

ОБЩАЯ И ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 544.174.3:542.943-92

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ И МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ L-ЦИСТЕИНА С ДИАЛКИЛСУЛЬФОКСИДАМИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

З. Х. ПАПАНЯН и Ш. А. МАРКАРЯН*

Ереванский государственный университет
Армения, 0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1
E-mail: shmarkar@ysu.am

Поступило 5 IX 2013

Методом ИК-спектроскопии изучена кинетика реакции L-цистеина с диметилсульфоксидом (ДМСО) и диэтилсульфоксидом (ДЭСО), рассчитаны константы скоростей реакции второго порядка. Также проведено качественное сравнение скоростей с дипропилсульфоксидом (ДПСО), диизопропилсульфоксидом (ДиПСО) и дибутилсульфоксидом (ДБСО), рассмотрен вероятный механизм реакции. Показано, что с удлинением углеводородной цепи диалкилсульфоксидов, и особенно при ее разветвлении, имеет место уменьшение реакционной способности к L-цистеину.

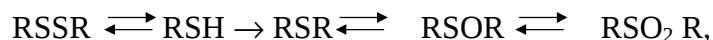
Рис. 2, табл. 1, библиограф. ссылок 21.

В области исследования систем с участием биологически важных молекул актуальной задачей является не только выявление характера межмолекулярных нековалентных взаимодействий, но и возможность протекания химического превращения. В этой связи следует отметить, что к таким примерам относится образование комплекса с переносом заряда, который далее подвергается химическому превращению с образованием соответствующих продуктов. В частности, подобное поведение ранее нами было показано для систем с участием молекулярного йода и триэтиламина [1], а также молекулярного йода и диметил- и диэтилсульфоксидов [2]. В работе [3] на основании обнаружения явления химически индуцированной динамической поляризации ядер продуктов было доказано фотохимическое прев

ращение комплекса с переносом заряда триэтиламин-CCl₄. В этой связи необходимо подчеркнуть, что при проведении исследований, направленных на выявление нековалентных взаимодействий, следует особо рассмотреть возможность протекания реакции между компонентами изучаемой системы. Так, например, приведенные в [4] данные калориметрических измерений для системы L-цистеин/диметилсульфоксид (ДМСО)/вода полностью приписаны процессам сольватации, а возможность протекания реакции между L-цистеином и ДМСО не учитывалась.

Недавно нами было показано, что в водной среде в мягких условиях (малые концентрации реагентов, комнатная температура, без подкисления раствора) имеет место окисление L-цистеина диметилсульфоксидом. На основании данных ИК-спектроскопии выявлено протекание реакции с образованием нерастворимого продукта – L-цистина, диметилсульфида и воды [5,6]. Следует отметить, что различные функции белков часто обусловлены аминокислотными остатками, содержащими сульфгидрильные группы. Цистеин как таковой является природной серосодержащей аминокислотой и входит в состав многих белков. Биологические аспекты цистеина и родственных серосодержащих производных, а также вопрос о возможном механизме окислительно-восстановительных процессов в ферментах рассмотрены в работах [7, 8]. С другой стороны, известно, что диметилсульфоксид, а также его ближайшие гомологи имеют биомедицинскую значимость в различных процессах [9–13]. При этом это качество диалкилсульфоксидов обусловлено не только их участием в межмолекулярных нековалентных взаимодействиях, но и в некоторых случаях и в окислительно-восстановительных реакциях [14–16].

Таким образом, в исследуемых системах можно рассмотреть одновременное присутствие сульфоксидов, тиолов, сульфидов и дисульфидов. Интересно отметить, что эти соединения могут подвергаться превращениям *in vivo* [17]:



где R – углеводородный фрагмент.

Эти превращения особенно важны в живых клетках и тканях. Редокс-состояние тиолов является основным параметром прокариотных и эукариотных клеток, и оно связано со всеми основными биологическими процессами [17]. Следует отметить, что в ряду диалкилсульфоксидов с удлинением углеводородной цепи усиливается их основность [18], что, очевидно, приводит также к изменению окислительной способности сульфоксида.

В данной работе методом ИК-спектроскопии изучена кинетика окисления L-цистеина диметилсульфоксидом и диэтилсульфоксидом в водной среде, определены значения констант скоростей реакций. Также проведено сравнение их реакционной способности в гомологическом ряду с дипропилсульфоксидом,

диизопропилсульфоксидом и дибутилсульфоксидом, рассмотрен вероятный механизм реакции. Показано, что с удлинением углеводородной цепи, и особенно при ее разветвлении в диалкилсульфоксидах, имеет место уменьшение их реакционной способности к L-цистеину.

