

Применение метода меченых атомов для определения положения равновесия при гидролизе эфиров фосфорной кислоты

Л. М. Гинодман

Кафедра биологической химии Военно-медицинской академии, Ленинград

При расчете величины свободной энергии важной промежуточной реакции в обмене веществ, а именно, реакции гидролиза, богатой энергией фосфатной связи в аденоциантифосфорной кислоте [1] возникла необходимость иметь точные данные для величины свободной энергии гидролиза эфиров фосфорной кислоты: глицерофосфата и глюкозо-6-фосфата.

Надежным методом измерения свободной энергии химической реакции является определение положения равновесия в изучаемой системе. Константа равновесия связана со свободной энергией реакции соотношением:

$$\Delta F = -RT \ln K.$$

Определение равновесных концентраций легко осуществимо при помощи обычных аналитических методов лишь в тех случаях, когда равновесие не сдвинуто резко в одну сторону. При гидролизе глицерофосфата в разбавленном водном растворе при достижении состояния равновесия легко определимы концентрации воды, фосфата и глицерина. Равновесную же концентрацию глицерофосфата обычными аналитическими методами определить нельзя. Это может быть сделано при помощи меченых атомов. Если взять в качестве исходных компонентов меченный фосфат и глицерин, то синтезированный глицерофосфат будет иметь такой же изотопный состав, как и исходный свободный фосфат. Если выделить глицерофосфат из опытной смеси в чистом состоянии, то по его радиоактивности можно определить равновесную концентрацию синтезированного глицерофосфата.

В другом случае в качестве исходного вещества следует взять меченный глицерофосфат и после установления равновесия определить по радиоактивности его равновесную концентрацию.

В приводимых ниже опытах по изучению равновесия, после того как положение равновесия было достигнуто в направлении синтеза эфира, смесь разводилась водой, что вызывало частичный гидролиз синтезированного эфира, и положение равновесия достигалось в направлении гидролиза.

1. Вычисление константы равновесия

Константа равновесия реакции гидролиза глицерофосфата

$$K = \frac{[\text{фосфат}] \cdot [\text{глицерин}]}{[\text{глицерофосфат}] \cdot [\text{вода}]}$$

может быть рассчитана по величинам исходных концентраций фосфата (c_{Φ}^0), глицерина ($c_{\Gamma\Phi}^0$), исходной радиоактивности фосфата (A_{Φ}^0) и равновесной радиоактивности глицерофосфата ($A_{\Gamma\Phi}^P$). Концентрация воды в условиях разбавленных водных растворов остается практически постоянной.

В выражении (1) для константы равновесия

$$K = \frac{c_{\Phi}^P \cdot c_{\text{ГЛ}}^P}{c_{\text{ГФ}}^P \cdot c_{\text{H}_2\text{O}}}, \quad (1)$$

где c_{Φ}^P , $c_{\text{ГЛ}}^P$, $c_{\text{ГФ}}^P$ — равновесные концентрации фосфата, глицерина, глицерофосфата. $c_{\text{H}_2\text{O}}$ — концентрация воды.

На основании равенства изотопного состава:

$$\frac{c_{\text{ГФ}}^P}{c_{\Phi}^0} = \frac{A_{\text{ГФ}}^P}{A_{\Phi}^0} \quad (2)$$

и

$$c_{\text{ГФ}}^P = \frac{A_{\text{ГФ}}^P}{A_{\Phi}^0} \cdot c_{\Phi}^0, \quad (3)$$

а также

$$\frac{A_{\text{ГФ}}^P}{A_{\Phi}^P} = \frac{c_{\text{ГФ}}^P}{c_{\Phi}^P} \quad (4)$$

и

$$c_{\Phi}^P = \frac{A_{\Phi}^P}{A_{\text{ГФ}}^P} \cdot c_{\text{ГФ}}^P, \quad (5)$$

но

$$A_{\Phi}^P = A_{\Phi}^0 - A_{\text{ГФ}}^P. \quad (6)$$

Подставим (6) в (5) и получим:

$$c_{\Phi}^P = \frac{(A_{\Phi}^0 - A_{\text{ГФ}}^P)}{A_{\text{ГФ}}^P} \cdot c_{\text{ГФ}}^P. \quad (7)$$

