

шагом  $0,5 \text{ см}^{-1}$ . На каждом шаге производили усреднение мощности сигнала АСКР по 50 лазерным импульсам для уменьшения влияния нестабильности излучения лазеров накачки.

Чтобы иметь возможность уверенно регистрировать спектры газов, особенно при их низком давлении, необходимо доработать схему АСКР-спектрометра. Для этого надо уменьшить уровень паразитных засветок от лучей накачки, увеличить чувствительность схемы, регистрирующей антистоксов сигнал, а также использовать элементы, управляющие направлением поляризации лучей накачки для уменьшения нерезонансного фона.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Ахманов С. А., Коротеев Н. И. Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света. М., 1981. 544 с. [2] Романов В. Ю., Барышников В. Н., Панаев Ф. И., Внуков П. В. // Информатика, вычислительная техника, автоматизация в науке и технике и народном хозяйстве. М., 1983. 104 с.

Поступила в редакцию  
10.10.90

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 2, ХИМИЯ. 1991. Т. 32, № 5

УДК 541.11

#### ЭНТАЛЬПИЯ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА *n*-НИТРОФЕНИЛФОСФАТА

М. В. Рехарский, С. А. Тищенко

(кафедра физической химии)

Представлены результаты термохимического определения энтальпии гидролиза *n*-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой (*E. coli*) и кислой фосфатазой (*aspergillus terrus*). (Исходя из экспериментальных данных были рассчитаны величины  $\Delta_r H_{aq}^0$  (298,15) для реакций (1) и (2), которые составили  $\Delta_r H_{aq}^0 = 2,1 \pm 1,8 \text{ кДж} \cdot \text{М}^{-1}$ ,  $\Delta_r H_{aq}^0 = -26,7 \pm 1,1 \text{ кДж} \cdot \text{М}^{-1}$ .

Общеизвестно, что *n*-нитрофенилфосфат является одним из модельных субстратов, служащих для определения активности многих ферментов, катализирующих реакции дефосфорилирования. Поэтому получение надежных значений энтальпий гидролиза данного соединения в кислой и щелочной областях представляет значительный интерес.

В настоящей статье представлены результаты определения энтальпии гидролиза *n*-нитрофенилфосфата  $\Delta_r H_{aq}^0$  (298,15) щелочной фосфатазой (*E. coli*) и кислой фосфатазой (*aspergillus terrus*).

**Экспериментальная часть.** Для определения энтальпии гидролиза использован микрокалориметр *LKB-2277 Bio Activity monitor* (Швеция) с титрационной ячейкой [1]. Исходное вещество: *n*-нитрофенилфосфатдинатриевая соль  $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6\text{NPNa}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$  (фирмы «Сигма» США) без дальнейшей очистки. Определения проводили в 0,05 М трис·НСI-буфере (рН 8,50) для щелочной фосфатазы и в 0,05 М ацетатном буфере (рН 3,0) — для кислой.

При термохимических измерениях в реакционную ячейку, содержащую 2 мл термостатированного раствора фермента (концентрацией 0,8—2,0 мг/мл), при помощи дозатора [1] вводили с интервалом в 30—

\* Содержание *n*-нитрофенилфосфата в исходном веществе определено экспериментально путем титрования соляной кислотой.

Таблица 1

Результаты определения энтальпии гидролиза *n*-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой (*E. coli*)  $\Delta_r H_{buf}^{0'}$  (298,15)

| Тепловыделение   |                   |        |                             | Концентрация               |                                 | $\Delta_r H_{buf}^{0'}$<br>(298,15), кДж/М |   |
|--|-------------------|--------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|--|---|
| $q_{\text{калибр}}$<br>Дж/усл. ед.                       | $q_{\text{опыт}}$ |        | $q_{\text{разбавл.}}$<br>Дж | $q_{\text{реакции}}$<br>Дж | щелочная<br>фосфатаза,<br>мг/мл |  | <i>n</i> -нитро-<br>фенол<br>(с), М·10* |
|  | усл. ед.          | Дж     |                             |                            |                                 |  |   |
| 0,000277   | 287               | 0,0796 | 0,0021                      | 0,0775                     | 0,940*                          | 1,950                                      | —39,7                                   |
| 0,000277   | 160               | 0,0443 | 0,0011                      | 0,0432                     | 0,940*                          | 0,975                                      | —44,3                                   |
| 0,000277   | 151               | 0,0418 | 0,0011                      | 0,0407                     | 0,940*                          | 0,975                                      | —41,7                                   |
| 0,000284   | 232               | 0,0660 | 0,0015                      | 0,0644                     | 0,889*                          | 1,406                                      | —45,8                                   |
| 0,000284   | 421               | 0,1197 | 0,0031                      | 0,1166                     | 0,889*                          | 2,811                                      | —41,5                                   |
| 0,000284   | 414               | 0,1176 | 0,0031                      | 0,1145                     | 0,889*                          | 2,811                                      | —40,7                                   |
| 0,000274   | 163               | 0,0446 | 0,0011                      | 0,0435                     | 4,216**                         | 0,980                                      | —44,4                                   |
| 0,000274   | 299               | 0,0820 | 0,0021                      | 0,0799                     | 4,216**                         | 1,960                                      | —40,8                                   |
| 0,000274   | 170               | 0,0465 | 0,0011                      | 0,0454                     | 4,216**                         | 0,980                                      | —46,3                                   |
| 0,000274   | 341               | 0,0933 | 0,0021                      | 0,0912                     | 4,216**                         | 1,960                                      | —46,5                                   |
| 0,000274   | 164               | 0,0450 | 0,0011                      | 0,0439                     | 2,91**                          | 1,002                                      | —43,8                                   |
| Среднее $\Delta_r H^{0'} = q_{\text{реакции}}/c$ , кДж/М |                   |        |                             |                            |                                 |  | —43,2±1,8***                            |

