Кинетический изотопный эффект

Часть 1. Взятый в избытке дейтерозамещённый метан, CHD_3, хлорировали на свету при 42 °C. Состав смеси продуктов изучили масс-спектрометрически:

m/z	Интенсивность пика (у.е.)
52	1.55
53	1.81
54	4.64
55	5.43

1. По этим данным рассчитайте величину изотопного эффекта r_H/r_D, если пиков с бóльшим отношением m/z не обнаружено. Примите, что углерод представлен только изотопом ^{12}C.

Проведём соотнесение пиков и веществ

m/z	Интенсивность пика (у.е.)	Вещество
52	1.55	$CHD_2{}^{35}Cl$
53	1.81	$CD_3{}^{35}Cl$
54	4.64	$CHD_2{}^{37}Cl$
55	5.43	$CD_3{}^{37}Cl$

Из этих данных следует, что $\frac{\nu(CD_3Cl)}{\nu(CHD_2Cl)} = \frac{1.81+5.43}{1.55+4.64} = 1.17 = \frac{r_H}{3r_D} \rightarrow \frac{r_H}{r_D} = 3.51$ (**1 балл**)

2. Время полупревращения в условиях эксперимента составило 25 с. Рассчитайте время полупревращения при хлорировании CD_4 в тех же условиях.

$\tau_{1/2} \sim \frac{1}{k_{\text{набл}}} \rightarrow \frac{(\tau_{1/2})_{CD_4}}{(\tau_{1/2})_{CHD_3}} = \frac{(k_{\text{набл}})_{CHD_3}}{(k_{\text{набл}})_{CD_4}} = \frac{3k_D+k_H}{4k_D} = 0.75 + \frac{3.51}{4} = 1.63 \rightarrow (\tau_{1/2})_{CD_4} = 41$ с (**1 балл**)

3. Рассчитайте разницу энергий Гельмгольца активации при отрыве протия и дейтерия, $\Delta F_H^{\neq} - \Delta F_D^{\neq}$. Ответ приведите в см$^{-1}$.

$RT \ln\frac{k_D}{k_H} = \Delta F_H^{\neq} - \Delta F_D^{\neq} = -3290 \frac{\text{Дж}}{\text{моль}} = -274$ см$^{-1}$ (**1 балл**)

4. При какой температуре нужно проводить хлорирование, чтобы в смеси продуктов было одинаковое количество монохлорметанов? Примите, что $\Delta S^{\neq}$ не зависит от температуры.

$\frac{\nu(CD_3Cl)}{\nu(CHD_2Cl)} = 1 = \frac{r_H}{3r_D} = \frac{k_H}{3k_D} \rightarrow \frac{k_H}{k_D} = 3 = e^{-\frac{\Delta F_H^{\neq} - \Delta F_D^{\neq}}{RT}} = 359\ K$ (86 °C) (**1 балл**)

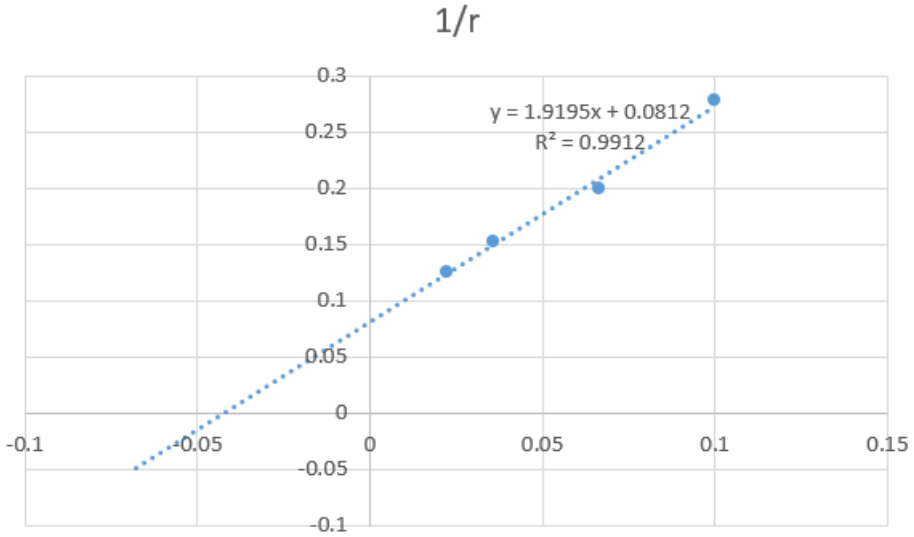
Часть 2. Известно, что в реакциях, катализируемых ферментами, величина изотопного эффекта при замене в субстрате H на D часто достигает аномально высоких значений – несколько десятков и выше. При этом возникает специфический тип ингибирования, ингибирование изотопомером. Рассмотрим данное явление на примере реакции окисления линолевой кислоты ($C_{17}H_{31}COOH$) кислородом воздуха, катализируемой ферментом липоксигеназой (M = 99 кДа). Учтите, что для данного фермента не наблюдается субстратное ингибирование, а система находится в насыщении по кислороду.