Равновесная концентрация глицерина будет равна:

$$c_{\text{ГЛ}}^P = c_{\text{ГЛ}}^0 - c_{\text{ГФ}}^P. \quad (8)$$

Подставим (3), (7), (8) в (1) и после незначительных преобразований получим:

$$K = \frac{c_{\text{ГЛ}}^0 \cdot A_{\Phi}^0}{A_{\text{ГФ}}^P \cdot c_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{c_{\Phi}^0}{c_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{c_{\text{ГЛ}}^0}{c_{\text{H}_2\text{O}}} + \frac{c_{\Phi}^0 \cdot A_{\text{ГФ}}^P}{c_{\text{H}_2\text{O}} \cdot A_{\Phi}^0}. \quad (9)$$

Константа равновесия выражена через величины исходных концентраций глицерина и фосфата и радиоактивности фосфата в исходном состоянии и глицерофосфата в состоянии равновесия.

В выражении (9) величиной $\frac{c_{\Phi}^0 \cdot A_{\text{ГФ}}^P}{c_{\text{H}_2\text{O}} \cdot A_{\Phi}^0}$ можно пренебречь по сравнению с

$\frac{c_{\text{ГЛ}}^0 \cdot A_{\Phi}^0}{c_{\text{H}_2\text{O}} \cdot A_{\text{ГФ}}^P}$, так как c_{Φ}^0 и $c_{\text{ГЛ}}^0$ — являются величинами одного порядка, а $A_{\text{ГФ}}^P \ll A_{\Phi}^0$ в опытах в условиях разбавленных водных растворов. Если исходные концентрации фосфата и глицерина не превышают $0,1 M$, то величинами $\frac{c_{\Phi}^0}{c_{\text{H}_2\text{O}}}$ и $\frac{c_{\text{ГЛ}}^0}{c_{\text{H}_2\text{O}}}$ в выражении (9), не превышающими значения $\frac{1}{500}$ при рассмотрении реакции гидролиза фосфорных эфиров, можно также пренебречь, так как константа равновесия является величиной близкой к единице, и формула (9) перейдет в (10)

$$K = \frac{c_{\text{ГЛ}}^0 \cdot A_{\Phi}^0}{c_{\text{H}_2\text{O}} \cdot A_{\text{ГФ}}^P} \quad (10)$$

2. Равновесие в системе: глицерофосфат + вода = глицерин + фосфат

Методика работы и препараты. Определение свободной фосфорной кислоты проводилось по методу Фиске и Суббароу. Буферный раствор — ацетат-вероналовый. Концентрация водородных ионов в опытных смесях определялась при помощи водородного и хингидронного электродов. Измерение радиоактивности препаратов производилось при помощи установки *B*. Препарат щелочной фосфатазы был получен нами по методу, предложенному Альберсом [см. 2] из свиных почек. *L*-глицерофосфат натрия и глицерин — фабричные препараты.

В табл. 1 приводится пример постановки опытов по определению равновесия в рассматриваемой системе. В смесях 1, 2, 3, 4 шел синтез глицерофосфата из глицерина и меченого фосфата. Смеси 5 и 6, в которые не был добавлен фермент, являлись контрольными для внесения поправок.

ТАБЛИЦА 1

Состав опытных смесей

(Концентрация глицерина 0,2 и 0,1 M; pH 8,3; температура 37°)

Компоненты	Смесь									
	1	2	3	4	5	6	7	8	1а	2а
Глицерин 1 M, 1 мл . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	Смесь 1 по окончании опыта разведена водой в 2 раза	Смесь 2 по окончании опыта разведена водой в 2 раза
Фосфат (1 675 000 отсч/мин., 6000 μ г*)	+	+	+	+	+	+	—	—		
Глицерофосфат (1540 μ г)	—	—	—	—	—	—	+	+		
Фермент 5 мг	+	+	+	+	—	—	+	+		
Буферный раствор 1 мл	+	+	+	+	+	+	+	+		
Вода до 5 мл	+	+	+	+	+	+	+	+		
Хлороформ 4 капли	+	+	+	+	+	+	+	+		

* Количество свободной фосфорной кислоты и ее эфира выражено в μ г фосфора.