Примечание. Реакция гидролиза (1) в 0,05 М трис · HCl-буфере pH 8,50.

\* Щелочная фосфатаза (*E. coli*), очищенная, производства Олайне.

\*\* Щелочная фосфатаза (*E. coli*), производство Reanal.

\*\*\* Погрешность посчитана для 95% доверительного интервала.

Таблица 2

Результаты определения энтальпии гидролиза *n*-нитрофенилфосфата кислой фосфатазой (*aspergillus terreus*)  $\Delta_r H_{buf}^{0'}$  (298,15)

| Тепловыделение  |                         |                             |                            | Концентрация                 |                                   | $\Delta_r H_{buf}^{\circ}$<br>(298,15 К),<br>кДж/М |
|---|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| $q_{\text{калибр}}$<br>Дж/усл. ед                           | $q_{\text{опыт}}$<br>Дж | $q_{\text{разбавл.}}$<br>Дж | $q_{\text{реакции}}$<br>Дж | кислая фос-<br>фатаза, мг/мл | <i>n</i> -нитрофенол,<br>с, М·10* |  |
| 0,000267  | 0,0492                  | 0,0020                      | 0,0471                     | 1,729                        | 1,86                              | —25,4  |
| 0,000267  | 0,0407                  | 0,0016                      | 0,0390                     | 1,291                        | 1,49                              | —26,2  |
| 0,000279  | 0,0602                  | 0,0024                      | 0,0573                     | 0,921                        | 2,17                              | —26,7  |
| 0,000262  | 0,0620                  | 0,0025                      | 0,0595                     | 0,936                        | 2,29                              | —26,0  |
| 0,000282  | 0,0690                  | 0,0029                      | 0,0662                     | 0,838                        | 2,65                              | —25,0  |
| Среднее $\Delta_r H^{\circ} = q_{\text{реакции}}/c$ , кДж/М |                         |                             |                            |                              |                                   | —25,9±1,1*   |

Примечание. Реакция гидролиза (2) в 0,005 М ацетатном буфере pH 3,0.

\* Погрешность посчитана для 95% доверительного интервала.

40 мин 0,06—0,012 мл раствора субстрата концентрацией 15—40 М·10<sup>-3</sup>. Интегральный тепловой эффект фиксировали с помощью записи на потенциометре LKB-2066 в условных единицах, которые затем переводили в Дж, используя результаты электрической калировки калориметра. Концентрации исходного вещества (*n*-нитрофенилфосфата) и продукта реакции (*n*-нитрофенола) контролировали спектрофо-

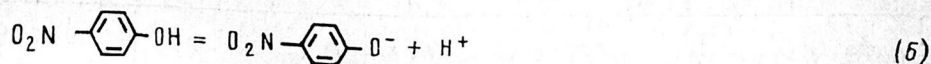
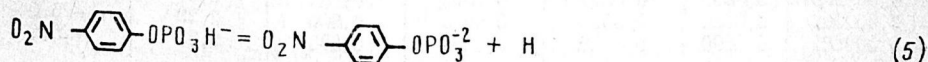
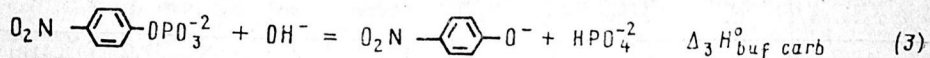
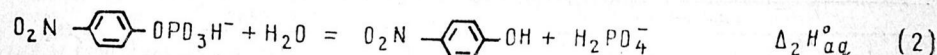
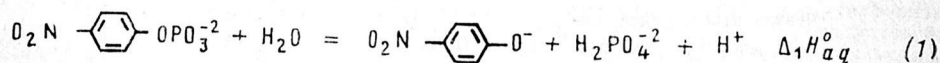
тометрически при  $\lambda$  280 нм на приборе *Specord M-40*. При расчете энтальпий гидролиза учитывали поправку на теплоту разбавления субстрата в 0,05 М растворе буфера, определенную экспериментально. Результаты опытов представлены в табл. 1, 2.

