

*На правах рукописи*

МЕЖЕВОЙ Игорь Николаевич



ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ  
И БУФЕРНЫХ СИСТЕМ НА ЭНТАЛЬПИЙНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
СОЛЬВАТАЦИИ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ ПРИ 298,15 К

02.00.04 - физическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Иваново - 2004

Работа выполнена в Институте химии растворов Российской Академии наук

Научный руководитель кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
**Баделин Валентин Георгиевич**

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
**Усольцева Надежда Васильевна**

доктор химических наук, профессор  
**Королев Валерий Павлович**

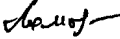
Ведущая организация: Ярославский государственный технический  
университет

Защита состоится ~~"25"~~ ноября 2004 г. в 10 час. на заседании  
диссертационного совета Д 002.106.01. в Институте химии растворов РАН по  
адресу: 153045, г.Иваново, ул.Академическая, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХР РАН

Автореферат разослан "22" октября 2004 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета:  Ломова Т. Н.

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Изучение природы взаимодействий в растворах биомолекул и их модельных соединений является актуальной задачей, так как особенности сольватации (гидратации) простых структурных элементов (аминокислот и олигопептидов) во многом определяют сольватацию и биологическую активность более сложных биосистем. Органические растворители (ацетон, спирты и др.) изученные в работе, присутствуют в той или иной мере в живых организмах и могут существенно изменять свойства растворов белковых молекул. Диметилсульфоксид, обладающий высокой проникающей способностью, используется в качестве лечебного средства и криопротектора лекарственных препаратов. Исследование термодинамических свойств растворов биовеществ в водно-органических растворителях позволяет выявить роль различных функциональных групп в межмолекулярных взаимодействиях. Взаимодействия между биомолекулами (сахаридами и аминокислотами или пептидами), сопровождаются небольшими изменениями энергии, но чаще всего они играют определяющую роль в функционировании живых организмов.

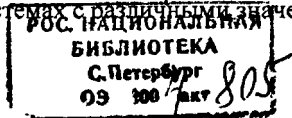
**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Провести на специально сконструированном многоампульном калориметре с изотермической оболочкой термохимическое исследование растворов аминокислот и пептидов в воде, в водных растворах спиртов (этанол, n-пропанол и изо-пропанол), апротонных растворителей (ацетонитрила, 1,4-диоксана, ДМСО, ДМФА и ацетона), моно- и дисахаридов (D-глюкозы, D-мальтозы и сахарозы) и буферном растворе. Определить на дифференциальном калориметре титрования энтальпии смешения пептидов с дисахаридами в воде. На основе полученных термохимических характеристик выявить:

-основные закономерности изменения термодинамических величин ( $\Delta_{tr}H$ ,  $\Delta_{int}H$ ,  $h_{xy}$ ) растворения аминокислот и пептидов в смешанных растворителях различной природы.

-особенности межмолекулярных взаимодействий аминокислот и пептидов с органическим компонентом раствора.

-особенности изменения энтальпий растворения глицина в буферном растворе при различных рН с учетом кислотно-основных процессов.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА.** Получены новые данные по энтальпиям растворения исследуемых аминокислот и пептидов в воде, водно-органических смесях, растворах моно- и дисахаридов и буферном растворе, энтальпий смешения пептидов с дисахаридами в водных растворах, которые могут служить базовой термодинамической информацией, дающий вклад в понимание взаимодействий растворенное вещество-растворитель в биохимических системах. Предложен метод расчета величин энтальпий сублимации 17 аминокислот, имеющих боковые радикалы различной химической природы, исходя из корреляции "структура-свойство". Количественно оценены энтальпии гидратации ( $\Delta_{hydr}H^0$ ) в воде. Выявлены закономерности влияния природы и концентрации водно-органического растворителя и структуры растворяемых биомолекул на энтальпийные характеристики переноса аминокислот и пептидов. Предложен подход, позволяющий проводить расчет энтальпий растворения  $\Delta_{sol}H$  биологически активных веществ данного класса в сложных системах с различными значениями рН



раствора с учетом количественного вклада кислотно-основных процессов, протекающих в них.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.** Результаты проведенных исследований растворов модельных соединений белков могут быть использованы при интерпретации и прогнозировании термодинамических свойств сложных биологических систем. Полученные термодинамические характеристики процессов растворения, сублимации, сольватации биомолекул и кислотно-основных равновесий открывают возможности для понимания механизмов биохимических реакций и представляют интерес для медицины, фармакологии и косметологии.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Основное содержание работы опубликовано в 20 печатных работах (7 статей в рецензируемых журналах, 2 депонированные статьи, 11 тезисов докладов). Результаты исследований докладывались и обсуждались на 8 Международной конференции по проблемам сольватации и комплексообразования в растворах (Иваново, 2001), 4 Международной конференции по химической термодинамике (Санкт-Петербург, 2002), Международной научной конференции по кристаллизации в наносистемах (Иваново, 2002), Международной конференции по Физико-химическому анализу жидкофазных систем (Саратов, 2003), Юбилейной научной конференции "Герасимовские чтения" (Москва, 2003), Всероссийском симпозиуме по термохимии и калориметрии 2004 (Нижний-Новгород, 2004), IX Международной конференции по проблемам сольватации и комплексообразования в растворах (Плес, 2004), III Международной конференции по кинетике и механизмам кристаллизации (Иваново, 2004).

**СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.** Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, главы, посвященной обзору литературы, экспериментальной части, описывающей установки, методику работы и анализ погрешности определения тепловых эффектов, а также четырех глав, включающих экспериментальный материал и его обсуждение, итоговые выводы, списка цитируемой литературы.

## **II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Первая глава литературного обзора включает обзор имеющихся в литературе данных о структуре и физико-химических свойствах аминокислот и дипептидов и их водных растворах. Во второй главе рассмотрены некоторые физико-химические свойства спиртов, апротонных растворителей, моно- и дисахаридов и их водных растворов. Проведен анализ литературных данных по термодинамике аминокислот и дипептидов в водно-органических смесях и растворах Сахаров. Отмечено незначительное количество работ по термохимии растворения аминокислот в водно-органических смесях, ограничивающихся разбавленной областью органического компонента (до 0,1 м.д.), а также отсутствие данных по калориметрии растворения дипептидов в исследуемых смесях. Рассмотрены кислотно-основные равновесия аминокислот в воде при изменении рН среды.