ки на эффективность отмывания меченого неорганического фосфата от фосфоглицерина при анализе проб. В смесях 7 и 8 шел гидролиз глицерофосфата, меченный фосфат не добавлялся; по данным этих опытов мы судили о времени, к которому практически полностью расщеплялся добавленный глицерофосфат. Через трое суток инкубации, когда данные анализа смесей 7 и 8 показывали практически полное расщепление глицерофосфата, был проведен анализ смесей 1, 2, 3, 4 на количество синтезированного глицерофосфата. Опыты 1а и 2а являлись смесями 1 и 2, которые после инкубации в течение трех суток были разведены водой в два раза. Анализ опытов 1а и 2а проводился через двое суток после разведения смесей 1 и 2. Исходная концентрация глицерина в смесях 1—6 была равна 0,2 M; в опытах 1а и 2а — 0,1 M.

3. Ход анализа для определения радиоактивности синтезированного эфира

Добавление носителя и осаждение белков. К 10 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты в центрифужной пробирке добавлено 2 мл раствора носителя *L*-глицерофосфата натрия (13 мг) и 2 мл анализируемой опытной смеси. После стояния в течение 15 мин. осадок белков отцентрифугирован и выброшен.

Отделение меченого неорганического фосфата. К центрифугату добавлено 0,5 мл 50% $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 2 N NaOH до щелочной реакции на фенолфталеин, который был добавлен прямо в раствор. После охлаждения в течение 15 мин. в ледяной бане, при отчетливом оседании осадка он отцентрифугирован, а осадок фосфата бария выброшен.

Отмывание от остатков меченого неорганического фосфата. Центрифугат подкислялся 2 N HCl (4—5 капель); добавлялся 1 мл 0,2 M KН₂РО₄. (Подкисление центрифугата соляной кислотой перед добавлением неорганического фосфата обеспечивало равномерное перемешивание оставшегося в растворе и добавленного свободного фосфата.) Жидкость подщелачивалась 2 N NaOH по фенолфталеину, добавлялось 0,5 мл 50% Ba(CH₃COO)₂, и если необходимо, еще 2 N NaOH. После охлаждения в течение 15 мин. производилось центрифугирование. Осадок фосфата бария с остатками меченого фосфата выбрасывался. Дополнительные отмывания проводились еще 3 раза.

Выделение носителя. Центрифугат после четвертого отмывания и проверки на полноту осаждения свободного фосфата добавлялся к четырехкратному объему 96° спирта. После стояния смеси в холодильнике в течение 12 час. осадок глицерофосфата бария собирался центрифугированием, промывался спиртом и эфиром и высушивался в вакуум-экскитаторе. Высушенный осадок глицерофосфата бария растворялся в 5 каплях 2 N HCl, раствор при помощи пипетки переводился на беззольную фильтровальную бумагу, подсушивался над электроплиткой. Бумажка покрывалась тонкой пленкой коллоидия.

Определение количества радиоактивного и общего фосфора. Бумажка прижималась к камере счетчика и производилось определение количества отсчетов за 5 мин. До и после счета активности препарата определялось число отсчетов фона. После счета радиоактивности глицерофосфат, нанесенный на бумажку, подвергался минерализации и определялось количество общего фосфора.

Через 60 час. инкубации в смесях 7 и 8 гидролизовалось 97% глицерофосфата. Через 72 часа от начала опыта были проанализированы смеси 1—4, а еще через 48 час. пробы 1а и 2а. На анализ брались по 2 мл из смесей 1—6 и по 4 мл из пробы 1а и 2а; активность общего фосфата в анализируемом объеме составляла 670 000 отсч/мин.

В контрольных анализах 5 и 6 на (203 + 412) μg выделенного глицерофосфата величина активности составляла 5 отсч/мин. Следовательно, за счет неотмытого меченого фосфата на каждый микрограмм выделенного из опытных проб глицерофосфата приходилось

$$\frac{5}{203+412} = 0,08 \text{ отсч/мин.}$$

Данные анализов и расчет радиоактивности синтезированного глицерофосфата представлены в табл. 2.

