

Ученый секретарь
диссертационного
совета D 013.034.08
15.10.04



На правах рукописи

КОТОВА ДИАНА АЛЕКСАНДРОВНА

СТРУКТУРНО - ОБУСЛОВЛЕННЫЕ МЕЖЧАСТИЧНЫЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ СОРБЦИИ АМИНОКИСЛОТ НА ШИТОМ
КАТИОНООБМЕННИКЕ

Специальность 02.00.04 - физическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Воронеж - 2004

Работа выполнена в Воронежском государственном университете

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Селеменев Владимир Федорович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Введенский Александр Викторович
доктор химических наук
Иванов Владимир Александрович
доктор химических наук, профессор
Ярославцев Андрей Борисович

Ведущая организация: Институт геохимии и аналитической химии
им. В.И. Вернадского РАН

Защита состоится 25 ноября 2004 г. в 14 час. на заседании диссертационного совета Д 212.038.08 по химическим наукам при Воронежском государственном университете по адресу 394006, г. Воронеж Университетская площадь, 1, ауд. 243.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Воронежского государственного университета

Автореферат разослан "15" октября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор химических наук



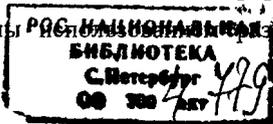
Г.В.Семенова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Ключевым вопросом физической химии водных растворов биологически активных соединений является установление механизма гидратации цвиттерлитов и взаимосвязи физико-химических свойств и структуры раствора с концентрацией и строением бокового радикала аминокислоты. Особую актуальность такой подход приобретает в настоящее время в связи с развитием методов супрамолекулярной химии и представлений о самоорганизации в ион-полиэлектrolитных системах. Он способствует развитию теории ионного обмена и более глубокому пониманию процессов, протекающих в многофазных системах. Наличие четких представлений о механизме межчастичных взаимодействий в гомогенных и гетерогенных системах с участием аминокислот послужит основой для разработки и внедрения новых экологически чистых технологических процессов разделения и концентрирования компонентов.

Целый ряд теоретических и экспериментальных данных указывает на то, что имеются значительные различия в характере структурных изменений растворителя в результате проявления эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации. В то же время представления о структуре и свойствах воды в растворах биологически активных соединений развиты недостаточно. При рассмотрении водных растворов аминокислот «напрасно искать простоты, проходящей через всю шкалу растворения» (Д.И. Менделеев). В разбавленных растворах можно обсуждать влияние аминокислот на структуру воды, в концентрированных растворах аминокислот самостоятельной структуры воды нет и необходимо считаться с наличием отдельных молекул растворителя, испытывающих одновременное влияние полярных и неполярных групп.

Первостепенное значение в технологии получения аминокислот занимает ионный обмен. Достоинства метода и перспективность его использования в производстве биопрепаратов и лекарственных веществ изложены в известных монографиях. Наиболее масштабные проблемы, которые связаны с применением ионообменных технологий для выделения, разделения и концентрирования физиологически активных веществ, обусловлены



вспомогательных реактивов, что не соответствует возросшим экологическим требованиям, предъявляемым к промышленным технологиям XXI века. В связи с этим на сегодняшний день весьма актуальным является поиск новых подходов для создания и разработки экологически и экономически обоснованных процессов разделения и концентрирования аминокислот.

В последние десятилетия в нашей стране был реализован значительный объем исследований, охватывающих многие аспекты экологической проблемы современных ионообменных технологий для решения задач, связанных с разделением и концентрированием минеральных солей. Особый интерес вызывает возможность использования неизотермических методов в создании эффективных процессов разделения и концентрирования цвиттерлитов.

Анализ накопленных данных указывает на довольно часто встречающиеся противоречивые сведения не только о механизме сорбции аминокислот (в особенности биполярных ионов), но и о способах направленного изменения селективности ионообменников. Практически не изучено влияние совместно протекающих на межфазной границе и в фазе ионообменника реакции ионного обмена, переноса растворителя, межмолекулярных взаимодействий на термодинамические и кинетические характеристики процесса сорбции. Представляется важным установление эффективности действия температурного фактора в методах разделения и концентрирования аминокислот.

Актуальность настоящей работы определяется дальнейшим развитием представлений о структурных взаимодействиях в водных растворах биологически активных веществ с учетом взаимовлияния эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации и ассоциации аминокислот, установлением влияния структурного состояния растворителя на протекание процессов в гомогенных и гетерогенных системах с участием цвиттерлитов.

Работа выполнена в Воронежском государственном университете в соответствии с координационными планами: НИР АН РФ по проблеме «Хроматография», Государственной программе РФ «Мембраны и мембранные процессы» в разделе «Разработка новых комбинированных мембранно-сорбционных методов и других нетрадиционных методов очистки и

концентрирования», по теме «Разработка малоотходной мембранно-сорбционной технологии выделения индивидуальных аминокислот из их смесей» (1997-1999 г.г.); НИР Научного Совета по адсорбции и хроматографии РАН по теме «Изучение механизма межмолекулярных взаимодействий и закономерностей удерживания» (тема №215.6.2 на 2000-2004).

Цель работы: Установление физико-химических закономерностей сорбции аминокислот с учетом структурных изменений в водных растворах и фазе ионообменника и взаимовлияния реакций, протекающих в системе ионообменник - вода - аминокислота, построение физико-химической модели сорбции и разработка новых принципов разделения и концентрирования аминокислот.

Задачи работы:

1. Количественная оценка гидратационных свойств аминокислот, различающихся структурой бокового радикала. Установление влияния строения и концентрации аминокислоты на природу межмолекулярных взаимодействий в водных растворах цвиттерлитов.

2. Исследование характера влияния температуры и природы бокового радикала аминокислоты на равновесные, кинетические и динамические характеристики сорбции. Применение формально-кинетического подхода для изучения кинетики сорбции аминокислот.

3. Установление взаимосвязи между структурой водного раствора аминокислоты и характером взаимодействия в системе ионообменник - вода — аминокислота. Количественная оценка гидратационных характеристик ионообменника в форме аминокислоты.

4. Термодинамическое описание процесса сорбции аминокислот на сульфокатионообменнике. Создание физико-химической модели сорбции. Изучение влияния межфазного переноса растворителя на избирательность сорбции аминокислот.

5. Разработка способов разделения и концентрирования аминокислот на основе влияния температуры и строения бокового радикала цвиттерлитов на селективность и сорбционную емкость катионообменника.