### **КАЛОРИМЕТР РАСТВОРЕНИЯ**

Тепловые эффекты измеряли на сконструированном четырехампульном калориметре с изотермической оболочкой. Реакционная часть калориметра и все внутренние детали, соприкасающиеся с раствором, выполнены из титанового сплава ВТ-1. Объем реакционного сосуда ПО мл. Датчиком температуры служил

термистор КМТ-14. Температура изотермической оболочки поддерживалась с точностью  $\pm 0,005$  К. Градуировка теплового эффекта проводилась электрическим током. Надежность результатов оценивалось по энтальпиям растворения  $KCl_{(к)}$  в воде. Полученное значение  $\Delta_{sol}H_m^0$  хорошо согласуется с общепринятыми литературными данными, что говорит об отсутствии заметной систематической ошибки в работе установки.

### КАЛОРИМЕТР ТИТРОВАНИЯ

Тепловые эффекты смешения водных растворов пептидов и дисахаридов измерялись на дифференциальном калориметре титрования промышленного производства США ITC MicroCal OMEGA. Объемы ячеек, изготовленных из высокоэффективного теплопроводящего материала (Hasteloy), составили 1,361мл. Водный раствор дисахарида ( $c_{дс} \sim 0.2$  моль/л), помещенный в дозатор ( $V=250$ мкл), непрерывно автоматически вводился в водный раствор пептида ( $c_{п} \sim 0.02$  моль/л), находящийся в образцовой ячейке. Объем единичной дозы составлял 12мкл. В ячейке сравнения находилась вода. Параметры титрования (объем дозы, их число и временной интервал между ними) задавался с помощью встроенной программы, контролирующей данные. Чувствительность калориметра составила 0.8мкДж. Для перехода к молярным концентрациям пептидов и дисахаридов на денсиметре Anton Paar DMA 60/62 были измерены плотности растворов. Обработка экспериментальных данных проводилась автоматически предусмотренным пакетом программ. Тепловые эффекты разведения дисахаридов и пептидов измерялись отдельно;

#### 1. Термохимические свойства водных растворов аминокислот и олигопептидов.

Измерены интегральные энтальпии растворения  $\Delta_{sol}H_m^0$  алифатических аминокислот и пептидов в воде.

Таблица 1.

Энтальпии растворения  $\Delta_{sol}H_m^0$  (кДж/моль) аминокислот и пептидов в воде при 298,15 К.

вещество	$\Delta_{sol}H_m^0$	Литературные данные
глицин	14,25 $\pm$ 0,11*	14,12; 14,20; 14,18; 14,13; 14,08
диглицин	11,56 $\pm$ 0,17	11,84; 11,67
триглицин	17,62 $\pm$ 0,15	11,58; 17,69
DL- $\alpha$ -аланин	9,34 $\pm$ 0,09	9,85; 9,13; 9,21; 9,25; 9,35; 8,65
DL- $\alpha$ -аланил-глицин	1,30 $\pm$ 0,05	
DL- $\alpha$ -аланил-глицилглицин	2,72 $\pm$ 0,03	
L- $\alpha$ -аланил-L- $\alpha$ -аланин	-10,79 $\pm$ 0,15	-11,0
DL- $\alpha$ -аланил-DL- $\alpha$ -аланин	-7,29 $\pm$ 0,06	-7,59
DL- $\alpha$ -аланил- $\beta$ -аланин	-4,63 $\pm$ 0,04	
$\beta$ -аланил- $\beta$ -аланин	5,67 $\pm$ 0,06	
D-валин	2,16 $\pm$ 0,05	
DL- $\alpha$ -аланил-DL-валин	-16,44 $\pm$ 0,17	

погрешность выражена как стандартное отклонение с 95% вероятностью доверительного интервала

Величину энтальпии растворения при бесконечном разведении  $\Delta_{sol}H_m^0$  рассчитывали как среднюю из результатов семи измерений. Как следует из приведенных в Табл. 1. данных, процесс растворения в воде для одних веществ является эндотермичным, а для других - экзотермичным. Это указывает на то, что энергетические затраты на разрушение кристаллической структуры веществ, в 1-ом случае, не компенсируются энергетическими эффектами экзотермических эффектов гидратации, в отличие от вторых. При увеличении размера растворенного вещества наблюдается тенденция уменьшения эндотермичности процесса растворения и повышения его экзотермичности. Величина  $\Delta_{sol}H_m^0$  L и DL-форм диаланина различаются на 3,5 кДж.

Корректная количественная оценка гидратационных вкладов в  $\Delta_{sol}H_m^0$  аминокислот и пептидов возможна только на основе учета энергий их кристаллических решеток, что и было сделано нами на примере аминокислот. Для расчета энтальпии гидратации  $\Delta_{hydr}H^0$  по экспериментальным данным необходимо знать энтальпию сублимации ( $\Delta_{sub}H^0$ ), экспериментальное нахождение которой зачастую затруднено. Предложен метод оценки энтальпий сублимации аминокислот на основе выявления корреляционной зависимости между  $\Delta_{sub}H$  и строением молекул исследуемых веществ. В качестве базовых функций строения соединения были выбраны молекулярный объем и длина межатомных связей. При проведении сравнительного термодинамического анализа разных соединений использованы объемно-удельные параметры, основанные на подходе Райса-Бландамера, получаемые путем деления  $\Delta_{sub}H$  на объем фазы ( $V_{vdW}$  - ван-дер-ваальсовый объем молекулы). В основу предлагаемой корреляционной модели «структура-энтальпия сублимации» может быть положено соотношение (1):

$$\Delta_{sub}H / V_{vdW} = A + B * (\sum n_i l_i) \quad (1)$$

где  $l_i$ -длина  $i$ -ой связи,  $n_i$ -число связей.

Справедливость уравнения (1) проверена на основе имеющихся экспериментальных данных по  $\Delta_{sub}H$  для 7 аминокислот. Исследование зависимости  $\Delta_{sub}H / V_{vdW} = f(\sum n_i l_i)$  показало, что она носит линейный характер в соответствии с уравнением (1) ( $A=2,88$ ,  $B=0,065$ ,  $r=0,985$ ,  $N=7$ ). Данный подход был распространен на другие аминокислоты, для которых отсутствуют экспериментальные значения  $\Delta_{sub}H$ . В таблице 2 приведены полученные значения  $\Delta_{sub}H$  для 17 аминокислот. Сравнение рассчитанных величин  $\Delta_{sub}H$  7 аминокислот с их экспериментальными значениями позволило оценить предсказательную способность уравнения (1) с погрешностью в 3,2%.

Представляло интерес проследить изменение характера гидратации аминокислот в зависимости от природы бокового радикала. Были определены объемно-удельные энтальпии гидратации аминокислот, представляющие собой отношение  $\Delta_{hydr}H^0$  к величине парциального мольного объема  $V_2^0$  аминокислоты при бесконечном разбавлении. При увеличении числа атомов углерода в молекуле соединения наблюдаются тенденции повышения значений ( $\Delta_{hydr}H^0 / V_2^0$ ) в рядах

аминокислот, имеющих боковые радикалы: I - алифатические, II — ароматические и гетероциклические, III - серу-, азот- и кислород- содержащие.