ТАБЛИЦА 2

Данные анализов смесей и расчет активности синтезированного глицерофосфата

(К анализируемым смесям было добавлено 13 000 μg глицерофосфата)

Смеси	Выделено препарата глицерофосфата в μg	Активность выделенного препарата глицерофосфата в отсч/мин.	Величина отношения: к-во выделенного глицерофосфата к во выделенного глицерофосфата	Активность неотмытого свободного фосфата в выделенном препарате глицерофосфата в отсч/мин.	Активность фосфора выделенного глицерофосфата в отсч/мин.	Активность всего синтезированного глицерофосфата в отсч/мин.	Среднее значение активности синтезированного глицерофосфата в отсч/мин.
1	310	120	42	2	118	4956	
2	284	138	46	2	136	6256	
3	141	65	92	1	64	5888	
4	286	135	45	2	133	6051	
1a	650	139	20	5	134	2680	
2a	325	70	40	3	67	2680	
							5788
							2680

Принимая концентрацию воды в 54,5 M для смесей 1—4 с концентрацией глицерина 0,2 M и 55 M для опытов 1а и 2а с концентрацией глицерина 0,1 M, рассчитываем константу равновесия:

$$K = \frac{0,2 \cdot 670000}{54,5 \cdot 5788} = 0,43 \text{ — при концентрации глицерина } 0,2 \text{ M}$$

$$K = \frac{0,1 \cdot 670000}{55 \cdot 2680} = 0,45 \text{ — при концентрации глицерина } 0,1 \text{ M.}$$

Результаты опытов по определению положения равновесия в системе: глицерофосфат + вода = глицерин + фосфат суммированы в табл. 3.

ТАБЛИЦА 3

Величины константы равновесия $K = \frac{[\text{глицерин}][\text{фосфат}]}{[\text{глицерофосфат}][\text{вода}]}$ при различных концентрациях глицерина и различных рН; температура 37°

рН	Синтез			Гидролиз		
	концентрация глицерина (M)	число опытов	константа равновесия (K)	концентрация глицерина (M)	число опытов	константа равновесия (K)
6,7	0,2	4	0,76	0,1	2	0,68
7,5	9,6	4	1,1	9,6	2	0,91
7,8	9,6	2	0,95	9,6	2	0,74
8,3	1	4	0,41	0,5	2	0,45
8,3	0,2	4	0,43	0,1	2	0,45
8,8	4,1	3	0,65	—	—	—

Данные опытов показывают, что при уменьшении концентрации глицерина константа равновесия гидролиза, рассчитанная по отношению равновесных концентраций (не активностей), уменьшается. В области концентраций глицерина от 1 M и ниже дальнейшее разбавление раствора не влияет на величину константы равновесия, что обусловлено, повидимому, практическим совпадением величин отношения активностей и молярных концентраций. При переходе из области кислой среды в щелочную равновесие сдвигается в направлении синтеза глицерофосфата. При близком к физиологическим величинам рН (6,7) константа равновесия найдена равной 0,68—0,75.

Принимая во внимание, что тепловой эффект гидролиза глицерофосфата $\Delta H = 1275$ кал/моль [3], учитывая изменение константы равновесия с изменением рН, и по уравнению изохоры реакции мы нашли, что константа равновесия гидролиза глицерофосфата при рН 7 и температуре 25° равна 0,63. Свободная энергия гидролиза глицерофосфата, в условиях водного раствора при концентрациях компонентов 1 M, рН 7 и 25°, $\Delta F = -2100$ кал/моль.

При высокой концентрации глицерина (9,6 M) было хорошее совпадение результатов, полученных как при помощи меченых атомов, так и по данным определений концентраций свободного фосфата. Результаты этих опытов согласуются также с данными, полученными в работах Кея [4], Белицера и Цыперовича [5], Мейергофа и Грина [6].

4. Равновесие в системе: глюкозо-6-фосфат + вода = глюкоза + фосфат

При помощи метода меченых атомов мы показали установление положения равновесия при гидролизе глюкозо-6-фосфата в условиях разбавленных водных растворов с концентрацией глюкозы 0,01—0,2 M, т. е. в области концентраций от 180 до 3600 мг % глюкозы.

Необходимо сразу же отметить большую сложность случая по сравнению с рассмотренным выше равновесием при гидролизе глицерофосфата,

так как за время инкубации, продолжавшейся 3—5 суток, в результате энолизации глюкозы в опытных смесях появлялась фруктоза, составляя 8% от количества добавленной глюкозы. Следовательно, в опытных смесях, кроме синтеза глюкозофосфата, благодаря образованию фруктозы, был возможен синтез фруктозофосфатов из фруктозы и свободного фосфата.