Экспериментальная часть

Реагенты ДМСО (>99.5%) и L-цистеин (>98.5%) приобретены в Sigma-Aldrich, Со., остальные диалкилсульфоксиды были синтезированы и очищены по методике [19]. Для исследования кинетики взаимодействия L-цистеина с рядом диалкилсульфоксидов ДМСО, ДЭСО и ДиПСО в водных растворах был применен метод ИК-спектроскопии. Измерение всех спектров проводилось с помощью ИК-спектрометра с фурье-преобразованием "Nicolet/NEXUS FT-IR" со спектральным разрешением 4 см^{-1} , числом накопления 32, в области частот $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. Была задействована приставка НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) с многократным отражением для жидких образцов, с элементом внутреннего отражения из кристалла германия и объемом кюветы в 1 мл. Для инициирования реакции и слежения за изменениями в ИК-спектре в кювете спектрометра смешивались заранее приготовленные 10% водные растворы L-цистеина и ряда диалкилсульфоксидов, соответственно. Сразу после этого периодически регистрировались ИК-спектры. Количество растворов во всех случаях бралось из расчета мольного соотношения ДАСО/L-цистеин 1:2 в образующейся смеси, что соответствует стехиометрии рассматриваемых реакций. Об этой процедуре для случая взаимодействия L-цистеина с ДМСО в подробностях сообщалось нами ранее в работе [6], в настоящей работе она была применена и к остальным диалкилсульфоксидам.

Кроме того, для качественного сравнения относительных скоростей взаимодействия рассматриваемого ряда диалкилсульфоксидов с L-цистеином был проведен следующий ряд экспериментов: в пяти пробирках одновременно были приготовлены смеси водных растворов диалкилсульфоксидов ДМСО, ДЭСО, ДПСО, ДиПСО, ДБСО и L-цистеина с равными начальными концентрациями сульфоксидов 0.4М и цистеина 0.8 М, что соответствует стехиометрии реакции. Так как образующийся в ходе реакции L-цистин имеет очень ограниченную растворимость в воде, время появления резкого помутнения в каждой смеси (одинаковая степень превращения) относительно начала позволяет примерно оценить скорость каждой реакции.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе с помощью ИК-спектроскопии следили за изменением спектров во времени при протекании реакций в водных растворах ДАСО/L-цистеин. Для кинетических измерений наиболее подходящим является область колебания группы $\nu_{S=O}$, т.к. изменение интенсивности данного поглощения дает возможность непосредственно определить остаточную концентрацию сульфоксида в данный момент времени.

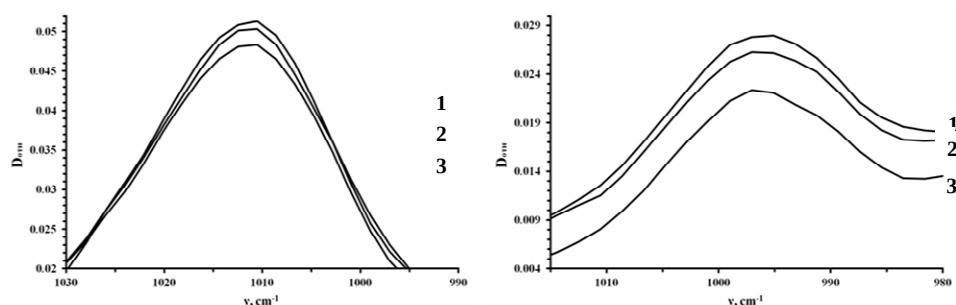


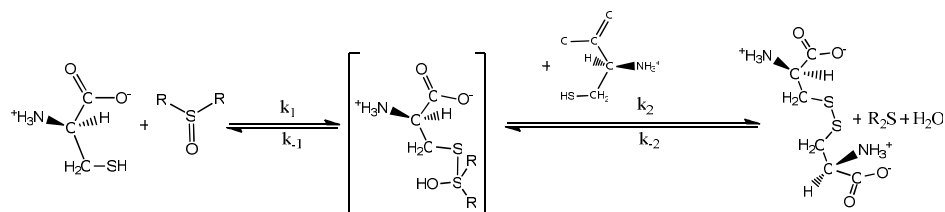
Рис. 1. Изменение интенсивности полосы поглощения группы S=O в ИК-спектрах для смесей ДМСО / L-цистеин (слева) и ДЭСО / L-цистеин (справа): спектры (1), (2) и (3) зарегистрированы через 0, 60 и 120 мин от начала.