Научная новизна работы:

Установлены закономерности взаимодействия воды с кристаллами аминокислот. Показано, что различия в гидратационной способности аминокислот и характере поглощения воды определяются доступностью структуры аминокислоты для проникновения молекул растворителя и активностью реакционных центров. Определены изопиестические моляльности растворов гидрохлоридов лизина и цистеина и выявлена зависимость активности воды и коэффициента активности аминокислот от концентрации. Дана оценка свободной энергии Гиббса взаимодействия воды с аминокислотами. Определен и объяснен ряд гидрофобности аминокислот: $\text{Cys-Cys} \approx \text{Asp} \approx \text{Gly} \approx \text{Phe} \approx \text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Ala} > \text{HisHCl} > \text{Ser} > \text{LysHCl} > \text{CysHCl}$.

На основе данных термогравиметрического анализа разработан способ количественной оценки содержания молекул воды, различающихся своей подвижностью, в растворе аминокислот и в фазе ионообменника. Развит подход к описанию молекулярно-кинетического состояния растворителя в гомогенных и гетерогенных системах при взаимовлиянии полярных и неполярных групп.

Установлены закономерности влияния концентрации аминокислот на термохимические характеристики образования водного раствора. Показано, что процесс растворения аминокислот в выбранном диапазоне концентраций эндотермичен, а характер концентрационной зависимости энтальпии растворения определяется взаимовлиянием эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации и образованием ассоциатов растворенных веществ.

На основе единых физико-химических представлений описаны различные типы взаимодействия (образование Н-связей молекул воды с полярными и заряженными группами, гидрофобная гидратация, самоассоциация аминокислот за счет водородной связи, диполь-дипольных, дисперсионных и гидрофобных взаимодействий) в водных растворах аминокислот при переходе от предельно разбавленного к более концентрированному. Обоснован механизм самоассоциации аминокислот. Показано, что для фенилаланина ассоциация в водном растворе осуществляется в основном за счет межплоскостного (стэкинг) взаимодействия.

Выявлены закономерности сорбции ароматических аминокислот и цистеина на Н-сульфокатионообменнике и показана их взаимосвязь со следующими факторами: строением бокового радикала аминокислоты (природа функциональных групп и их количество, форма углеводородного радикала), температурой и характером межмолекулярных взаимодействий в растворе и в фазе ионообменника. На основе развитых представлений о структуре водных растворов аминокислот описан механизм взаимодействий в системе сшитый катионообменник - вода — аминокислота. Установлен и объяснен ряд селективности аминокислот **Phe>Tyr >His>Cys** на Н-сульфокатионообменнике. Обнаружено значительное увеличение селективности катионообменника к фенилаланину при изменении температуры от 295 до 278 К.

Определены термодинамические характеристики сорбции аминокислот на Н-сульфокатионообменнике. Показано, что процесс поглощения аминокислот экзотермичен и сопровождается уменьшением энтальпийной составляющей сорбции и ростом энтропии. Энтальпийный характер взаимодействия убывает в ряду аминокислот: **Cys >His >Tyr >Phe**. Эти изменения коррелируют с возрастанием селективности сорбции и большей дегидратацией катионообменника при переходе от более гидрофильного цистеина к более гидрофобному фенилаланину.

Установлено, что введение в ионообменник аминокислоты вызывает ряд дополнительных конкурентных процессов, приводящих к формированию в фазе сшитого полиэлектролита структурных образований, стабилизируемых сорбентом. Показано влияние реакции ионного обмена, межмолекулярных взаимодействий и переноса растворителя на термодинамические и кинетические характеристики сорбции аминокислот. Определен вклад межфазного переноса растворителя в величину свободной энергии Гиббса взаимодействия в системе катионообменник - аминокислота.

Исследована избирательность катионообменника к фенилаланину и цистеину при их совместном присутствии в растворе. Установлено уменьшение селективности ионообменника к ароматической аминокислоте при сорбции из смеси, содержащей цистеин. Показано, что межфазное распределение

аминокислот взаимосвязано и определяется конкуренцией кулоновских, ион-дипольных, диполь-дипольных и гидрофобных взаимодействий в системе.

На базе развитых представлений о явлении коллапса в ион-содержащих полиэлектролитах описаны явления сверхэквивалентной сорбции аминокислот и резкого уменьшения набухаемости катионообменника в процессе поглощения цвиттерлитов. В основу положено обнаруженное явление образования новой кристаллической фазы в структуре катионообменника и выявленные закономерности сорбции воды. Показано, что самоорганизация фенилаланина в фазе ионообменника реализуется за счет π - π -взаимодействия ароматического радикала с матрицей катионообменника, что приводит к образованию более упорядоченных структур.

Закономерности сорбции аминокислот описаны на основе формально-кинетического подхода, позволяющего учесть вклады диффузии и химической реакции в процесс сорбции. Выявлены особенности механизма и изменения кинетических характеристик сорбции аминокислот, обусловленные влиянием строения бокового радикала и температуры.

Практическая значимость. Установленные закономерности взаимодействия в системе вода-аминокислота, обусловленные взаимовлиянием гидрофильных и гидрофобных групп аминокислоты, позволяют прогнозировать распределение компонентов при кристаллизации и плавлении льда. Полученные результаты послужили основой для разработки способа разделения и концентрирования ароматических аминокислот методом кристаллизации без использования дополнительных реактивов.

Обнаруженная зависимость селективности разделения на катионообменнике от гидратационной способности аминокислот и температуры использована для оптимизации процессов разделения и концентрирования цвиттерлитов. На основании установленных физико-химических закономерностей сорбции аминокислот развит метод разделения фенилаланина и цистеина. Показана возможность использования влияния температурного фактора на селективность и сорбционную емкость катионообменника. Предложен двухтемпературный безреагентный способ концентрирования фенилаланина на фоне цистеина.

На защиту выносятся:

- Представления о природе межмолекулярных взаимодействий в системе вода-аминокислота. Взаимосвязь между структурой раствора, концентрацией и строением бокового радикала аминокислоты;

- Физико-химическая модель сорбции аминокислот с учетом структурных изменений в растворах аминокислот и в фазе ионообменника.

- Термодинамика сорбции аминокислот при взаимовлиянии протекающих реакций ионного обмена, нековалентных взаимодействий и переноса растворителя.