Таблица 2.

Стандартные термодинамические характеристики аминокислот в водных растворах при 298,15 К.

Название соединения	$\Delta_{\text{sol}}H^0$ , кДж/моль	$10^6 V_2^0$ , м <sup>3</sup> /моль	$\Delta_{\text{sub}}H$ , кДж/моль	$-\Delta_{\text{hydr}}H^0$ , кДж/моль	$\Delta_{\text{hydr}}H^0/V_2^0 \cdot 10^{-6}$ , кДж/м <sup>3</sup>
I-алифатические					
глицин	14,25	43,19	136,3	122,1	-2,83
$\beta$ -аланин	9,50	58,28	148,4	138,9	-2,38
DL-аланин	9,34	60,42	148,8	139,4	-2,30
L-аланин	7,62	59,62	144,7	137,0	-2,26
L-валин	5,37	90,79	158,7	153,4	-1,69
L-лейцин	2,93	107,83	151,4	148,5	-1,38
II-ароматические и гетероциклические					
L-пролин	-3,10	82,50	149,0	152,1	-1,84
L-гистидин	13,96	95,79	156,7	142,8	-1,49
L-фенилаланин	7,70	121,48	153,9	146,2	-1,20
L-тирозин	19,96	123,6	145,8	125,9	-1,02
L-триптофан	6,74	143,91	113,6	106,9	-0,74
III-серу-, азот- и кислород- содержащие					
L-серин	11,01	62,66	150,2	139,2	-2,22
L-цистеин	11,00	73,44	163,7	152,8	-2,08
L-треонин	9,78	76,90	161,0	151,2	-1,97
L-аспарагин	31,51	78,00	166,5	134,9	-1,73
L-глутамин	22,76	93,90	171,4	148,6	-1,58
L-метионин	11,21	105,35	169,0	157,8	-1,49

литературные данные

Это отражает, прежде всего, различный вклад гидрофобной гидратации групп в совокупный гидратный эффект при растворении аминокислот в воде. Очевидно, чем ниже величины параметра ( $\Delta_{\text{hydr}}H^0/V_2^0$ ) исследуемых аминокислот, тем выше степень структурируемости их водных растворов. Например, в ряду алифатических аминокислот, имеющих аполярные боковые цепи, Gly оказывает наибольшее воздействие на окружающую воду.

## 2. Энтальпийные характеристики растворения DL- $\alpha$ -аланина, DL- $\alpha$ -аланил-глицина, DL- $\alpha$ -аланил-DL- $\alpha$ -аланина в водных растворах спиртов и апротонных растворителей.

Определены энтальпии растворения DL- $\alpha$ -аланина (Ala), DL- $\alpha$ -аланил-глицина (Ala-Gly) и DL- $\alpha$ -аланил-DL- $\alpha$ -аланина (Ala-Ala) в водных растворах этанола, н-пропанола и изо-пропанола (Рис.1).  $\Delta_{\text{tr}}H_m^0$  для изученных соединений положительны во всей концентрационной области органического компонента и имеют экстремальный характер, что свидетельствует об изменении характера взаимодействия между компонентами раствора.

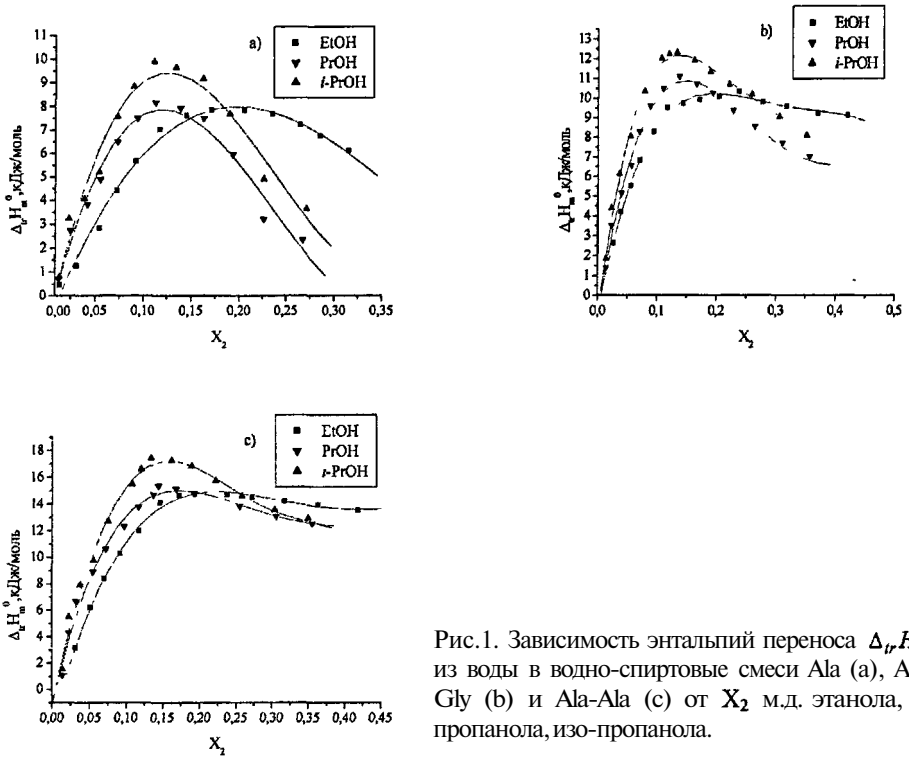


Рис.1. Зависимость энтальпий переноса  $\Delta_{tr}H_m^0$  из воды в водно-спиртовые смеси Ala (а), Ala-Gly (б) и Ala-Ala (с) от  $X_2$  м.д. этанола, *n*-пропанола, изо-пропанола.

По мере увеличения концентраций спиртов и приближения к максимуму наблюдается менее резкое изменение  $\Delta_{tr}H_m^0$  веществ, что можно отнести к преобладающей роли заряженных концевых групп аминокислот и пептидов и пептидной группы, что вносит отрицательный вклад в  $\Delta_{tr}H_m^0$ . Большая эндотермичность  $\Delta_{tr}H_m^0$ , наблюдаемая для *i*-PrOH по сравнению с PrOH, по-видимому, связана со стерическими затруднениями при взаимодействии гидратированных молекул аминокислот и пептидов с гидратированными молекулами спиртов и с большими эффектами гидрофобной гидратации двух  $\text{CH}_3$ -групп *i*-PrOH. Значения  $\Delta_{tr}H_m^0$  в точке максимума смещаются влево в порядке  $\text{EtOH} < \text{PrOH} < \textit{i}\text{-PrOH}$ , что объясняется структурными особенностями молекул соразтворителя.

