

УДК 547.963.32

ХИМИЯ

В. Д. ДОМКИН, А. Г. ПОГОРЕЛОВ, В. Н. ШИБАЕВ, Э. И. БУДОВСКИЙ,
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

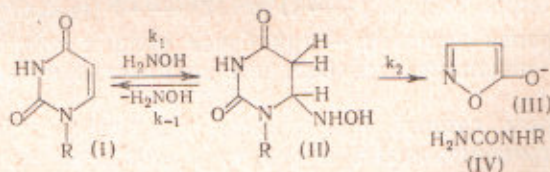
**КИНЕТИКА РЕАКЦИИ ГИДРОКСИЛАМИНА
С УРИДИНОВЫМ ЯДРОМ**

Ранее было показано, что при действии гидроксилamina (ГА) на уридиновое звено (I) в нуклеотидах и полинуклеотидах происходит расщепление урацильного ядра (¹⁻³), причем вначале образуется изоксазolon (III) и рибозилмочевинное звено (IV), которое в присутствии избытка ГА превращается в рибозилгидроксилaminное (^{2, 4}). При более тщательном анализе реакционной смеси уридин-5'-фосфата с ГА был обнаружен промежуточный продукт — 6-оксиамино-5,6-дигидроуридин-5'-фосфат (II) и на основании этого было предположено, что первой стадией реакции является присоединение аминогруппы ГА по C₍₅₎ — C₍₆₎ двойной связи урацильного ядра (⁵) (ср. (^{2, 6})).

Промежуточный продукт весьма лабилен и его удалось выделить только в виде смеси с исходным веществом, содержащей 15—20% последнего. На этой смеси было показано, что соединение II в слабокислой среде количественно превращается в исходное соединение; причем скорость этой реакции постоянна в интервале pH 3,6—8. Приводим константы скоростей превращений промежуточного продукта реакции уридин-5'-фосфата с гидроксилaminом, полученные на основании его изменений в буферных растворах при 40°:

pH	3,6	7	8
$k_1 \cdot 10^3, \text{ мин}^{-1}$,	7	9	7
$k_2 \cdot 10^3, \text{ мин}^{-1}$	—	5	12

При pH > 7 параллельно идет превращение по пути II → III + IV; скорость этой реакции в диапазоне pH 7—9 приблизительно пропорциональна концентрации OH⁻-ионов и не зависит от концентрации гидроксилamina (табл. 1). Исходя из этого, общую схему реакции можно представить в виде:



Располагая этими данными и учитывая, что из всех компонентов реакционной смеси только соединения I и III имеют характерные спектры поглощения в области 240—280 мμ (^{2, 8}), мы определили константы скоростей отдельных стадий по изменению спектров реакционных смесей.

Для реакции, идущей по приведенной выше схеме, систему кинетических уравнений можно представить в матричной форме (⁷) и свести к следующим уравнениям, содержащим искомые (k_1 , k_{-1} и k_2), эксперимен-

тально определяемые (D' , D'' , dD'/dt и dD''/dt) * и известные (C , ε_1 , ε_2 и ε_3) величины:

$$\frac{dD'}{dt} = k_1 C D_i + \frac{k_{-1}}{\varepsilon_3 - \varepsilon_2} B,$$

$$\frac{dD''}{dt} = \frac{\varepsilon_1'' - \varepsilon_3''}{\varepsilon_1'} \frac{dD'}{dt} + \frac{1}{\varepsilon_1'} k_2 C B,$$

где $B = [(\varepsilon_3'' - \varepsilon_1'')(D_0' - D_i') + \varepsilon_1'(D_0'' - D_i'')]$; k_1 , k_{-1} и k_2 — константы скоростей соответствующих стадий реакции; D_0' , D_0'' — оптические плотности реакционной смеси при 275 и 247 мμ в нулевой момент, D_i' и D_i'' — в момент t ; ε_i' и ε_i'' — молярные экстинкции уридина ($i = 1$) ⁽⁸⁾, промежуточного продукта ($i = 2$) ** и изоксазолона ($i = 3$) ⁽²⁾ при 275 и 247 мμ соответственно; C — начальная концентрация ГА.

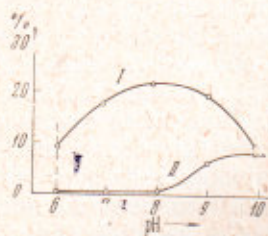


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость от pH изменения концентраций исходного вещества (I) и изоксазолона (II) при реакции уридин-5'-фосфата (I) с гидросиламином (за 30 мин. при 30°, 2 M NH₂OH·HCl, вычислено по данным, приведенным в табл. 1)

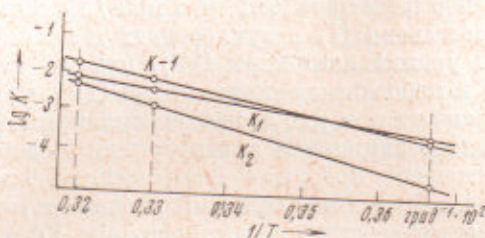


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость от обратной температуры констант скоростей отдельных стадий реакции уридин-5'-фосфата с гидросиламином при pH 8,0

Как видно из данных табл. 1, константа скорости первой стадии имеет максимальное значение при pH 8, что свидетельствует о том, что эта стадия является результатом взаимодействия нейтрального урацильного ядра с нейтральной молекулой ГА. Из рис. 1 видно, что оптимальные скорости убыли исходного вещества (I) и накопления продуктов реакции (III + IV) достигаются при разных значениях pH 8 и 10 соответственно (ср. ⁽²⁾), т. е. при pH < 10 понижение оптической плотности (при 260—275 мμ) реакционной смеси не может служить мерой превращения I → III + IV.