- Представления о набухаемости катионообменника и сверхэквивалентном поглощении аминокислот с позиции явления коллапса. Механизм самоорганизации аминокислот в растворе и в фазе катионообменника.

- Описание кинетики сорбции аминокислот на основе формально-кинетического анализа.

- Влияние температуры и структуры бокового радикала на равновесие, кинетику и динамику сорбции аминокислот на Н-сульфокатионообменнике. Безреагентные методы разделения и концентрирования аминокислот.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 127 работ (статьи и тезисы научных конференций), две коллективные монографии, получено два патента.

Результаты работы докладывались на международных, всесоюзных, всероссийских и региональных конференциях и симпозиумах:

Всесоюзном совещании «Создание и применение полимерных материалов в пищевых отраслях промышленности» (Москва, 1986), I Всесоюзном симпозиуме «Препаративная хроматография физиологически активных веществ на полимерных сорбентах» (Ленинград, 1988), X Всесоюзном совещании по кинетике и механизму химических реакций в твердом теле (Черноголовка, 1989), Всесоюзном симпозиуме «Биотехнология и химические методы охраны окружающей среды» (Самарканд, 1989 г.), Зональной конференции «Молекулярная сорбция биологически активных веществ» (Пенза, 1990 г.), Всесоюзной конференции по применению ионообменных материалов в

промышленности и аналитической химии (Воронеж, 1981, 1986, 1991, 1996 г.г.), Региональной научно-технической конференции «Проблемы химии и химической технологии» (Липецк, 1993 г.; Тамбов, 1994, 1996 г.г.; Воронеж, 1995, 1998 г.г.), II Международном практическом конгрессе «Экология России» (Москва, 1994 г.), 35 IUPAC Congress (Istambul, 1995 г.), III Международной конференции «Научные химические технологии» (Тверь, 1995 г.), Международном экологическом конгрессе (Воронеж, 1996 г.), Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств» (Санкт-Петербург, 1996 г.), III International Symposium «TOCOEN-96» (Czech Republic, 1996), International Congress on Analytical Chemistry (Moscow, 1997 г.), XII International Symposium on Physico-chemical methods of the mixtures separation ARS SEPARATORIA -97 (Poland, 1997), Всероссийском симпозиуме по жидкостной хроматографии и электрофорезу (Москва, 1998, 2001, 2002, 2004 г.г.), Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 1998 г.; Казань, 2003 г.), Международной конференции «Мембранные и сорбционные процессы» (Сочи, 2000 г.), Всероссийском симпозиуме «Современные проблемы хроматографии» (Москва, 2002 г.), Всероссийской конференции «Актуальные проблемы аналитической химии» (Москва, 2002 г.), XIV Международной конференции по химической термодинамике (Санкт-Петербург, 2002 г.), Международном симпозиуме «100 лет хроматографии» (Москва, 2003 г.).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 356 страницах машинописного текста, включая введение, 5 глав, выводы, список цитируемой литературы (378 наименований), список сокращений. В работе содержится 21 таблица и 115 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, приведены основные научные результаты и положения, выносимые на защиту, показана практическая значимость работы.

Глава 1. Проведен анализ литературы, посвященной современным представлениям о структуре и свойствах водных растворов биологически активных веществ, в том числе аминокислот. Рассмотрены основные результаты

экспериментальных и теоретических исследований межмолекулярных взаимодействий в растворах при гидратации молекул с полярными и неполярными группами. Изложены имеющиеся в литературе сведения о закономерностях сорбции физиологически активных веществ на сшитых полиэлектролитах. Проанализированы сведения о влиянии полифункциональных соединений на гидратационные свойства ионообменников. Систематизированы и охарактеризованы проблемы разделения и выделения аминокислот с использованием ионообменников.

Глава 2. Межмолекулярные взаимодействия в системе вода-аминокислота. Изложены экспериментальные результаты исследования закономерностей взаимодействия воды с аминокислотами, различающихся структурой бокового радикала. Определены термодинамические и объемные свойства растворов аминокислот в широкой области концентраций. Описан способ разделения и концентрирования ароматических аминокислот методом кристаллизации.

Методом изопиестирования при температуре $295,0 \pm 1\text{K}$ в широком интервале активности воды (a_w) исследованы закономерности взаимодействия воды с кристаллами аминокислот. Для установления влияния строения бокового радикала и природы функциональных групп на гидратационную способность аминокислот и характер взаимодействия в системе вода-аминокислота в качестве объектов исследования выбраны алифатические (аспарагиновая (**Asp**) и глутаминовая (**Glu**) кислоты, α -аланин (α -**Ala**), серии (**Ser**), цистин (**Cys-Cys**), гидрохлориды цистеина (**CysHCl**) и лизина (**LysHCl**) и ароматические аминокислоты (фенилаланин (**Phe**), тирозин (**Tyr**), гистидин (**His**) и триптофан (**Trp**)), имеющие в своем составе полярные и неполярные группировки различной природы.

Методом калориметрии при температуре $295,0 \pm 1\text{ K}$ получены энтальпийные характеристики образования водных растворов ароматических (**Phe**, **Tyr** и **His**) и алифатических (α -**Ala** и **Cys**) аминокислот в широком диапазоне концентраций. В качестве контрольных методов в работе использованы методы: ИК спектроскопия, дифференциальный термический анализ, термогравиметрия,

денситометрия, рентгенофазовый анализ. Представленные в работе экспериментальные результаты обработаны методом математической статистики при доверительной вероятности 0,95 с привлечением критерия Стьюдента и являются достоверными.

Взаимодействие воды с кристаллами аминокислот. Результаты исследования взаимодействия молекул воды, различающихся своей активностью, с кристаллами аминокислот позволили установить взаимосвязь между строением бокового радикала, растворимостью и гидратационной способностью аминокислот.

Экспериментально установлено, что цистин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, фенилаланин и триптофан незначительно поглощают молекулы воды ($n_w \leq 0,3$ моль_в/моль_{АК}) в области ее высокой активности ($a_w \geq 0,975$). Данные ИК спектроскопии (появление полос поглощения в области 3730-3650 см⁻¹, характеризующих одиночные молекулы воды) указывают на распределение молекул воды на поверхности аминокислот. Низкая гидратационная способность аминокислот в широком интервале активности воды обусловлена участием функциональных групп в образовании внутри- и межмолекулярных связей в их структуре и малой доступности реакционных центров.