Определены  $\Delta_{sol}H_m^0$  Ala, Ala-Gly и Ala-Ala в водных растворах ацетонитрила (АН), 1,4-диоксана (ДО), диметилсульфоксида (ДМСО), диметилформамида (ДМФА) и ацетона (АЦ).



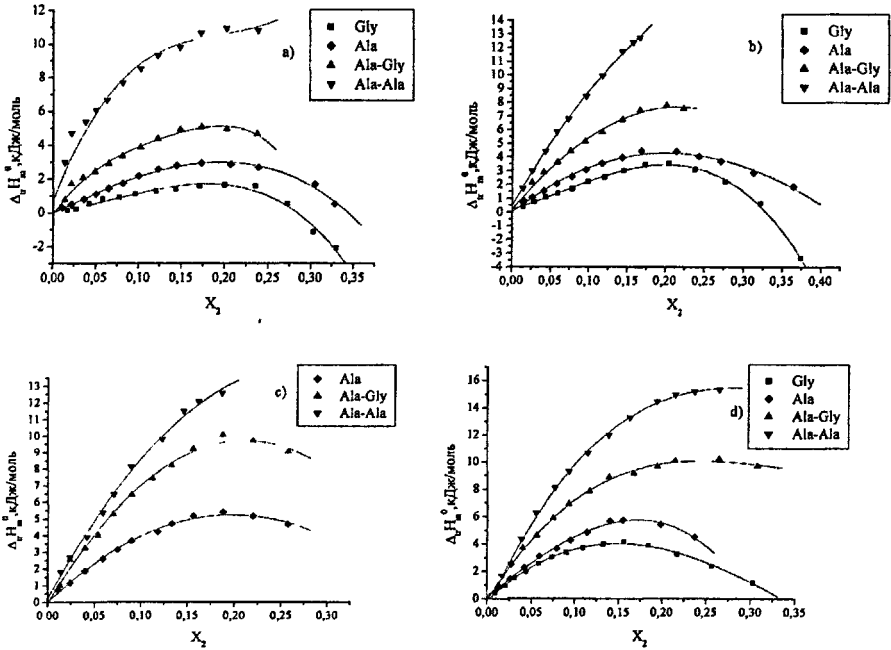


Рис. 2. Зависимость энтальпий переноса  $\Delta_{tr}H_m^0$  аминокислот и пептидов из воды в водно-органические смеси от  $X_2$  ДО (а), ДМСО (б), ДМФА (с) и АЦ (д).

Как видно из графиков (Рис.2), изменения  $\Delta_{tr}H_m^0$  аминокислот и пептидов в смесях воды с АЦ, ДО, ДМФА и ДМСО эндотермичны и в основном носят экстремальный характер. Энергия вновь образуемых связей не компенсирует затраты на разрушение структуры воды и реорганизацию смешанного растворителя при растворении в нем биомолекул. Согласно литературным данным при растворении аминокислот в водно-органических растворителях наблюдается энтальпийно-энтропийный компенсационный эффект.

Следует отметить разный характер изменения  $\Delta_{tr}H_m^0$  аминокислот и дипептидов в водных растворах АН (Рис. 3).

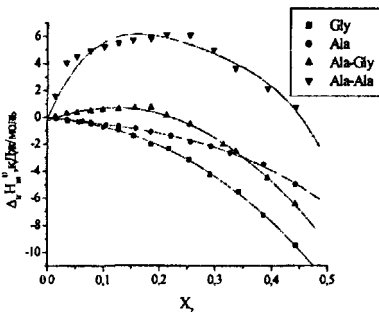


Рис.3. Зависимость энтальпий переноса  $\Delta_{tr}H_m^0$  аминокислот и пептидов из воды в водно-органические смеси от  $X_2$  АН.

Величины  $\Delta_r H_m^0$  Gly и Ala во всем исследованном диапазоне концентраций АН экзотермичны и становятся более отрицательными с ростом его содержания в смеси. Уменьшение  $\Delta_r H_m^0$  для Gly и Ala при добавлении АН к воде связано с усилением электронодонорных свойств смеси (данные Маркуса), уменьшением структурного вклада в энтальпии растворения аминокислот и уменьшением энтальпии образования полости в структуре смешанного растворителя по сравнению с чистой водой, при этом АН, разрушая структуру воды и образуя с ней слабые связи, способствует взаимодействию с Gly и Ala. Зависимости  $\Delta_r H_m^0 = f(X_2)$  для изученных дипептидов в системе  $H_2O$ -АН эндотермичны и имеют экстремум в разбавленной области, причем степень его выраженности выше для Ala-Ala, чем для Ala-Gly. Отличия в изменении  $\Delta_r H_m^0$  пептидов по сравнению с аминокислотами свидетельствует о возрастающей роли гидрофобной гидратации при росте размеров молекул.

Межчастичные взаимодействия в трехкомпонентных водных системах могут быть охарактеризованы в рамках формализма теории МакМиллана-Майера для разбавленных растворов путем расчета энтальпийных коэффициентов парных взаимодействий  $h_{xy}$  аминокислот и пептидов с молекулами соразтворителя.

$$\Delta_r H_x(w \rightarrow w+y) = 2h_{xy} \cdot m_y + 3h_{xyy} \cdot m_y^2 + \dots \quad (2)$$

где  $\Delta_r H_x(w \rightarrow w+y)$  - энтальпия переноса аминокислоты (пептида) (x) из воды в водно-органические растворы (y);  $m_x$  и  $m_y$  - моляльность веществ x и y в растворе;  $h_{xy}$ ,  $h_{xyy}$  - энтальпийные коэффициенты парных и тройных взаимодействий.

**Таблица 3.**

Энтальпийные парные коэффициенты взаимодействия  $h_{xy}$  (Дж·кг·моль<sup>-2</sup>) аминокислот и пептидов с органическим компонентом раствора.

$h_{xy}$	Gly	Ala	Ala-Gly	Ala-Ala
АН	-44	-41±8	63±11	173±36
ДО	122	231±20	412±106	542±43
ДМФА	-	409±21	721±145	834±97
ДМСО	249	292±21	662±136	876±67
Ацетон	474	449±53	816±70	999±102
EtOH	551	762±112	1045±51	1166±74
PrOH	776	923±53	1322±156	1628±268
i-PrOH	915	1071±80	1610±214	1886±293

Коэффициенты  $h_{xy}$  для всех исследуемых систем (Таблица 3), кроме Gly и Ala в смеси с АН, положительны. Это показывает, что в области большого содержания воды вещества хорошо гидратируемы и взаимодействия между гидратированными молекулами вещества и соразтворителя слабы. Коэффициенты  $h_{xy}$  увеличиваются в ряду Gly < Ala < Ala-Gly < Ala-Ala, что связано с ростом размеров молекул и появлением дополнительных неполярных групп, способствующих повышению гидрофобной гидратации.