Препараты и методы. Гексозофосфат был взят в форме бариевой соли. Определенное по скорости гидролиза эфира в 1 N HCl при 100° содержание глюкозо-6-фосфата составляло в нем 76%, а фруктозо-6-фосфата — 24%. Глюкозо-6-фосфат был получен из гексозофосфата после 12-часового гидролиза в 1 N HCl.

Глюкоза — фабричный препарат. Концентрация глюкозы в концентрированных растворах, являвшихся исходными при составлении опытных смесей, определялась поляриметрически. Фруктоза определялась по методу Roy [7].

В табл. 4 приводится пример постановки опытов по установлению равновесия в рассматриваемой системе.

ТАБЛИЦА 4
Состав опытных смесей

(Концентрация глюкозы 0,04 и 0,02 M; pH 8,2; температура 37°)

Компоненты	Смеси								
	1	2	3	4	5	6	7	3а	4а
Глюкоза 0,2 M — 1 мл	+	+	+	+	+	+	+	Смесь 3	Смесь 4
Фосфат (7 375 000 отч/мин., 2610 μг)	+	+	+	+	+	—	—	разведена водой в 2 раза	разведена водой в 2 раза
Глюкозо-6-фосфат (900 μг)	—	—	—	—	—	+	+		
Фермент 5 мг	+	+	+	+	+	+	+		
Буферный раствор 1 мл	+	+	+	+	+	+	+		
Вода до 5 мл	+	+	+	+	+	+	+		
Хлороформ 4 капли	+	+	+	+	+	+	+		

В смесях 1—5 шел синтез глюкозо-6-фосфата из глюкозы и меченого фосфата. В смесях 6 и 7 шел гидролиз глюкозо-6-фосфата, меченный фосфат не добавлялся; по данным смесей 6 и 7 можно было сделать заключение о моменте времени, к которому, по данным определений свободного фосфата, практически «полностью» расщеплялся добавленный глюкозо-6-фосфат. Опыты 3а и 4а являются опытными смесями 3 и 4, которые после инкубации в течение трех суток были разведены водой в 2 раза. Анализ проб 3а и 4а проводился через двое суток после разведения смесей 3 и 4. Анализ смесей на определение количества синтезированного меченого эфира проводился так же, как это было описано выше в предыдущей части работы.

При анализе опытов для выделения синтезированного меченого глюкозофосфата в качестве носителя добавлялся препарат гексозофосфата, содержащий 76% глюкозо-6-фосфата и 24% фруктозо-6-фосфата.

Выделенный после отмывания меченого неорганического фосфата гексозофосфат отличался по составу от добавленного гексозофосфата; он содержал 88,5% глюкозо-6-фосфата и 11,5% фруктозо-6-фосфата, так как в процессе отмывания при осаждении свободного фосфата глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат также частично выпадали в осадок, но в ином соотношении по сравнению с их содержанием в добавлявшемся препарате гексозофосфата. При учете синтеза эфиров фруктозы мы ограничились допущением на основании данных Мейергофа и Грина [6], что этот синтез осуществляется со средним выходом в два раза большим по сравнению с синтезом эфиров глюкозы. Следовательно, 92% глюкозы и 8% фруктозы обуславливали синтез эфиров глюкозы и фруктозы не в отношении 92 : 8, а в отношении 92 : 8 · 2 = 92 : 16. Мы приняли также, что имевшийся в препарате гексозофосфата фруктозофосфат являлся носителем для синтезированного фруктозофосфата.

Расчет доли активности глюкозо-6-фосфата по отношению к общей активности выделенного из опытной смеси гексозофосфата производился следующим образом.

Если число отсчетов глюкозо-6-фосфата в выделенном гексозофосфате обозначить через x , число отсчетов фруктозофосфата через y ; величинами n_1 и n_2 обозначить отношения:

$$n_1 = \frac{\text{количество добавленного глюкозо-6-фосфата}}{\text{количество выделенного глюкозо-6-фосфата}},$$

$$n_2 = \frac{\text{количество добавленного фруктозо-6-фосфата}}{\text{количество выделенного фруктозо-6-фосфата}},$$