Как видно из рис. 1, интенсивности максимумов поглощения группы $\nu_{S=O}$ в колебательных спектрах, под волновыми числами 1010 и 996 cm^{-1} для ДМСО и ДЭСО, соответственно, с течением реакции уменьшаются, что обусловлено их расходом, который, что важно, поддается количественному определению. Переход от интенсивности поглощения к молярной концентрации для каждого сульфоксида осуществлен методом калибровки значений интенсивность поглощения – концентрация для стандартных водных растворов с известными концентрациями. В случае с ДиПСО максимум поглощения сульфоксидной группы находится под волновым числом 1044 cm^{-1} и частично перекрывается поглощением группы C-N 1041 cm^{-1} в молекуле L-цистина – продукта реакции. Это обстоятельство затрудняет проведение количественной оценки расхода ДиПСО описанным способом.

Ранее в работе [20] было изучено взаимодействие между сульфоксидами и тиолами разнообразного строения. На основании кинетических исследований был предложен вероятный механизм реакции, который с некоторыми дополнениями является общепринятым до настоящего времени. Основные доводы, приведенные в вышеупомянутой работе, можно свести к следующим пунктам (а). Скорость и

энергия активации реакции сильно зависят от кислотности тиола – ароматические тиолы, константы диссоциации которых выше ($pK_a \approx 7$), реагируют быстрее алифатических ($pK_a \approx 13$) (б). Скорость также зависит от строения сульфоксида – наименее реакционноспособными являются диароматические сульфоксиды, далее по нарастанию алкилароматические и диалкилсульфоксиды (в). При большом избытке одного из реагентов расход второго подчиняется кинетическим закономерностям псевдопервого порядка. Общий порядок реакции равен двум, стехиометрия реакции – 1:2 *моль/моль* сульфоксида и тиола. Из этого и других данных был сделан вывод, что реакция идет двумя последовательными стадиями, каждая из которых в какой-то степени является обратимой, причем первая стадия намного медленнее второй и является лимитирующей. Таким образом, рассматриваемые реакции являются аналогами известной реакции окисления галогенводородных кислот сульфоксидами до свободных галогенов, что дает возможность судить о механизме и промежуточных продуктах реакции.

Применительно к рассматриваемому в настоящей работе окислению L-цистеина рядом диалкилсульфоксидов, вышеупомянутые превращения можно представить в виде следующей схемы:



Допуская, что концентрация промежуточного продукта остается постоянной (условие стационарности), а также $k_{-2} \approx 0$ и $k_2 \gg k_{-1}$, для скорости образования конечных продуктов можно получить упрощенное выражение:

$$V_p = k_1 [RSH] [R_2SO], \quad (1)$$

где V_p – скорость образования продуктов, k_1 – константа скорости, $[RSH]$ и $[R_2SO]$ – текущие концентрации тиола и сульфоксида. Видно, что при условии верности указанных допущений общая скорость реакции подчиняется кинетическим закономерностям второго порядка.

Необходимо отметить, что экспериментальным путем трудно осуществить идентификацию предполагаемого нестабильного промежуточного продукта реакции (сульфурана). Однако в недавней работе [8] на основании квантовохимических расчетов методом *ab initio* была подтверждена возможность образования сульфуранового интермедиата. Во всяком случае, для кинетического исследования, целью которого является определение констант скоростей, это не является препятствием, т.к. результирующая скорость определяется лимитирующей стадией – в данном случае первой.

Как было отмечено выше, для данного типа реакций скорость реакции подчиняется кинетическому уравнению второго порядка, для которого справедливо выражение (1). Это же выражение в интегральной форме, при условии равных начальных концентраций тиола и сульфоксида $[RSH]_0 = [R_2SO]_0$ принимает известный вид:

$$\frac{1}{[R_2SO]} - \frac{1}{[R_2SO]_0} = kt. \quad (2)$$

Для стехиометрического же соотношения реагентов (см. экспериментальную часть) можно показать, что интегральная форма аналогична (2), лишь с удвоенным значением константы скорости.