Выпуклый по отношению к оси абсцисс вид изотерм, характеризующих поглощение воды α -Ala, Ser, Tyr и His·HCl, указывает на слабое взаимодействие в системе вода-аминокислота (рис. 1,2).

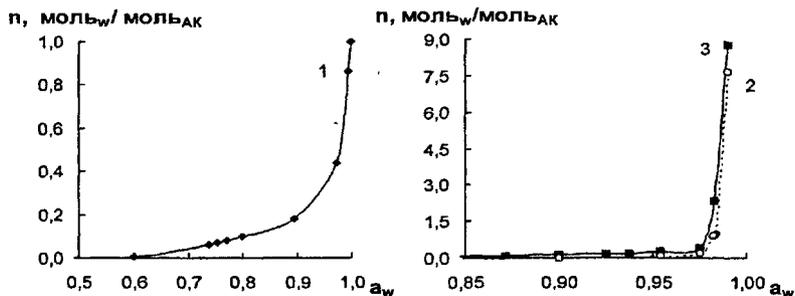


Рис.1 Изотермы поглощения воды аминокислотами при температуре 295 К:
1 - Tyr, 2-Ala, 3-His·HCl (a_w - активность паров воды;
n - количество поглощенных молекул воды молекулой аминокислоты).

Необходимо отметить, что для серина поглощение растворителя начинается сравнительно при низкой его активности ($a_w=0,330$). В области $a_w>0,925$ возрастает гидратационная способность аминокислоты, а при $a_w=0,980$ Ser, взаимодействуя с растворителем, образует раствор концентрацией 1,55 моль/кг. Определена активность воды в насыщенном растворе: $a_w=0,975$.

Для гидрохлоридов лизина и цистеина изотермы имеют S-образный вид, наиболее характерный для гидрофильных соединений. Плато на изотерме в области $a_w=0,410-0,529$ для Lys·HCl и $a_w=0,284-0,620$ для Cys·HCl, а также данные ИК спектроскопии и термического анализа указывают на образование устойчивых стехиометрических комплексов состава Lys·HCl·2H₂O и Cys·HCl·H₂O. Полосы поглощения при 2540 см⁻¹ и 3370 см⁻¹ на спектрограмме образца Lys·HCl·2H₂O характеризуют образование связей COO⁻...H₂O и NH₃⁺...H₂O в структуре соединения. Взаимодействию SH...H₂O в структуре Cys·HCl·H₂O отвечает максимум поглощения при 2680 см⁻¹.

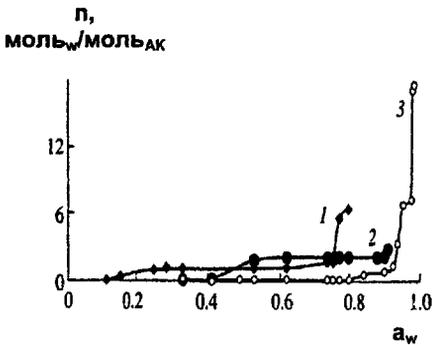


Рис.2 Изотермы поглощения воды Lys·HCl (1), Cys·HCl (2) и Ser (3).

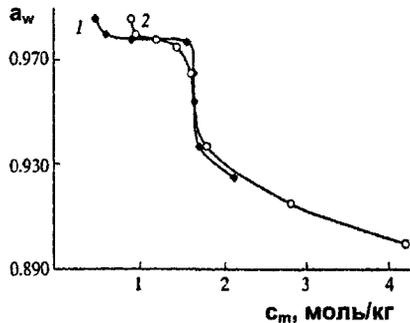


Рис.3 Зависимость активности воды от концентрации для растворов Lys·HCl (1) и Cys·HCl (2).

Образование растворов гидрохлоридов лизина и цистеина в области высокой активности растворителя позволило определить активность воды в насыщенных растворах аминокислот и установить зависимость активности растворителя в образующихся растворах от концентрации (рис.3). Изменение характера концентрационной зависимости активности растворителя

свидетельствует о значительном влиянии аминокислот на структуру растворителя. Резкое снижение активности йоды с ростом концентрации связано с упорядочиванием структуры воды под действием аминокислот.

Установленные закономерности взаимодействия воды с кристаллами аминокислот, обусловленные природой полярных и неполярных групп и их доступностью, позволили составить ряд:



отражающий гидратационную способность исследуемых цвиттерлитов, который согласуется с распределением аминокислот по шкале гидрофобности, предложенной И.Назаки и С. Тамфордом. Следует отметить, что способность аминокислот к взаимодействию с водой не совпадает с их растворимостью. Для тирозина, характеризующегося значительно меньшей растворимостью по сравнению с Phe и Tгр, взаимодействие с растворителем в области его высокой активности обусловлено образованием связи $\text{OH}\dots\text{H}_2\text{O}$ в структуре соединения.

Величина свободной энергии взаимодействия воды с аминокислотами, рассчитанная по данным изотерм равновесного поглощения, отрицательна, что свидетельствует об энергетической выгодности процесса (табл.I). Особенности структуры и строения бокового радикала аминокислоты отражаются в величине ΔG_{hydr} . Меньшие значения свободной энергии Гиббса для алифатических аминокислот обусловлены образованием максимального числа Н-связей в структуре соединения и упорядочиванием в результате образование кристаллогидратов аминокислот, то есть в этом случае энтропийный фактор играет более существенную роль.

Таблица 1

Изменение свободной энергии Гиббса в процессе взаимодействия
молекул воды с аминокислотой

Аминокислота	Tyr	His·HCl	Cys·HCl	Lys·HCl	α -Ala
$-\Delta G_{\text{hydr}}$, кДж/моль	11.40±0,34	6.97±0,21	3,95±0,11	3,25±0,09	1.86±0,05

Для растворов аминокислот на основе экспериментальных данных метода термогравиметрии дана количественная оценка содержания молекул воды,

различающихся кинетической устойчивостью. Наблюдаемые различия в подвижности молекул растворителя позволили сделать предположение о трехслойной модели гидратации для лизина и цистеина и двухслойной модели гидратации для растворов ароматических и гетероциклической аминокислот.