тогда $n_1 \cdot x$ будет обозначать активность глюкозо-6-фосфата в анализируемом объеме пробы, а $n_2 \cdot y$ — активность фруктозофосфата в том же объеме. Учитывая, что в условиях изотопного равновесия, имевшего место в опытах, активности эфиров относятся так же, как их концентрации, можно написать, что

$$\frac{n_1 \cdot x}{n_2 \cdot y} = \frac{92}{16}. \quad (1)$$

Обозначая количество добавленного гексозофосфата через B , а количество выделенного гексозофосфата через b , количество добавленного глюкозо-6-фосфата следует считать равным 0,76. B , а количество выделенного глюкозо-6-фосфата — 0,885 b (глюкозо-6-фосфат составлял 76% добавленного гексозофосфата и 88,5% выделенного). В этом случае

$$n_1 = \frac{0,76 B}{0,885 b}. \quad (2)$$

Аналогично для фруктозофосфата получим:

$$n_2 = \frac{0,24 B}{0,115 b}. \quad (3)$$

Разделим (2) на (3) и найдем величину отношения $\frac{n_1}{n_2}$:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{0,76}{0,885} \cdot \frac{0,115}{0,24} = 0,41. \quad (4)$$

Чтобы найти величину отношения $\frac{x}{y}$, подставим (4) в (1):

$$0,41 \cdot \frac{x}{y} = \frac{92}{16}; \quad (5)$$

$$\frac{x}{y} = 14 \quad (6)$$

или

$$\frac{y}{x} = \frac{1}{14}. \quad (6a)$$

Доля отсчетов глюкозо-6-фосфата в выделенном гексозофосфате может быть найдена следующим путем из (6а):

$$\frac{x+y}{x} = \frac{15}{14}, \quad (7)$$

где $(x+y) = A_{\text{гф}}$ представляет число отсчетов выделенного гексозофосфата, следовательно,

$$\frac{A_{\text{гф}}}{x} = \frac{15}{14}, \text{ откуда } x = \frac{14}{15} A_{\text{гф}} \text{ или } x = 0,93 A_{\text{гф}}.$$

Следовательно, число отсчетов глюкозо-6-фосфата составляет 93% общего количества отсчетов выделенного эфира, а 7% отсчетов приходится на эфиры фруктозы.

Через двое суток инкубации в смесях 6 и 7 расщепилось 93% добавленного глюкозо-6-фосфата. Через трое суток инкубации был проведен анализ смесей 1—5, а еще через двое суток анализ опытов 3а и 4а на количество синтезированного гексозофосфата.

На анализ бралось по 2 мл смеси 1—5 и по 4 мл из опытов За и 4а. Активность общего фосфата в исследуемом объеме составляла 2 950 000 отсч/мин. Контрольные анализы, проведенные сразу после смешения компонентов, показали, что средняя величина активности неотмытого меченого фосфата на 1 $\mu\text{г}$ фосфора выделенного эфира составляла 0,06 отсч/мин. $\mu\text{г}$.

Данные анализа опытных смесей и расчетов радиоактивности синтезированного глюкозо-6-фосфата представлены в табл. 5.

ТАБЛИЦА 5

Данные анализов смесей и расчетов радиоактивности синтезированного глюкозо-6-фосфата

(К анализируемым смесям было добавлено 5875 $\mu\text{г}$ гексозофосфата)

Смеси	Выделено препарата гексозофосфата в $\mu\text{г}$	Активность выделенного препарата гексозофосфата в отсч/мин.	Активность неотмытого свободного фосфата в выделенном препарате гексозофосфата в отсч/мин.	Активность выделенного гексозофосфата $A_{\text{ГФ}}$ отсч/мин.	$n_1 = \frac{0,76 B}{0,885 b}$	Активность глюкозо-6-фосфата в выделенном препарате ($x=0,93$ АГФ) в отсч/мин.	$n_1 = 1742$	Активность синтезированного глюкозо-6-фосфата ($n_1 x$), в отсч/мин.	Среднее значение активности синтезированного глюкозо-6-фосфата в отсч/мин.
1	381	165	23	142	132	13,2	1742		
2	219	110	13	97	90	23,0	2070		
3	294	120	18	102	95	17,1	1625		
4	212	105	13	92	86	23,8	2047		
5	350	160	21	139	129	14,4	1858		
3а	400	118	24	94	87	12,6	1096		
4а	256	70	15	55	51	19,7	1050		
								1868	
									1073

При расчете константы равновесия следует учесть, что в смесях 1—5 концентрация глюкозы в конце опыта составляла 92% от исходной (так как 8% глюкозы превратилось в фруктозу) и была равна 0,0368 M , концентрация воды 55,2 M , активность свободного фосфата в анализируемом объеме смеси 2 950 000 отсч/мин., а равновесная активность глюкозо-6-фосфата — 1868 отсч/мин.