**3. Энтальпии растворения глицина, DL- $\alpha$ -аланина в водных растворах D-глюкозы, D-мальтозы и сахарозы и энтальпии смешения водных растворов диглицина, триглицина и DL- $\alpha$ -аланил-глицина с D-мальтозой и сахарозой.**

На основании определенных нами  $\Delta_{sol}H_m^0$  Gly и Ala в водных растворах D-глюкозы (Glu), D-мальтозы (Mal) и сахарозы (Suc) рассчитаны энтальпийные парные коэффициенты взаимодействия  $h_{xy}$  аминокислот с дисахаридами.

Таблица 4.

Энтальпийные коэффициенты парного взаимодействия  $h_{xy}$  (Дж·кг·моль<sup>-2</sup>) глицина и DL-аланина с некоторыми сахарами в воде при 298,15К.

вещество	$h_{xy}$		
	Glu	Mal	Suc
Gly	-242±39	-330±78	-550±122
Ala	249±62	146±24	-172±24

Из таблицы 4 следует, что  $h_{xy}$  Gly с сахарами небольшие по величине и отрицательны, что свидетельствует о преобладании экзотермического вклада специфических взаимодействий Gly с сахарами. Увеличение экзотермичности взаимодействия Gly с Mal по сравнению с Glu связано с большим числом ОН-групп в молекулах дисахаридов. Взаимодействие Gly с сахарозой характеризуется более отрицательным коэффициентом  $h_{xy}$ . Согласно литературным данным, молекулы Mal обладают более развитой гидратной оболочкой по сравнению с молекулами Suc. Большой эндо-вклад от дегидратации молекул Mal в величину  $h_{xy}$  делает ее менее отрицательной по сравнению с Suc. Молекулы Ala в отличие от молекул Gly содержат в своем составе неполярные  $CH_3$ -группы. Эндо-эффекты от дегидратации молекул Ala и сахаридов, а также от взаимодействий, в которых принимают участие неполярные фрагменты этих молекул, приводят к тому, что величины  $h_{xy}$  становятся положительными для систем с Mal и Glu и менее отрицательными для системы с сахарозой.

Проведенный анализ показал, что взаимодействие между аминокислотами и сахарами в водном растворе сопровождается небольшими изменениями энергии. Поэтому были измерены тепловые эффекты смешения  $\Delta_{mix}H$  D-мальтозы и сахарозы с диглицином (Gly-Gly), триглицином (Gly-Gly-Gly) и DL- $\alpha$ -аланилглицином (Ala-Gly), для того чтобы количественно оценить энтальпийный вклад в энергетику слабых взаимодействий биомолекул с дисахаридами. Тепловые эффекты  $\Delta_{int}H$ , отражающие процесс взаимодействия гидратированных молекул пептидов с дисахаридами, рассчитывались как:

$$\Delta_{int}H = \Delta_{mix}H - \Delta_{dil}H(\text{дисахарид}) - \Delta_{dil}H(\text{пептида}) \quad (3)$$

где  $\Delta_{mix}H$  - энтальпии смешения растворов дисахаридов и пептидов для  $i$ -ой дозы в расчете на моль титранта,  $\Delta_{dil}H$  - энтальпии разведения.

Таблица 5.

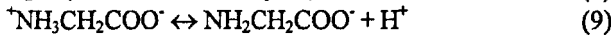
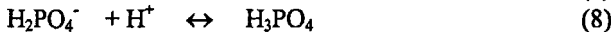
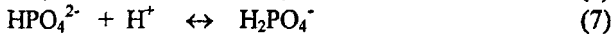
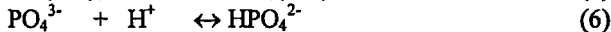
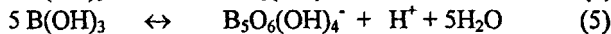
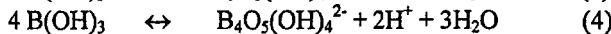
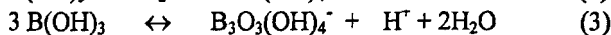
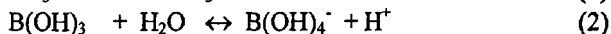
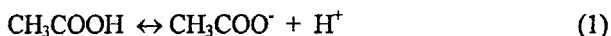
Тепловые эффекты взаимодействия  $\Delta_{int}H^0$  (Дж/моль) пептидов с дисахаридами.

Пептид	Mal	Suc
Gly-Gly	-8±2	21±2
Gly-Gly-Gly	20±2	43±2
Ala-Gly	41±3	72±1

В таблице 5 приведены  $\Delta_{\text{int}}H^0$  дисахаридов с пептидами, полученные линейной экстраполяцией экспериментальных значений  $\Delta_{\text{int}}H$  к нулевому отношению молярных концентраций дисахарида и пептида. Значения  $\Delta_{\text{int}}H^0$  свидетельствуют о слабых взаимодействиях между исследуемыми молекулами, не приводящих к образованию межмолекулярных комплексов определенного стехиометрического состава. Наличие большого числа гидрофильных групп в молекулах дисахаридов и пептидов, а также цвиттерионное состояние молекул последних в растворе способствует образованию межмолекулярных водородных связей и электростатическому притяжению между этими молекулами. Эти взаимодействия дают отрицательный вклад в величину  $\Delta_{\text{int}}H^0$ , но сильная гидратация гидрофильных и гидрофобных фрагментов молекул пептидов и дисахаридов приводит к тому, что процесс дегидратации при их взаимодействии сопровождается значительным эндо-эффектом и вносит положительный вклад в  $\Delta_{\text{int}}H^0$ . Полученные результаты показывают, что переход от Gly-Gly к Gly-Gly-Gly приводит к увеличению положительных значений  $\Delta_{\text{int}}H^0$  с исследуемыми дисахаридами, что является следствием усиления гидратации трипептида по сравнению с дипептидом.