В ячейке были смешаны 1.8 мл раствора липоксигеназы (0.05 г/л) и разные объёмы раствора субстрата (42 мг/л). Общий объём смеси доводился водным буферным раствором до 15 мл.

V(субстрат), мл	r_0, нмоль/с
1.0	54
1.5	75
2.8	98
4.5	120

5. Рассчитайте K_M (в мкМ) и r_{max} (в мкМ/с).

$$[S]_0 = \frac{V}{15}\frac{0.042}{280} = 10\,\frac{\text{мкМ}}{\text{мл}} \cdot V(\text{мл})$$



$K_M = 24$ мкМ (**1 балл**)

$r_{max} = 12.9$ мкМ/с (**1 балл**)

Всего **2 балла** за пункт.

Подобный эксперимент в тех же условиях был проведен с эквимолярной смесью дейтерированного и недейтерированного субстрата (общая концентрация линолеата 40 мкМ). Начальная скорость реакции составила 210 мкМ/мин.

6. Рассчитайте константу ингибирования K_I и укажите тип ингибирования.

Полностью конкурентное ингибирование

$$r_0 = \frac{r_{max}\,[S_H]_0}{K_M\left(\frac{[S_D]_0}{K_I}+1\right)+[S_H]_0} = \frac{12.9 \cdot 20}{24 \cdot \left(\frac{20}{K_I}+1\right)+20} = \frac{210}{60} = 3.5\ \text{мкМ/с}$$

$K_I = 16$ мкМ (**1 балл**)

7. По полученным данным с учётом различий в превращении дейтерированного и недейтерированного субстрата рассчитайте константы скорости (k_1, k_{-1}, k_2) в двустадийной схеме Михаэлиса-Ментен и укажите их размерности.

Основное предположение: константы скорости образования и диссоциации субстрат-ферментного комплекса одинаковы для дейтерированного и недейтерированного линолеата, поэтому константа ингибирования равна константе диссоциации субстрат-ферментного комплекса.

Данное предположение, выраженное в виде формул – **0.5 балла**, расчёт констант по **0.5 балла**. Всего **2 балла** за пункт.

$$[E]_0 = \frac{1.8}{15}\frac{0.05}{99000} = 61\ \text{нМ}$$

$$k_2 = \frac{r_{max}}{[E]_0} = 211\ \text{с}^{-1}$$

$$K_S = K_I = \frac{k_{-1}}{k_1} = 16 \cdot 10^{-6}\ M$$

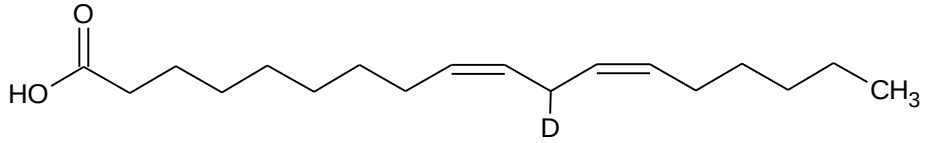
$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{k_2}{k_1} + K_I = 24 \cdot 10^{-6}\ M$$

$$k_1 = 2.6 \cdot 10^7\ M^{-1}\text{с}^{-1}$$

$$k_{-1} = 416\ \text{с}^{-1}$$

$$k_2 = 211\ \text{с}^{-1}$$

8. Предложите структуру монодейтерированной линолевой кислоты, которая бы соответствовала наблюдаемому высокому КИЭ.



(1 балл)