в различных буферах при 25°

Буфер (0,01 M)	pH	v, ε	t, мин.	r, см	$U \cdot 10^4$
<i>Трист</i> -HCl	7,8	1000	60	2,4	3,2
Боратный	8,0	700	100	0,5	0,4
Фосфатный	7,8	1000	120	1,7	1,1

Дополнительные подтверждения связывания компонентов буферных растворов полимерной цепью ПОЭ были получены при изучении электрофоретического поведения ПОЭ в этих буферах. Результаты электрофоретических измерений приведены в таблице. Обращают на себя внимание два обстоятельства: во всех случаях полимер движется к катоду и электрофоретическая подвижность ПОЭ существенно зависит от природы буфера. Наибольшей электрофоретической подвижностью ПОЭ обладает в *трист*-HCl-буфере (pH = 7,8), наименьшей — в боратном буфере (pH = 8,0). Эти наблюдения позволяют сделать вывод о том, что полиоксиэтиленовая цепь способна адсорбировать катионы из буферного раствора — катионы щелочных металлов во всех трех случаях и органические катионы в *трист*-HCl-буфере. Из литературы известна способность полиэтиленгликоля и его низкомолекулярных аналогов образовывать комплексы с ионами щелочных металлов в спиртовых средах [11]. С другой стороны, ПОЭ способен связывать соединения за счет образования водородных связей [12], как это, по-видимому, имеет место в случае *трист*-(оксиметил)аминометана. Различие в величинах электрофоретической подвижности ПОЭ в различных буферах может быть обусловлено как различными значениями констант связывания ПОЭ — катион, так и различной природой связанного катиона. С другой стороны, в случае боратного буфера появляется дополнительная возможность образования координационных комплексов эфирный кислород ПОЭ (основание Льюиса) — борная кислота (кислота Льюиса) [13].

Таким образом, имидазольные группы в дизамещенных цепях ПОЭ участвуют в катализитическом процессе независимо друг от друга, на что указ-

зывает выполнимость уравнения (1) в фосфатном буфере. При проведении гидролиза в *трис*-HCl- и боратном буфере катализическая эффективность системы увеличивается в результате действия связанных с полимерной цепью компонентов буферов.

#### Выводы

1. Характер pH-зависимости скорости гидролиза *n*-нитрофенилацетата (НФА), катализируемого поликсиэтиленовым эфиром N-бензоил-L-гистидина (ПОБГ) в фосфатном буфере, указывает на то, что имидазольные группы в дизамещенных цепях поликсиэтилена (ПОЭ) принимают участие в катализическом процессе независимо друг от друга.

2. На основании анализа pH-зависимости скорости гидролиза НФА и присутствии ПОБГ в *трис*-HCl-буфере показано, что наряду с имидазольной группой ПОБГ в процессе гидролиза НФА принимает участие функциональная группа с РК = 8,5, принадлежащая *трис*-(оксиметил)-аминометану, связанному с полимерной цепью.

3. Характер pH-зависимости скорости гидролиза НФА, катализируемого ПОБГ, в боратном буфере указывает на участие в гидролизе НФА, связанных с полимерной цепью компонентов буфера.

4. Введение ПОЭ в *трис*-HCl- и боратный буфер приводит к увеличению реакционной способности последних по отношению к НФА, что свидетельствует в пользу связывания полимерной цепью ПОЭ компонентов *трис*- и боратного буфера соответственно. Этот вывод подтверждается изучением электрофоретической подвижности ПОЭ в соответствующих буферах.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова  
Всесоюзный научно-исследовательский  
витаминный институт

Поступила в редакцию  
16 XII 1970

#### ЛИТЕРАТУРА

1. А. Б. Соловьева, И. Н. Топчиева, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, 187, 830, 1969.
2. И. Н. Топчиева, А. Б. Соловьева, Б. И. Курганов, В. А. Кабанов, Высокомолек. соед., А14, 1809, 1972.
3. Дж. Гриштейн, М. Виниц, Химия аминокислот и пептидов, изд-во «Мир», 1965, стр. 425.
4. Ю. Ю. Лурье, Справочник по аналитической химии, изд-во «Химия», 1965, стр. 223.
5. Т. С. Bruiice, J. L. York, J. Amer. Chem. Soc., 83, 1382, 1961.
6. Б. И. Курганов, В. А. Яковлев, Молек. биол., 4, 781, 1970.
7. G. Brecher, J. Biol. Chem., 227, 845, 1957.
8. И. В. Березин, Г. Я. Коломийцева, А. В. Левашов, К. Мартинск, Докл. АН СССР, 174, 1213, 1966.
9. W. P. Jenks, J. Carrilolo, J. Amer. Chem. Soc., 82, 1778, 1960.
10. T. C. Bruiice, G. E. Schmir, J. Amer. Chem. Soc., 80, 148, 1958.
11. J. L. Down, J. Lewis, M. Moore, G. Wilkinson, J. Chem. Soc., 1959, 3767.
12. W. Scholtan, Makromolek. Chem., 11, 131, 1959.
13. У. Везер, Структура и связь, изд-во «Мир», 1969.

INFLUENCE OF THE BUFFER NATURE ON THE KINETIC PECULIARITIES  
OF HYDROLYSIS OF *p*-NITROPHENYL ACETATE CATALYZED  
BY N-BENZOYL-L-HISTIDINE POLYOXYETHYLENE ESTER  
*I. N. Topchieva, A. B. Solov'eva, B. I. Kurganov,*  
*V. A. Kabanov*

#### Summary

A study has been made of the hydrolysis of nitrophenyl acetate in the presence of N-benzoyl-L-histidine polyoxyethylene ester (BPE) in phosphate, borate and *tris*-HCl buffers as well as in the presence of the system polyoxyethylene-phosphate, borate and *tris*-HCl buffers. Investigation of the pH dependence of the hydrolysis rate of nitrophenyl acetate in the presence of BPE in the phosphate buffers has shown that the imidazole groups participate in the catalytic process independently of one another. Analysis of the pH dependence in *tris*-HCl and borate buffers led to the conclusion that the buffer components bound with the polymer chain participate in the catalytic process along with the imidazole group. The bonding of the buffer components by the polymer chain has been confirmed by the investigation of the electrophoretic mobility of polyoxyethylene in corresponding buffers.