**Обсуждение результатов.** В соответствии с общепринятыми в настоящее время способами представления экспериментальных данных и рекомендациями Национального бюро стандартов (США) [2], в экспериментально полученные величины энтальпии гидролиза *n*-нитрофенилфосфата ( $\Delta_r H_{buf}^0$ ), используя термодинамические параметры ионизации компонентов (см. реакции (4)–(7), табл. 3), были введены по-

Таблица 3  
Термодинамические параметры ионизации исходных веществ и продуктов

| Ионизация                      | $pK_i^0$ | $\Delta_r H_{aq}^0$ (298,15) | Литература |
|--------------------------------|----------|------------------------------|------------|
| Трис · HCl-буфер (8)           | 8,1      | –47,48                       | [3–5]      |
| <i>n</i> -Нитрофенол (6)       | 7,1      | +18,3±0,4                    | [6]        |
| $H_2PO_4^-$ (4)                | 6,9      | +4,14±0,12                   | [6]        |
| <i>n</i> -Нитрофенилфосфат (5) | 5,4      | –7,65±0,20                   | [6]        |
| Фосфорная кислота (7)          | 2,1      | –7,41                        | [7]        |

правки на существование различных ионных форм в растворе, в результате чего для реакции (1) получена величина  $\Delta_r H_{aq}^0$  (298,15), равная  $2,1 \pm 1,8$  кДж·М<sup>–1</sup>, а для реакции (2) —  $-26,7 \pm 1,1$  кДж·М<sup>–1</sup>.



На основании величины энтальпии реакции (1) по закону Гесса при использовании энтальпий реакций (4)–(7) (см. табл. 3) была вычислена энтальпия реакции (2), которая составила  $-28,0 \pm 1,9$  кДж·М<sup>–1</sup>, что совпадает в пределах погрешности с экспериментально полученной величиной гидролиза *n*-нитрофенилфосфата в кислой среде, составляющей  $-26,7 \pm 1,1$  кДж·М<sup>–1</sup>.

Гидролиз *n*-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой был впервые осуществлен авторами работы [8] при температуре 29° в ацетат-вероналовом буфере pH 9,6. Реакция проводилась не до конца, и степень превращения субстрата колебалась от 45 до 70%. Экспериментальная величина энтальпии гидролиза составила  $\Delta_3 H_{buf}^{0'}$  302,15 = -18,8 кДж М<sup>-1</sup>, причем поправки на ионизацию буфера и компонентов реакции не были введены, что вызвало справедливую критику со стороны авторов работы [9] и потребовало дополнительных экспериментов, проделанных лишь недавно на химическом факультете Пенсильванского университета [10]. Автором [10] был проведен гидролиз *n*-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой в карбонат-бикарбонатном буфере pH 10,4. Полученная энтальпия реакции (3)  $\Delta H_{buf carb}^{0'}$  составила -11,9 кДж·М<sup>-1</sup>. Исходя из полученной нами величины  $\Delta_1 H_{aq}^0$  и величины энтальпии ионизации HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>  $\Delta_i H_{aq}^0 = -14,7 \pm 0,4$  кДж·М<sup>-1</sup> [11], нами была рассчитана величина  $\Delta_3 H_{buf carb}^{0'}$  = -12,7 ± 1,8 кДж·М<sup>-1</sup>, что в пределах погрешности совпадает с результатом работы [10].

Что же касается гидролиза *n*-нитрофенилфосфата кислой фосфатазой, то наблюдается хорошее совпадение наших результатов ( $\Delta_2 H_{aq}^0$  (298,15) = -26,7 ± 1,1 кДж·М<sup>-1</sup>) с результатом работы [9], которая дает для реакции (2) величину  $\Delta_2 H_{aq}^0$  (298,15), равную -26,28 ± 0,42 кДж·М<sup>-1</sup>.

Таким образом, впервые в рамках одного исследования определены энтальпии гидролиза *n*-нитрофенилфосфата как в щелочной, так и в кислой среде. Взаимная согласованность полученных данных подтверждается расчетами по закону Гесса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Rekharsky M. V. // Thermochim. Acta. 1989. 156. P. 189. [2] Galewsky E., Goldberg R. N., Steckler D. K. // Biophys. Chem. 1985. 22. P. 187. [3] Bates R. Y., Hetzer H. B. // J. Phys. Chem. 1961. 65. P. 667. [4] Ojelund G., Wadsö I. // Acta. Chem. Scand. 1968. 22. P. 2691. [5] Prosen E. J., Kilday M. V. // J. Res. Nat. Bur. Stand. 1973. 77A. P. 581. [6] Тищенко С. А., Рехарский М. В., Гальченко Г. Л., Аренс Э. А., Аренс А. К., Егоров А. М. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2, Химия. 1986. 27. С. 375. [7] Smith R. M., Martell A. E. // Critical Stability Constants. V. 4. N. Y., 1976. P. 56. [8] Ohlmeyer P., Shates R. // Arch. Biochem. Biophys. 1953. 36. P. 411. [9] Sturtevant J. M. // J. Am. Chem. Soc. 1955. 77. P. 255. [10] Antony M., Clydewyn M. // Enthalpimetric Enzyme Assay. The Pennsylvania State University. Philadelphia. 1987. [11] Berg L. R., Vanderzee C. F. // J. Chem. Thermodyn. 1978. 10. P. 1049.

Поступила в редакцию  
10.12.90