Пользуясь таким же соотношением, какое ранее было выделено для системы фосфоглицерина, находим:

$$K = \frac{0,0368 \cdot 2950000}{55,2 \cdot 1868} = 1,05.$$

В опытах За и 4а концентрация глюкозы составляла 0,0184 M ; концентрация воды 55,4 M , равновесная активность глюкозо-6-фосфата 1073 отсч/мин. и

$$K = \frac{0,0184 \cdot 2950000}{55,4 \cdot 1073} = 0,91.$$

В табл. 6 суммированы результаты нескольких серий опытов по установлению равновесия при синтезе глюкозо-6-фосфата при различных концентрациях глюкозы.

Мы приняли значение константы равновесия при pH 8,2 равным 0,98. Учитывая, что константа II диссоциации глюкозо-6-фосфата равна 6,11, по формуле, связывающей изменение константы равновесия с изменением pH, вычислено, что при pH 7,4 $K = 1,14$.

Величина константы равновесия, рассчитанная на основании опытов, приведенных при pH 7,4, имела значение 1,33 в опытах с синтезом

ТАБЛИЦА 6

Величины констант равновесий $K = \frac{(\text{глюкоза}) (\text{фосфат})}{(\text{глюкозо-6-фосфат}) (\text{вода})}$ в опытах с синтезом глюкозо-6-фосфата (рН 8,2; температура 37°)

Исходная концентрация глюкозы (M)	0,01	0,02	0,032	0,04	0,02
Число опытов	4	4	2	2	5
Величина константы равновесия K	0,97	0,99	1,12	0,91*	0,97

* Равновесие достигалось в направлении гидролиза глюкозо-6-фосфата.

глюкозо-6-фосфата (среднее из трех опытов, концентрация глюкозы 0,04 M) и 1,1 в опытах по гидролизу глюкозо-6-фосфата (среднее из двух опытов, концентрация глюкозы 0,02 M). Эти значения находятся в соглашении с приведенным выше значением константы равновесия 1,14.

Тепловой эффект гидролиза глюкозо-6-фосфата принимаем примерно равным тепловому эффекту гидролиза глицерофосфата; примем $\Delta H = -1000$ кал/моль. По уравнению изохоры реакции вычислено изменение величины константы равновесия при переходе от 37 к 25° и найдено, что при рН 7 и 25° $K = 1,48$.

Свободная энергия гидролиза глюкозо-6-фосфата в условиях водного раствора при концентрациях компонентов 1 M, рН 7 и 25° составит $\Delta F = -2600$ кал/моль, а при рН 7,4 и 37° $\Delta F = -2450$ кал/моль

Свободную энергию реакции гидролиза в условиях физиологических концентраций (ΔF_{Φ}) можно рассчитать, пользуясь формулой

$$\Delta F_{\Phi} = \Delta F^0 + RT \ln \frac{(\text{глюкоза}) (\text{фосфат})}{(\text{глюкозо-6-фосфат})},$$

где ΔF^0 — свободная энергия реакции гидролиза в условиях водного раствора при концентрациях компонентов 1 M.

Приняв для физиологических условий концентрацию глюкозы — 90 мг % или 0,005 M, концентрацию фосфата — 0,005 M, концентрацию глюкозо-6-фосфата — 0,005, получим:

$$\Delta F_{\Phi} = -2450 + 1420 \lg \frac{(0,005)(0,005)}{(0,005)} = -5700 \text{ кал/моль.}$$

Следовательно, в условиях физиологических концентраций гидролиз глюкозо-6-фосфата, т. е. соединение с «бедной энергией» фосфатной связью, сопровождается значительным освобождением свободной энергии — 5700 кал/моль; равновесие реакции резко сдвинуто в сторону образования продуктов гидролиза и равновесная концентрация глюкозо-6-фосфата в условиях физиологических концентраций глюкозы и фосфата составит $4 \cdot 10^{-7}$ M. При концентрации глюкозо-6-фосфата, большей чем $4 \cdot 10^{-7}$ M в присутствии фосфатазы будет происходить гидролиз эфира на глюкозу в свободный фосфат.