Термохимические и объемные характеристики образования водных растворов аминокислот. На основе анализа термодинамических характеристик образования водных растворов фенилаланина, тирозина, гистидина, α -аланина и цистеина в широком диапазоне концентраций развиты представления о структурных изменениях в растворе под влиянием гидрофильных и гидрофобных групп аминокислот. Термодинамический параметр растворения (интегральная теплота растворения) во всей исследуемой области концентраций определяется суммой двух эффектов: эндотермического эффекта, обусловленного разрушением кристаллической решетки аминокислот, и экзотермического эффекта гидратации, который является суммой ряда эндо- и экзоэффектов. Согласно полученным данным растворение аминокислот в исследуемом диапазоне концентраций протекает с поглощением тепла, то есть контролируется энтропийным фактором, обусловленным структурными перестройками компонентов раствора (рис.4,5).

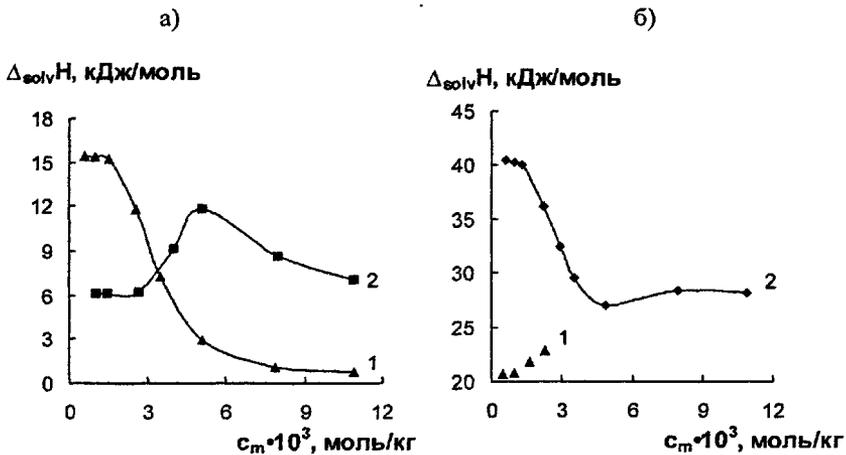


Рис.4 Концентрационная зависимость энтальпии растворения: а) Phe (1), α -Ala (2); б) Tyr (1), His (2).

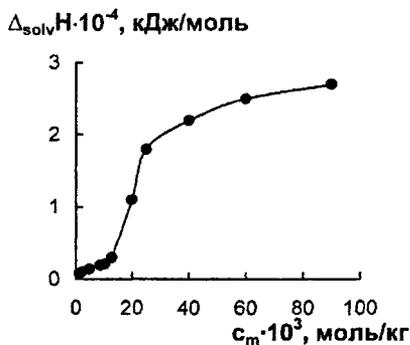


Рис.5. Изотерма растворения цистеина в воде.

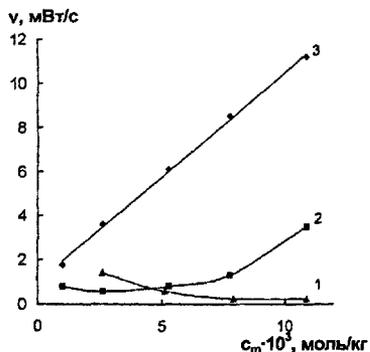


Рис.6 Скорость теплового потока в зависимости от концентрации при растворении: 1-Phe, 2-α-Ala, 3- His.

Термокинетические кривые растворения аминокислот имеют ярко выраженный максимум, который наблюдается в начальный период растворения. Интенсивность теплопоглощения и длительность процесса растворения для гистидина α-аланина и цистеина возрастают с ростом концентрации аминокислот. Большая гидрофобность фенилаланина проявляется в снижении интенсивности максимума теплопоглощения и увеличении длительности процесса растворения при возрастании концентрации раствора. Наблюдаемые различия в термокинетических характеристиках растворения (рис.6) обусловлены характером структурных изменений растворителя при гидратации молекул аминокислот, проявляющих в большей степени гидрофильный или гидрофобный характер.

На концентрационной зависимости энтальпии образования раствора аминокислот ($\Delta_{sol,H}$) выявлено три области. Постоянство значений энтальпий растворения, а также объемных характеристик растворов аминокислот в определенном интервале позволило определить значения предельных энтальпии растворения и гидратации аминокислот и установить область концентраций, соответствующую предельно разбавленным растворам. Полученные результаты находятся в соответствии с данными, представленными в литературе для отдельных аминокислот.

Для α -Ala изотерма растворения имеет экстремальный характер, а для Cys она относится к типу непрерывно возрастающей с ростом концентрации аминокислоты эндотермичностью. Увеличение $\Delta_{\text{sol}}H$ с ростом концентрации свидетельствует о локальной упорядоченности растворителя вблизи полярных и заряженных групп и разрушающем влиянии аминокислот на структуру воды (преобладание гидрофильной гидратации). Меньшие значения энтальпии растворения для цистеина по сравнению с α -аланином обусловлены образованием относительно прочной водородной связи $\text{SH}\dots\text{H}_2\text{O}$ в гидратном комплексе цистеин - вода и находятся в соответствии с результатами изопиестического исследования взаимодействия аминокислоты с молекулами воды.

Изотермы растворения для фенилаланина и гистидина представляют собой кривые с непрерывно убывающей эндотермичностью по мере увеличения концентрации раствора. Такой вид изотерм определяется двумя основными вкладками: стабилизацией структуры воды под действием углеводородного радикала аминокислот (эффект гидрофобной гидратации); уменьшением подвижности молекул воды в результате увеличения числа водородных связей в гидратной оболочке, окружающей находящуюся в растворе молекулу аминокислоты. Для фенилаланина наблюдаемое уменьшение величины $\Delta_{\text{sol}}H$ с ростом концентрации выражено в большей степени.

С ростом концентрации аминокислоты на изотерме растворения отмечается незначительное увеличение (для Cys и His) или уменьшение (для Phe и α -Ala) величины энтальпии растворения. Изменение характера концентрационной зависимости энтальпии связано с ассоциацией аминокислот за счет гидрофобных взаимодействий и образования водородных связей. После достижения максимальной стабилизации структуры воды под действием углеводородного радикала происходит переориентация молекул воды под влиянием образующихся ассоциатов аминокислот и образование новых структурных единиц, что приводит к энергетическому динамическому равновесию в системе.