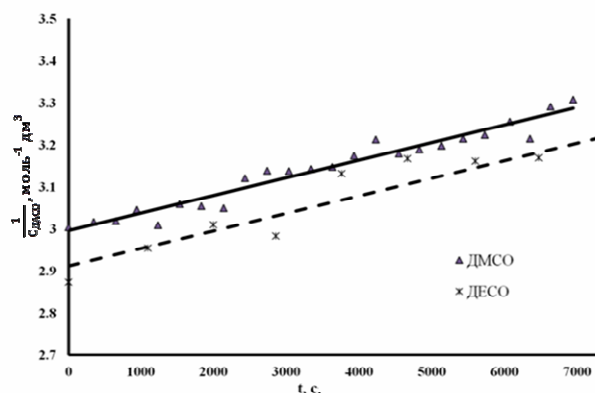


Рис. 2. Кинетические кривые зависимости обратной концентрации от времени для ДМСО и ДЭСО при протекании реакции с L-цистеином.

Из рис. 2 видно, что зависимость $\frac{1}{[R_2SO]} - t$, рассчитанная из анализа ИК-спектров, действительно является прямолинейной с учетом погрешности. Таким образом, реакции ДМСО и ДЭСО с L-цистеином действительно подчиняются кинетическим закономерностям второго порядка, что дает возможность вычислить соответствующие константы скоростей. Принимая во внимание, что тангенс угла наклона равен $2 \cdot k$, значения констант получаются $2.1 \times 10^{-5} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ для реакции L-цистеина с ДМСО и $2.09 \times 10^{-5} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ с ДЭСО. Эти значения примерно на один порядок больше значений, приведенных в [20] для пар ДМСО с различными тиолами, т.к. эти реакции были изучены в неполярных растворителях. С другой стороны, полученные значения меньше приведенных в [21] для случая ДМСО/пеницилламин (структурный аналог цистеина) – в этом же случае реакция проводилась при температуре выше комнатной. Таким образом, можно сказать, что, учитывая различные условия проведения реакций, полученные в нашей работе величины констант скоростей хорошо вписываются в пределы известных значений.

**Время начала помутнения для различных диалкилсульфоксидов
в смеси с L-цистеином**

Диалкилсульфоксид	Время помутнения, мин
ДМСО	17
ДЭСО	19
ДПСО	36
ДиПСО	76
ДБСО	65

Для рассматриваемого ряда сульфоксидов (ДМСО, ДЭСО, ДПСО, ДиПСО, ДБСО) было проведено качественное сравнение относительных скоростей по визуальному наблюдению помутнения в смесях и регистрации временного отрезка относительно начала реакции (см. экспериментальную часть). Время начала помутнения смеси каждой пары ДАСО с L-цистеином дано в таблице.

Приведенные в статье данные указывают, что в гомологическом ряду диалкилсульфоксидов с удлинением предельной углеводородной цепи скорость реакции с L-цистеином уменьшается, при этом для первых двух членов ряда это различие небольшое. Также интересно отметить, что времена помутнения для структурных изомеров ДПСО и ДиПСО различаются примерно в 2 раза, следовательно, разветвление углеводородной цепи особенно сильно сказывается на скорости. В действительности, диизопропиловый гомолог по скорости реакции уступает даже дибутиловому и является самым нереакционноспособным в изученном ряду.

L-ՑԻՍՏԵԻՆԻ ԵՎ ԴԻԱԼԿԻԼՍՈՒԼՖՕՔՍԻԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԻՆԵՏԻԿԱՅԻ ԵՎ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԶՐԱՅԻՆ ԼՈՒԾՈՒՑԹՆԵՐՈՒՄ

Զ. Խ. ՊԱՊԱՆՅԱՆ և Շ. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ

ԻՎ սպեկտրոսկոպիայի մեթոդի կիրառմամբ ուսումնասիրվել է L-ցիստեինի փոխազդեցության կինետիկան դիմեթիլսուլֆոքսիդի և դիէթիլսուլֆոքսիդի հետ ջրային լուծույթներում, որոշվել են երկրորդ կարգի արագության հաստատունների արժեքները: Կատարվել է համեմատություն այլ դիալկիլսուլֆոքսիդների՝ դիպրոպիլսուլֆոքսիդ, դիիզոպրոպիլսուլֆոքսիդ, դիբուտիլսուլֆոքսիդ արագությունների հետ, քննարկվել է ռեակցիայի հնարավոր մեխանիզմը: Ցույց է տրվել, որ դիալկիլսուլֆոքսիդներում հազեցած ածխաջրածնային շղթայի երկարացումը, և հատկապես ճյուղավորումը, էականորեն փոքրացնում է L-ցիստեինի հանդեպ նրանց ռեակցիոնունակությունը:

A STUDY ON KINETICS AND MECHANISM OF THE REACTION OF L-CYSTEINE WITH DIALKYLSULFOXIDES

Z. Kh. PAPANYAN and Sh. A. MARKARIAN

Yerevan State University
1, A. Manoukian Str., Yerevan, 0025, Armenia
E-mail: shmarkar@ysu.am

The kinetics of the reactions of L-cysteine with dimethylsulfoxide and diethylsulfoxide in aqueous solutions has been studied with the aid of IR spectroscopy; second order rate constants were determined. A comparison between these and other dialkylsulfoxides – dipropylsulfoxide, diisopropylsulfoxide and dibuthylsulfoxide has been performed. Also the mechanism of the reaction has been discussed. It has been shown, that with increase of the length of saturated hydrocarbon chains in dialkylsulfoxides the rate of the reaction with L-cysteine decreases significantly. This effect is more pronounced for dialkylsulfoxides with branched chains.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Маркарян Ш.А., Саакян Л.А.* // Арм. хим.ж., 1985, т. 38, с. 596.
- [2] *Маркарян Ш.А., Григорян К.Р., Саркисян А.Р., Асатрян А.М., Адамян Ц.А.* // ЖОХ, 2006, т.76, с.1885.
- [3] *Markarian S.A., Fischer H.* // J.C.S. Chem.Comm., 1979, p.1055.
- [4] *Mezhevoi I.N., Badelin V.G.* // Rus. Chem. Bull., Int. Ed., 2008, v.57, ¹12, p. 2452.
- [5] *Papanyan Z.Kh.* // Proceedings YSU, 2013, ¹2, p. 11.
- [6] *Папаян З.Х., Маркарян Ш.А.* // Журнал прикладной спектроскопии, 2013, т.60, с. 785.
- [7] *Jacob C., Knight I., Winyard P.G.* // Biol. Chem., 2006, v. 387, p. 1385.
- [8] *Balta B., Monard G., Ruiz-López M.F., Antoine M., Gand A., Boschi-Muller S., Branlant G.* // J. Phys.Chem. A, 2006, v. 110, p. 7628.
- [9] *Jacob S.W., Herschler R.* // Cryobiology, 1986, v.23, p.14.
- [10] *Yu Z.-W., Quinn. P.J.* // Biosci. Rep., 1994, v.14, p. 259.
- [11] *Martin D., Hauthal H.G.* Dimethylsulfoxid, Berlin, Academic Verlag, 1971, 494p.
- [12] *Markarian S.A., Aznauryan M.G.* // Mol. Biol. Rep., 2012, v.39, p.7559.
- [13] *Markarian S.A., Poladian A.A., Kirakosyan G.R., Trchounian A.A., Bagramian K.A.* // Letters in Applied. Microbiology, 2002, v. 34, p.417.
- [14] *Оае С.* Химия органических соединений серы / пер. с англ. М., Химия, 1975, 461с.
- [15] *Маркарян Ш.А., Саркисян А.Р.* // Журнал прикладной спектроскопии, 2011, v.78, с. 11.
- [16] *Маркарян Ш.А., Тавадян Л.А., Кочарян Г.Г., Шагинян Г.А.* // Изв. РАН, сер. хим., 2013, ¹7, с. 1625.
- [17] *Торчинский Ю.М.* Сера в белках. М., Наука, 1977, 303с.
- [18] *Фролов Ю.Л., Синеговская Л.М., Гусарова Л.К., Ефремова Г.Г., Трофимов Б.А.* // Изв. РАН, сер. хим., 1978, ¹5, с. 1042.
- [19] *Маркарян Ш.А., Тадевосян Н.Ц.* Метод получения и очистки диэтилсульфоксида. Патент Республики Армении №1196A2, Р 20010041, 2002.
- [20] *Wallace T.J., Manon J.J.* // J. Am. Chem. Soc., 1964, v. 86, p. 4099.
- [21] *Snow J.T., Finley J.W., Friedman M.* //Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, v. 64, p. 441.