Самнер и Сомерс [8], рассматривая вопрос о равновесии при гидролизе соединений с «бедной энергией» фосфатной связью, приняв ΔF гидролиза равным — 3000 кал/моль, рассчитали, что в состоянии равновесия при концентрации эфира 0,001 M концентрации продуктов гидролиза должны составлять 2,87 M. Однако вычисления показывают, что

в рассматриваемом случае равновесные концентрации продуктов гидролиза составят не 2,87, а 0,4 M. Ошибка Самнера и Сомерса заключается в том, что они не приняли во внимание, что величина свободной энергии $\Delta F^{\circ} = -3000$ кал/моль рассчитана при условии гидролиза эфира в разбавленном водяном растворе, при концентрации воды — 55 M, и ввели в расчет еще раз концентрацию воды.

Заключение

Рассчитанные нами на основании опытов, проведенных в условиях разбавленных водных растворов, величины констант равновесия реакций гидролиза глицерофосфата и глюкозо-6-фосфата отличаются от величин, которые получаются при вычислении значений констант равновесия по величинам равновесных молярных концентраций в условиях опытов с концентрированными растворами глицерина и глюкозы [4, 5, 6].

Это расхождение обусловлено тем, что при расчете констант равновесия не учитываются значения коэффициентов активностей, которые весьма близки к единице в условиях разбавленных водных растворов и могут существенно отличаться от единицы в условиях концентрированных растворов. Поэтому более достоверными являются значения констант равновесия, рассчитанные на основании результатов опытов, проведенных в условиях разбавленных водных растворов.

Метод меченых атомов при применении препаратов весьма высокой радиоактивности дает возможность весьма точно определить столь незначительное количество вещества, которое не удается даже качественно обнаружить известными в настоящее время методами. Так, например, если 1 μ г радиоактивного фосфора, находящегося в составе фосфорной кислоты, обладает активностью в 100 000 отсч/мин., то можно уверенно определить синтезированный эфир фосфорной кислоты при содержании в нем всего лишь 0,001 μ г радиоактивного фосфора; радиоактивность синтезированного эфира составит 100 отсч/мин., что может быть достаточно точно измерено при помощи счетчика электронов.

Результаты опытов по изучению равновесия в реакции гидролиза глюкозо-6-фосфата показали, что при помощи метода меченых атомов удается определить количество компонентов в равновесии при величине отношения концентраций 5700 : 1, что, конечно, не является пределом.

Исследованные в настоящей работе методические приемы могут быть применены в тех случаях, когда необходимо по радиоактивности определить количество одного радиоактивного компонента, находящегося в смеси с большим избытком другого радиоактивного компонента.

Выводы

При помощи метода меченых атомов могут быть определены положения равновесия при гидролизе эфиров фосфорной кислоты в условиях разбавленных водных растворов.

Константы равновесия реакции гидролиза глицерофосфата

$$K = \frac{(\text{глицерин})(\text{фосфат})}{(\text{глицерофосфат})(\text{вода})} = 0,63 \text{ при pH 7 и } 25^{\circ}$$

и $\Delta F = -2100$ кал/моль при 1 M концентрациях компонентов.

Константы равновесия реакции гидролиза глюкозо-6-фосфата

$$K = \frac{(\text{глюкоза})(\text{фосфат})}{(\text{глюкозо-6-фосфат})(\text{вода})} = 1,48 \text{ при pH 7 и } 25^{\circ}$$

и $\Delta F = -2600$ кал/моль при 1 M концентрациях компонентов.

Поступила в редакцию
12.IV.1954

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимицов Г. Е. и Гинодман Л. М., Биохимия 18, 490, 1953.
2. Умбрейт В. В., Буррис Р. Х. и Штауффер Дж., Манометрические методы изучения тканевого обмена, Изд. ИЛ, М., 1951.
3. Ohlmeier P., Z. Physiol. Chem. 282, 1, 1945.
4. Кау Н. Д., Biochem. J. 22, 855, 1928.
5. Белицер В. А., Циперович А. С., Укр. биохим. ж., 19, 5, 1947.
6. Meuerhof O., Green H., J. Biol. Chem. 170, 1, 1947.
7. Roe J. H., J. Biol. Chem. 107, 15, 1934.
8. Самнер Д., Сомерс Г., Химия ферментов и методы их исследования, Изд. ИЛ, М., 1948.