Большая эндотермичность процесса растворения для гистидина и тирозина указывает на меньшее структурирующее действие аминокислот на воду. Наличие в составе аминокислот дополнительных полярных групп обуславливает

взаимовлияние эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации. Участие цвиттерионной группировки и азота имидазольного кольца в образовании Н-связей с молекулами воды (рис.7) приводит к частичному разрушению структуры воды, что проявляется в ослаблении эффекта гидрофобной гидратации. Большие значения энтальпии растворения для тирозина по сравнению с фенилаланином связаны с участием ОН-группы в образовании Н-связей с молекулами воды.

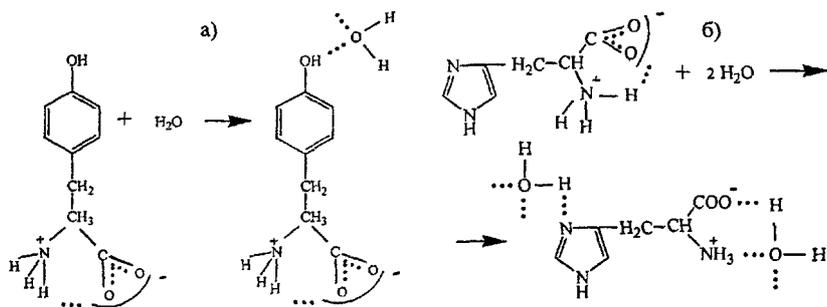


Рис.7 Образование Н-связей в водных растворах аминокислот: а) тирозин; б) гистидин.

Используя метод аддитивности групповых вкладов, установлен характер влияния бензольного, фенольного и имидазольного радикалов на термодинамические характеристики растворения аминокислот (рис.8).

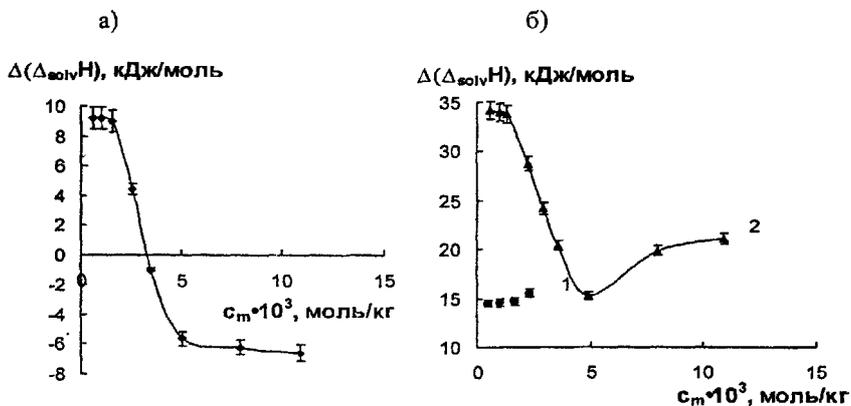


Рис.8 Вклад а) бензольного, б) фенольного (1) и имидазольного (2) радикалов в энтальпию растворения Phe, Tyr и His.

Согласно полученным данным наблюдается усиление гидрофобной составляющей гидратации в ряду $\Delta(\Delta_{\text{solv}}H)_{\text{имидаз.}} < \Delta(\Delta_{\text{solv}}H)_{\text{фен.}} < \Delta(\Delta_{\text{solv}}H)_{\text{бенз.}}$. Различие в структуре аминокислот отражается и в механизме их ассоциации в

растворе. Действие бензольного радикала проявляется в резком изменении энтальпии вплоть до изменения знака (экзотермический процесс) с ростом концентрации аминокислоты. Это связано с тем, что ассоциация в растворе фенилаланина в большей степени выражена за счет взаимодействия между индуцированными диполями, образованными π -электронами ароматического кольца и сопровождается экзоэффектом. Взаимодействия данного типа приводят к образованию в растворе структур в виде пачек (стэкинг-взаимодействия), что объясняет резкое уменьшение эндотермичности с ростом концентрации аминокислоты и более низкие значения величины $\Delta_{\text{sol},H}$ для Phe по сравнению с Tug и His.

Для Tug, His ассоциация в растворе возможна, как за счет гидрофобных эффектов, так и образования водородных связей и диполь-дипольного взаимодействия цвиттерионных групп. Образование ассоциатов для Cys имеет гидрофильный характер благодаря действию диполь-дипольных сил и H-связей.

Таким образом, установленные отличия в характере изменения термокинетических характеристик и виде изотерм растворения связаны с изменениями в структурной организации растворителя в различных концентрационных зонах и определяются взаимовлиянием эффектов ассоциации, гидрофильной и гидрофобной гидратации растворенных веществ.

Разделение смесей ароматических аминокислот, основанное на перераспределении компонентов при кристаллизации и плавлении льда в системе вода - ароматическая аминокислота. Установлен характер распределения фенилаланина и тирозина в водных растворах в процессе кристаллизации в зависимости от условий проведения эксперимента, концентрации и состава раствора. Показано влияние концентрации на значение эффективного коэффициента ($K_{\text{эфф}}$) распределения аминокислот при кристаллизации. Для тирозина $K_{\text{эфф}}$ возрастает с увеличением концентрации раствора, тогда как для фенилаланина концентрационная зависимость $K_{\text{эфф}}$ имеет экстремальный характер. Установлено, что тирозин концентрируется в последних фракциях расплава, что составляет примерно 75 % от общего количества аминокислоты в растворе. Фенилаланин не накапливается в слитке льда, а

вымывается в виде структурного комплекса вода-аминокислота. Присутствие Phe в растворе не изменяет характер распределения тирозина, но приводит к его концентрированию. Влияние Tyr проявляется в перераспределении фенилаланина в структуре льда по сравнению с модельным раствором.

В качестве характеристики, отражающей количественное разделение аминокислот, использовали коэффициент разделения (k_R). Обнаружено, что наиболее эффективное разделение аминокислот достигается в последних фракциях расплава (рис.9) при соотношении концентраций Tyr/Phe в исходном растворе равном 3. На основании проведенного исследования выбраны оптимальные условия разделения ароматических аминокислот, позволяющие получить тирозин в чистом виде.

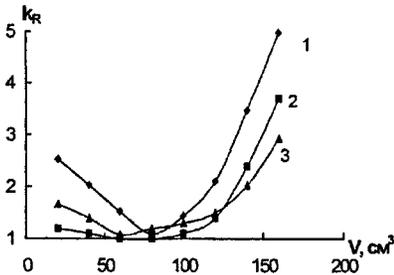


Рис.9 Изменение коэффициента разделения аминокислот методом кристаллизации в системе H_2O -Tyr-Phe.
 $C_{\text{Tyr}}=1,1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³;
 $C_{\text{Phe}}=0,3 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (1),
 $0,6 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (2),
 $0,9 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (3).