#### 4. Энтальпии растворения глицина в универсальном буферном растворе при различных рН.

Экспериментальное измерение термодинамических характеристик растворения аминокислот в водных растворах при различных рН дает общий эффект, состоящий из эффектов растворения, кислотно-основных равновесий и взаимодействий компонентов раствора (как химических, так и сольватационных). Представляло интерес провести количественную оценку вкладов кислотно-основных взаимодействий в  $\Delta_{\text{sol}}H$  аминокислот в воде при изменении рН. Для этой цели были измерены  $\Delta_{\text{sol}}H$  Gly в универсальном буферном растворе в интервале значений рН 4,1 ÷ 9,6. В качестве растворителя использовалась универсальная буферная смесь, состоящая из водных растворов  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  и  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , нейтрализуемых раствором NaOH. Процессы кислотно-основных взаимодействий, протекающие в универсальном буферном растворе при растворении Gly могут быть представлены следующими уравнениями:



Вклады всех этих процессов в экспериментально измеренные тепловые эффекты учитывались введением соответствующих поправок. По уравнению (4) рассчитывали тепловой эффект растворения Gly за вычетом поправок на кислотно-основные равновесия.

$$\Delta_{sol}H' = \Delta_{sol}H - (\sum \Delta_{diss}H_i * \alpha_i) \quad (4)$$

По константам равновесия и исходным концентрациям компонентов буферного раствора по программе RRSU (Васильев В.П., Бородин В.А., Козловский Е.В. "Применение ЭВМ в химико-аналитических расчетах", 1993) рассчитаны равновесные составы растворов не содержащие и содержащие Gly для различных значений pH. Программа RRSU предназначена для расчета концентраций равновесных форм в системах с произвольными числами и стехиометрией реакций. Поправку на ионную силу вычисляли по уравнению (5).

$$\Delta pK = \Delta z^2 A\gamma \left( \frac{I^{1/2}}{1 + I^{1/2}} - 0,2 * I \right) \quad (5)$$

где  $\Delta z^2$  – разность квадратов зарядов продуктов реакции и исходных веществ,  $A\gamma$  – предельный наклон для коэффициента активности теории Дебая-Хюккеля. Константы равновесия реакций (1-10) пересчитывали на соответствующие значения ионных сил по уравнению (6).

$$\lg \beta_c = \lg \beta_0 + \Delta pK \quad (6)$$

где  $\beta_c$  – концентрационная константа равновесия,  $\beta_0$  – термодинамическая константа равновесия. Исходя из данных программы RRSU, рассчитаны изменения долей (а), всех компонентов буферного раствора при введении в него Gly по формуле:

$$\alpha = \alpha'_i - \alpha_i, \quad \alpha'_i = [c'_i] / c_{Gly}^0, \quad \alpha_i = [c_i] / c_{Gly}^0 \quad (7)$$

$\alpha_i$  и  $\alpha'_i$  – доля *i*-ого компонента буферного раствора без и с Gly,  $c_i$  и  $c'_i$  – равновесная концентрация *i*-ого компонента буферного раствора без и в присутствии Gly,  $c_{Gly}^0$  – концентрация Gly. Из анализа данных  $\alpha_i$  всех компонентов буферного раствора при различных pH и концентраций Gly следует, что при pH > 7,2 начинается процесс диссоциации Gly и В(ОН)<sub>3</sub>. Введение Gly смещает кислотно-основные равновесия компонентов универсального буферного раствора (изменяется их доля). Рассчитали поправки ( $\sum \Delta_{diss}H_i * \alpha_i$ ).  $\Delta_{diss}H_i$  реакций (1-10) также пересчитаны на соответствующие значения ионной силы по уравнению (8).

$$\Delta H - \Delta Z^2 \psi(I) = \Delta H^0 + iI \quad (8)$$

где  $\psi(I)$  – функция от ионной силы раствора,  $\Delta H$  и  $\Delta H^0$  – изменение энтальпии при конечном и нулевом значениях I. Расчет показал, что вклад процессов (3-5) пренебрежимо мал, поэтому поправки на  $\Delta_{diss}H_i$  этих равновесий в расчет не включались.

В интервале pH 4,1-7,2 точки находятся на прямых параллельных оси x (Рис.4а). Рассчитанные поправки на тепловые эффекты процессов в данном интервале pH незначительные. Gly существует в виде цвиттер-иона  ${}^+NH_3CH_2COO^-$  и поведение его близко к поведению в воде, взаимодействий Gly с компонентами буферного раствора в данном интервале pH не происходит. В интервале pH 7,9-9,6 большой вклад в  $\Delta_{sol}H'$  вносит значительная диссоциация В(ОН)<sub>3</sub> и цвиттер-иона,

поэтому концентрационные зависимости имеют заметный наклон. Как видно из рисунка 4(b) (кривая 2)  $\Delta_{\text{sol}}H^{0'}$  резко уменьшается с увеличением  $I$ .

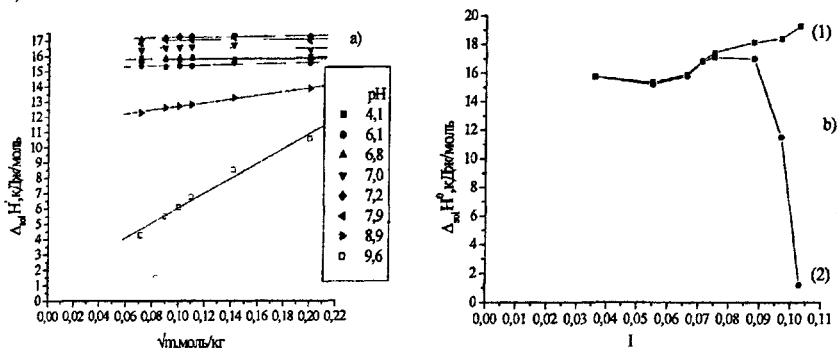


Рис.4. Зависимость рассчитанных  $\Delta_{\text{sol}}H'$  за вычетом кислотно-основных взаимодействий от  $\sqrt{m}$  различной концентрации Gly при различных значениях pH (a) и зависимость стандартных экспериментальных  $\Delta_{\text{sol}}H^0$  (1) и рассчитанных с учетом кислотно-основных взаимодействий  $\Delta_{\text{sol}}H^{0'}$  (2) от  $I$  (b).

Подобное отклонение может быть связано с химическим взаимодействием аниона Gly с одним из компонентов буферной смеси, что усиливает концентрационную зависимость  $\Delta_{\text{sol}}H'$ . Так как диссоциация  $\text{B}(\text{OH})_3$  значительна при высоких значениях pH раствора ( $> 7,9$ ), по-нашему мнению, основной эффект уменьшения  $\Delta_{\text{sol}}H^{0'}$  Gly с увеличением pH связан с взаимодействием аниона Gly с борат-ионами.

Для проверки этого предположения были измерены  $\Delta_{\text{sol}}H$  Gly в буферных растворах борной кислоты, буры и аммонийном буфере (в отсутствии  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) при  $\text{pH} \approx 9,6$ . Все расчеты проводили аналогично.

Таблица 6.

Экспериментальные  $\Delta_{\text{sol}}H$  и расчетные  $\Delta_{\text{sol}}H'$  в растворах борной кислоты, буры и аммонийном буфере при  $\text{pH} 9,6$  и  $m_{\text{Gly}} = 0,02$  моль·кг<sup>-1</sup>.