Зависимость констант скоростей стадий от температуры хорошо укладывается на прямую в аррениусовых координатах (рис. 2). Различие в энергиях активации стадий I $\xrightarrow{k_1}$ II и II $\xrightarrow{k_{-1}}$ I (табл. 1) согласуется с полученными ранее данными — при более низких температурах в реакционной смеси накапливается большее количество промежуточного продукта ⁽⁵⁾.

Таким образом, данные, полученные при непосредственном изучении превращений промежуточного продукта и при математическом анализе изменений спектральных характеристик реакционных смесей хорошо совпадают, что свидетельствует в пользу правильности предложенной ранее схемы реакции ⁽³⁾. Это позволяет рационально использовать ГА для хими-

* Значения dD'/dt и dD''/dt рассчитывали исходя из экспериментальной зависимости D' и D'' от времени методом локальной квадратичной параболы по пяти точкам.

** Вычисленная исходя из этой системы уравнений величина экстинкции промежуточного продукта при 247 мμ (ε_2'') статистически значимо не отличается от нуля, что соответствует теоретическим представлениям о порядке этой величины.

Таблица 1

Константы скоростей отдельных стадий реакции уридин-5'-фосфата с гидроксиламином, полученные из кинетического анализа изменения спектров реакционных смесей

pH	Т-ра, °C	[H ₂ NOH], M	$k_1 \cdot 10^3$, л·моль ⁻¹ ·мин ⁻¹	$k_{-1} \cdot 10^3$, мин ⁻¹	$k_2 \cdot 10^3$, мин ⁻¹
6	30	2,0	1,5	7,4	0,2
7	30	2,0	3,6	6,6	0,3
8	30	2,0	5,2	9,0	2,3
9	30	2,0	4,8	24,3	28
10	30	2,0	4,0	8,5	32
8	0	2,0	0,4	0,3	0,02
8	40	0,93	8,2	20,2	8,4
8	40	1,5	—	—	8,3
8	40	2,0	8,0	18,4	8,2
8	40	3,0	—	—	8,1
8	40	4,0	—	—	8,9
Энергия активации, при pH 8 (ккал/моль)			13	17	23

ческой модификации нуклеиновых кислот с целью изучения их структуры и функций (9).

Экспериментальная часть

6-Оксиамино-5,6-дигидроуридин-5'-фосфат (II), содержащий 15—20% исходного уридин-5'-фосфата выделяли по описанной ранее методике (3). Скорость превращений II → I и II → III + IV определяли следующим образом: смесь II + I (с известным соотношением II : I) вносили в буферные растворы (pH 3,6—0,025 M кислый фталат калия; pH 7,0 и 8,0—0,1 M фосфатные буферы) с концентрацией 10⁻³ M трилона и инкубировали при заданной температуре. В аликвотах, отбирившихся через определенные промежутки времени, измеряли A²⁷⁵ до и после кислотного гидролиза (0,4 N HCl, 100°C, 20 мин.). Увеличение A²⁷⁵ пробы до гидролиза характеризует превращение II → I, изменение A²⁷⁵ после гидролиза характеризует превращение II → III + IV (в условиях гидролиза изоксазолон-3 (III) разрушается (2), промежуточное соединение II превращается в исходное (I) (5)).

Кинетические данные были получены при математической обработке результатов изменений A²⁷⁵ и A²⁴⁷ реакционных смесей, содержащих 1,2 · 10⁻⁴ M уридин-5'-фосфата, 10⁻³ M трилона и соответствующие концентрации NH₂OH · HCl. pH смесей доводили до заданного значения 1 N NH₂OH или 5 M KOH.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
31 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Schuster, J. Mol. Biol., 3, 447 (1961). ² D. W. Verwoerd, H. Kohlhaege, H. Zillig, Nature, 192, 1038 (1961). ³ Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Н. А. Симуква, Биохимия, 27, 520 (1962). ⁴ N. K. Kochetkov, E. I. Budowsky et al., Biochem. et biophys. acta, 142, 35 (1967). ⁵ Э. И. Будовский, В. Д. Домкин, Н. К. Кочетков, ДАН, 190, № 1 (1970). ⁶ S. Janion, D. Shugar, Acta Biochim. Polon., 12, 338 (1965). ⁷ В. Н. Писаренко, А. Г. Погорелов, Планирование кинетических исследований, «Наука», 1969. ⁸ Нуклеиновые кислоты (под ред. Э. Чаргаффа и Д. Дэвидсона), ИЛ, 1961. ⁹ N. K. Kochetkov, E. I. Budowsky, In: Progr. Nucl. Ac. Res. and Molec. Biol., N. Y.—London, 1969, p. 403.