Глава 3. Равновесие ионного обмена аминокислот, различающихся структурой бокового радикала на Н-сульфокатионообменнике. Изложены результаты исследования закономерностей сорбции биполярных ионов аминокислот (Phe, Tyr, His и Cys), различающихся структурой бокового радикала, на Н-сульфокатионообменнике КУ-2х8 при температурах 278, 283 и 295 К. Определены термодинамические характеристики сорбции аминокислот. Выявлена связь между природой межмолекулярных взаимодействий в растворе аминокислот и механизмом их сорбции. Показано влияние межфазного переноса растворителя на селективность сорбции.

Межфазное распределение аминокислот оценивали на основе изотерм сорбции. Как видно из рис.10, строение бокового радикала цвиттерлита оказывает влияние на вид изотермы и на величину предельной сорбционной емкости катионообменника. Кривые распределения ионов аминокислот между

фазами при сорбции из растворов с концентрацией $< 5,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ имеют S-образный вид с явным обращением селективности с ростом сорбционного параметра.

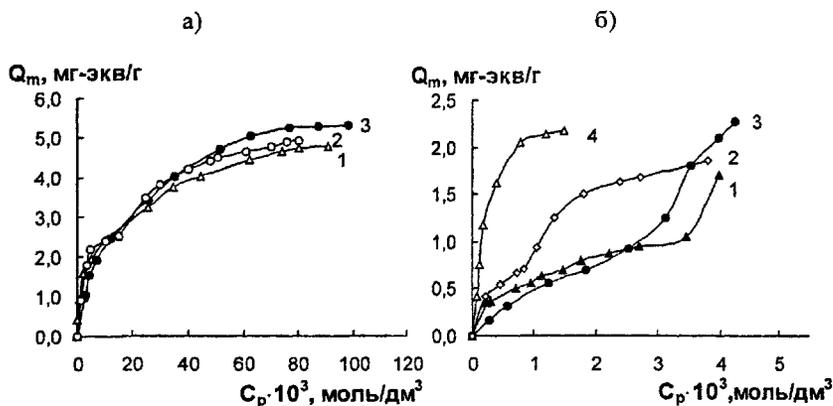


Рис.10 Изотермы сорбции зwitterионов аминокислот катионообменником КУ-2x8 при 293 К: а) в области концентраций $2,0 \cdot 10^{-3}$ - $100,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³; 1 – His; 2 – Cys; 3 – Phe; б) в области концентраций $5,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³; 1 – Phe; 2 – His; 3 – Cys; 4 – Tyr.

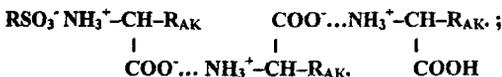
При анализе равновесных характеристик сорбции учитывали полученные данные о природе межчастичных взаимодействий в растворе аминокислот в широкой области концентраций. Установлено, что одним из факторов, определяющим механизм сорбции, является концентрация аминокислоты в растворе. Независимо от природы бокового радикала аминокислоты сорбция из предельно разбавленных растворов протекает по механизму ионного обмена (электростатическое взаимодействие между ионами аминокислот и функциональной группой катионообменника).

Некоторое увеличение концентрации ионов водорода в равновесном растворе и полоса поглощения в интервале $1620 - 1550$ см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям диссоциированной карбоксильной группы, указывают на протекание реакции ионного обмена с выделением ионов водорода. Появление полосы поглощения в области $1755-1700$ см⁻¹, характерной для протонированной карбоксильной группы, при сорбции ионов аминокислот из раствора с концентрацией для Phe[±], Tyr[±] и His[±] более $1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³, а для Cys[±] $> 2,5 \cdot 10^{-3}$

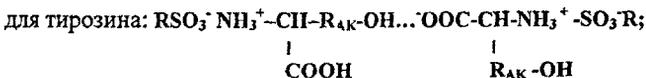
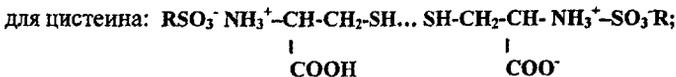
моль/дм³ позволяет говорить о перезарядке цвиттерионов аминокислот в ионообменнике под влиянием рН внутреннего раствора. В этом случае осуществляется процесс протолита, а не ионного обмена.

Наблюдаемое резкое возрастание сорбционного параметра при увеличении концентрации аминокислот во внешнем растворе примерно до $10 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ происходит как за счет обменного, так и необменного поглощения цвиттерлитов и объясняется различным механизмом сорбции, определяемым соотношением гидрофильных и гидрофобных свойств аминокислот. В результате ионного обмена происходит ориентированная укладка присоединяющихся ионов аминокислот, то есть образуется новая структурная единица. Между сорбированными ионами и ионами аминокислот во внутриионитном растворе возможно проявление межмолекулярных взаимодействий (кооперативный характер сорбции). Качественная природа центра взаимодействия аминокислот в фазе ионообменника может быть представлена следующим образом.

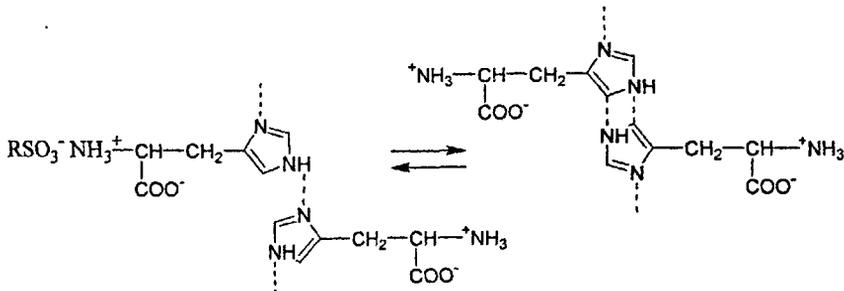
Взаимодействие цвиттерионных группировок аминокислот:



Участие полярных групп бокового радикала аминокислот в образовании водородной связи:



для гистидина:



Образование ассоциатов аминокислот в растворе в определенной области концентраций также находит отражение в сорбционной емкости катионообменника. Следует отметить, что природа ассоциации цвиттерлитов определяется структурой бокового радикала и проявляется в характере изменения сорбционной емкости и ее величине. Обнаружено, что увеличение гидрофобных свойств аминокислоты приводит к возрастанию сорбционной емкости катионообменника. При сорбции Phe, боковой радикал которого подобен структурному звену матрицы катионообменника, наблюдается значительное превышение сорбционной емкости ионообменника по сульфогруппам. Для фенилаланина, в отличие от других аминокислот, характерно образование ассоциатов в виде пачек (стэкинг-эффект) за счет π - π -взаимодействий. Сверхэквивалентное поглощение фенилаланина обусловлено взаимодействием таких структур с матрицей катионообменника (рис.11).