	$\Delta_{\text{sol}}H$ кДж/моль	$\Delta_{\text{sol}}H'$ кДж/моль
$\text{H}_3\text{BO}_3$	19.41	11,62
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	19.91	12,12
$\text{NH}_4\text{OH}$	14.67	18.99

Величины  $\Delta_{\text{sol}}H'$  Gly в растворах  $\text{H}_3\text{BO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  близки к значениям  $\Delta_{\text{sol}}H'$ , полученным в универсальном буферном растворе при  $\text{pH} \approx 8,9; 9,6$ . В аммонийном буферном растворе ( $\text{pH} \approx 9,6$ ) величина  $\Delta_{\text{sol}}H'$  Gly близка к среднему значению  $\Delta_{\text{sol}}H'$  Gly в универсальном буферном растворе, полученному при более низких значениях pH (до 7,9). По нашему мнению, это подтверждает предположение о взаимодействии Gly с борат-ионами, существующими в растворах с высоким значением pH.

## ВЫВОДЫ РАБОТЫ

1. Сконструирован и собран четырехампульный калориметр с изотермической оболочкой.
2. Получены новые экспериментальные данные по стандартным энтальпиям растворения  $\Delta_{\text{sol}}\text{H}^0$  трех алифатических аминокислот и девяти олигопептидов в воде, глицина (Gly), DL- $\alpha$ -аланина (Ala), DL- $\alpha$ -аланил-глицина (Ala-Gly) и DL- $\alpha$ -аланил-DL- $\alpha$ -аланина (Ala-Ala) в водно-смешанных растворителях и Gly в универсальном буферном растворе при pH 4,1-9,6, а также энтальпиям смешения  $\Delta_{\text{mix}}\text{H}$  водных растворов диглицина (Gly-Gly), триглицина (Gly-Gly-Gly), DL- $\alpha$ -аланил-глицина и D-мальтозы (D-Mal), сахарозы (Suc) при 298,15 K.
3. На основе корреляционного метода "структура-свойство" оценены энтальпии сублимации  $\Delta_{\text{sub}}\text{H}^0$  17 аминокислот, имеющих боковые радикалы различной химической природы. Показано, что отношение  $(\Delta_{\text{sub}}\text{H}^0/V_{\text{wdw}})$  находится в линейной зависимости с величиной суммы длин связей в биомолекуле  $(\sum n_i l_i)(r > 0,985)$ .
4. Определены энтальпии гидратации  $\Delta_{\text{hydr}}\text{H}^0$  17 аминокислот. Установлено, что различие величин  $\Delta_{\text{hydr}}\text{H}^0$  разных аминокислот обусловлено изменением вклада гидрофобной гидратации, вызывающей изменения в состоянии окружающей воды.
5. Рассчитаны стандартные значения энтальпий переноса  $\Delta_{\text{tr}}\text{H}^0$  Gly, Ala, Ala-Gly, Ala-Ala из воды в смешанные водно-органические растворители при концентрации соразтворителя от 0 до 0,35 м.д. Установлено, что изменение  $\Delta_{\text{tr}}\text{H}^0$  исследуемых аминокислот и низкомолекулярных пептидов в смесях вода-(этанол (EtOH), *n*-пропанол (PrOH), изо-пропанол (i-PrOH), ацетон (АЦ), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФА), 1,4-диоксан (ДО)) эндотермичны и в основном носят экстремальный характер, в отличие от смеси вода-ацетонитрил (АН), в которой наблюдается слабо выраженная экстремальность только для Ala-Gly и Ala-Ala, но отсутствует для Gly и Ala.
6. Установлено, что энтальпийные характеристики растворения, переноса и сольватации Gly, Ala и их олигомеров в смесях вода-органический соразтворитель определяются следующими факторами:
  - а) структурой растворяемой молекулы биологически активного вещества: показано, что энергетический вклад в межмолекулярные взаимодействия не всегда перекрывает затраты на реорганизацию смешанного растворителя, вызываемую размещением в нем более крупной молекулы пептида. Для исследуемых водно-органических растворов получены более высокие значения  $\Delta_{\text{tr}}\text{H}$  пептидов по сравнению с аминокислотами, увеличивающиеся с ростом числа атомов углерода и боковых металных групп в ряду: Gly < Ala < Ala-Gly < Ala-Ala. Это указывает на увеличение вклада гидрофобной гидратации, сопровождаемой упрочнением Н-связей между молекулами воды, непосредственно окружающими  $-\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_3$ -группы.
  - б) энергетикой взаимодействия компонентов смешанного растворителя: слабые межмолекулярные взаимодействия в смеси вода-АН способствуют сольватации, а сильные - в смеси воды с ДМСО, ДМФА, АЦ, ДО, спиртов ослабляют сольватацию.
  - в) концентрацией органического компонента: увеличение доли органического растворителя плавно повышает экзотермичность  $\Delta_{\text{tr}}\text{H}$  аминокислот в случае АН и

зависимость имеет максимум в случае спиртов, ацетона, 1,4-диоксана, ДМСО, ДМФА.

г) природой органического компонента: возрастание полученных гетерогенных энтальпийных парных коэффициентов ( $h_{xy}$ ) в ряду АН < ДО < ДМСО < ДМФА < АЦ < EtOH < PrOH < i-PrOH для Gly, Ala, Ala-Gly и в ряду АН < ДО < ДМФА < ДМСО < АЦ < EtOH < PrOH < i-PrOH для Ala-Ala свидетельствует об ослаблении взаимодействий биомолекул с органическим растворителем.

7. Обнаружено, что процессы растворения и сольватации исследуемых аминокислот и пептидов в смешанных водно-органических растворителях имеют три четко выраженные области состава. В области до 0,15 м.д. характерно сильное взаимодействие аминокислоты или пептида с молекулами воды и преобладание процессов дегидратации над прямыми взаимодействиями биомолекула - соразтворитель, что вызывает рост эндотермичности растворения. В интервале 0,15 <  $X_2$  < 0,2 м.д. наблюдается взаимная компенсация между эффектами от прямых взаимодействий биомолекула-соразтворитель и от дегидратации и структурной перестройки растворителя. При более 0,2 м.д. преобладают эффекты от прямых взаимодействий, что выражается в росте экзотермичности растворения аминокислот и пептидов. Выявлено, что для водных растворов с протонными соразтворителями экстремум зависимости  $\Delta_r H^0 = f(X_2)$  расположен в области 0,1-0,15, а для исследуемых апротонных соразтворителей - в области 0,15-0,22 м.д.

8. Рассчитаны энтальпийные коэффициенты парных взаимодействий  $h_{xy}$  аминокислот с сахарами в водной среде. Отрицательные значения, полученные для систем с Gly, указывают на преобладание экзотермического вклада специфических взаимодействий Gly с сахарами (образование Н-связей и электростатическое взаимодействие). Получены положительные значения  $h_{xy}$  для взаимодействия Ala с D-мальтозой и D-глюкозой и менее отрицательные с сахарозой, что обусловлено вкладом эндоэффекта от дегидратации молекул Ala и сахаридов, а также от взаимодействий, в которых принимают участие неполярные группы этих молекул.

9. Предложен подход количественного учета вклада кислотно-основных процессов, протекающих в многокомпонентных жидких системах при различных рН, в тепловые эффекты растворения аминокислот. Показано, что взаимодействия глицина с компонентами буферного раствора в интервале рН от 4,1 до 7,2 отсутствуют. При рН более 7,2 наблюдается уменьшение  $\Delta_{50} H^0$ , что связано с изменением сольватации при переходе от цвиттер-иона к аниону, а также химическим взаимодействием аниона с борат-ионами, существующими в растворах с высоким значением рН.



**Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих работах**

1. Баделин В.Г., Смирнов В.И., Межевой И.Н. Зависимость энтальпий гидратации аминокислот и олигопептидов от их молекулярной структуры // ЖФХ. 2002. Т. 76. №7. С. 1299-1302.
2. Смирнов В.И., Баделин В.Г., Межевой И.Н. Термохимия растворения глицина в смесях вода-ацетон и вода-1,4-диоксан при 298.15 К // Изв. вузов. Хим. и химич. технол. 2003. Т. 46. вып. 1. С. 90-93.
3. Баделин В.Г., Тарасова Г.Н., Межевой И.Н., Катровцева А.В., Козловский Е.В. Энтальпии растворения глицина при различных значениях рН буферного раствора // ЖОХ. 2003. Т. 73. вып. 7. С. 1090-1093.
4. Межевой И.Н., Парфенюк Е.В., Баделин В.Г. Калориметрическое изучение взаимодействий между аминокислотами и сахарами в воде при 298.15 К // Биофизика. 2003. Т. 48. вып. 4. С. 585-588.
5. Смирнов В.И., Межевой И.Н., Баделин В.Г. Энтальпии растворения DL-а-аланина в смесях вода-спирты при 298.15 К // ЖФХ. 2004. Т. 78. № 2. С. 280-283.
6. Межевой И.Н., Зеленкевич В., Вшелака-Рылик М., Парфенюк Е.В., Баделин В.Г. Теплоты взаимодействия D-мальтозы и сахарозы с ди- и трипептидами в водных растворах // ЖФХ. 2004. Т. 78. № 6. С. 1140-1143.
7. Смирнов В.И., Межевой И.Н., Баделин В.Г. Термохимия растворения DL-а-аланина в смесях вода-ацетон и вода-1,4-диоксан при 298,15 К. // Изв. вузов. Хим. и химич. технол. 2004. Т. 47. вып.8. С. 38-41.
8. Баделин В.Г., Тарасова Г.Н., Межевой И.Н., Катровцева А.В. Расчет корректных значений энтальпий растворения глицина с учетом энтальпий диссоциации компонентов буферного раствора при рН 7,2-9,6 // Деп. в ВИНТИ 10.04.00, №956-В00.
9. Межевой И.Н., Тарасова Г.Н., Баделин В.Г. Энтальпии растворения DL-а-аланина, DL- $\alpha$ -аланил-глицина и DL- $\alpha$ -аланил-DL- $\alpha$ -аланина в бинарных смесях вода-органический растворитель в стандартных условиях // Деп. в ВИНТИ 26.02.04, №330-В2004.
10. Баделин В.Г., Тарасова Г.Н., Межевой И.Н., Катровцева А.В. Тезисы докладов 8-ой Международной конференции "Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах". Иваново. 2001. С.210.
11. Межевой И.Н., Баделин В.Г., Тарасова Г.Н. Термохимия растворения некоторых аминокислот и пептидов в воде // Там же. Иваново. 2001. С. 210-211.
12. Межевой И.Н., Давыдова О.И., Парфенюк Е.В., Баделин В.Г. Термодинамические характеристики взаимодействия аминокислот с моно- и дисахаридами в воде // Тезисы докладов 4-ой Международной конференции по химической термодинамике. Санкт-Петербург. 2002. С. 168.
13. Баделин В.Г., Смирнов В.И., Межевой И.Н. Общие закономерности гидратации некоторых аминокислот и олигопептидов // Тезисы докладов Международной научной конференции "Кристаллизация в наносистемах" Иваново. 2002. С. 129.
14. Межевой И.Н., Смирнов В.И., Баделин В.Г. Взаимосвязь теплоемкости кристаллических аминокислот и пептидов с энтальпийными характеристиками их водных растворов // Там же. Иваново. 2002. С. 129.

15. Межевой И.Н., Смирнов В.И., Баделин В.Г. Термодинамические и структурные свойства трехкомпонентных систем олигопептид-вода-ДМСО в стандартных условиях // Тезисы докладов Международной конференции "Физико-химический анализ жидкофазных систем". Саратов. 2003. С. 74.
16. Межевой И.Н., Смирнов В.И., Баделин В.Г. Термохимия растворения DL- $\alpha$ -аланина в бинарных смесях вода-спирты в стандартных условиях // Тезисы докладов юбилейной научной конференции "Герасимовские чтения". Москва. 2003. С. 137.
17. Баделин В.Г., Межевой И.Н., Смирнов В.И. Энтальпии растворения DL- $\alpha$ -аланил-глицина и DL- $\alpha$ -аланил-DL- $\alpha$ -аланина в смешанных растворах вода-спирты при 298,15 К // Тезисы докладов "Всероссийского симпозиума по термохимии и калориметрии 2004". Нижний-Новгород. 2004. С. 171.
18. Межевой И.Н., Смирнов В.И., Баделин В.Г. Термохимия растворения DL- $\alpha$ -аланина в бинарных смесях вода-органический растворитель в стандартных условиях // Там же. Нижний-Новгород 2004 С. 199.
19. Межевой И.Н., Баделин В.Г. Тепловые эффекты взаимодействия диглицина, триглицина и DL- $\alpha$ -аланил-глицина с дисахаридами в водных растворах при 298,15 К. // Тезисы докладов IX Международной конференции "Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах". Плес. 2004. С. 238.
20. Тюнина Е.Ю., Баделин В.Г., Межевой И.Н. Определение энтальпии сублимации некоторых аминокислот и дипептидов // Тезисы докладов III Международной конференции "Кинетика и механизм кристаллизации". Иваново. 2004. С. 108.

Подписано к печати 21.10.2004 г. Заказ № 20  
Формат издания 60x84/16 Тираж 80 экз. Усл. печ. л. 1,0

Изготовлено в ООО "Салон документации"; 153000, г. Иваново,  
ул. Парижской Коммуны, 16. Тел.: 41-09-02,41-09-03

**P20101**