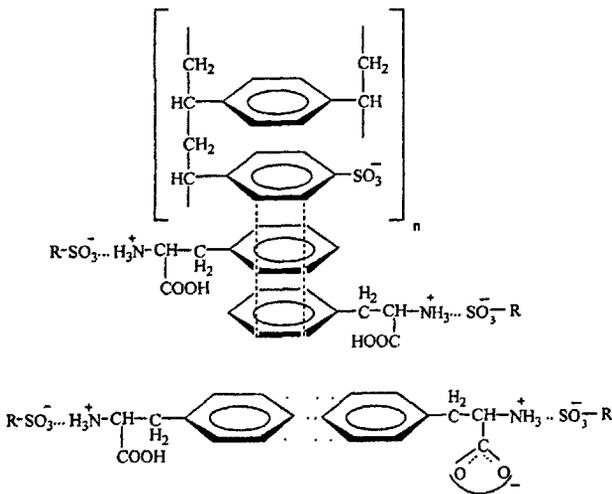


Рис.11

Схемы взаимодействия ароматического радикала фенилаланина с матрицей катионообменника.

Влияние строения бокового радикала аминокислоты отражается в величине равновесных коэффициентов ионного обмена (K_n), коэффициентов распределения (K_p) и характере их изменения в процессе сорбции. Для Phe и Tug зависимость K_n от равновесной концентрации в растворе выражается кривой с максимумом, тогда как для Cys и His величина K_n возрастает с ростом концентрации. Наблюдаемое уменьшение коэффициента распределения по мере

сорбции аминокислот обусловлено проявлением дополнительных нековалентных взаимодействий в системе ионообменник-вода-аминокислота, приводящим к стерическим изменениям в фазе ионообменника. Согласно результатам сканирующей зондовой микроскопии сорбция аминокислот осуществляется преимущественно в области гелевых участков и приводит к уплотнению структуры катионообменника.

Для исследуемых аминокислот получен следующий ряд селективности: $\text{H}^+ \text{-Phe}^{\pm} > \text{H}^+ \text{-Tyr}^{\pm} > \text{H}^+ \text{-His}^{\pm} > \text{H}^+ \text{-Cys}^{\pm}$. Нагляднее различия в избирательности катионообменника проявляются при сорбции аминокислот из более концентрированных растворов.

Изменение гидратационных характеристик катионообменника при сорбции аминокислот. Гидратационные взаимодействия, наряду с межionными взаимодействиями и связями вода-вода относятся к основным молекулярным процессам, определяющим гомогенные и гетерогенные равновесия. Для количественной оценки взаимовлияния эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации аминокислот на гидратационные характеристики катионообменника использовали изотермы сорбции воды ионообменником, насыщенным аминокислотами, а также рассчитанные значения термодинамического потенциала (ΔG_{hydr}) и давления набухания ($\Delta\pi$). Анализ экспериментальных данных позволил выявить следующие закономерности.

Выявлено, что содержание воды в фазе ионообменника уменьшается пропорционально увеличению сорбционного параметра в области степени заполнения менее 0,6 (рис.12).

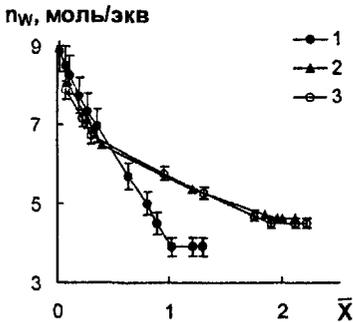


Рис.12 Количество сорбированной воды при $a_w = 0,980$ в зависимости от степени заполнения сульфокатионообменника КУ-2x8 фенилаланином при температурах: 1-293 К; 2-283 К; 3- 278 К.

Сверхэквивалентное поглощение аминокислот приводит к незначительному изменению гидратационной способности катионообменника.

Определена активность воды в фазе ионообменника при различном содержании аминокислоты. Наблюдается снижение активности растворителя с ростом концентрации противоиона. В большей степени изменение активности воды отмечается при сорбции цвиттерионов цистеина, что связано с меньшей величиной углеводородного радикала аминокислоты и преобладанием гидрофильной гидратации, то есть образованием более сильных связей молекул воды с SH-группой противоиона.

Характер изменения гидратационных характеристик катионообменника при сорбции аминокислот, обусловленный конкуренцией различных типов взаимодействий в системе катионообменник-вода-аминокислота, может быть рассмотрен с позиции теоретически описанного и экспериментально обнаруженного явления коллапса геля, которое проявляется в резком увеличении набухаемости ионообменника в области высокой активности воды, уменьшении объема гранул и гидратационной способности катионообменника. Дегидратация катионообменника в большей степени выражена при сорбции фенилаланина и в меньшей степени — цистеина. Максимальные различия в гидрофобности аминокислот проявляются в характеристиках гидратации катионообменника в области высокой активности растворителя и связаны с соотношением действия полярных и неполярных групп аминокислот на структуру воды.

Данные рентгенодифрактометрических исследований указывают о наличие в структуре Н-катионообменника только ближнего порядка в расположении полиэлектролитных цепей (аморфное гало, соответствующее параметру Вульфа-Брэгга, равному 4,7) (рис.13). Присутствие фенилаланина и тирозина в фазе сшитого полиэлектролита приводит к появлению на фоне гало рефлексов, отвечающих различным межплоскостным расстояниям, позволяющим говорить об образовании в структуре катионообменника новой поликристаллитной фазы. Более высокая селективность катионообменника к фенилаланину по сравнению с тирозином отражается в большем количестве рефлексов на фоне гало и отвечает

сравнительно высокой упорядоченности расположения аминокислоты внутри сшитого полиэлектролита.

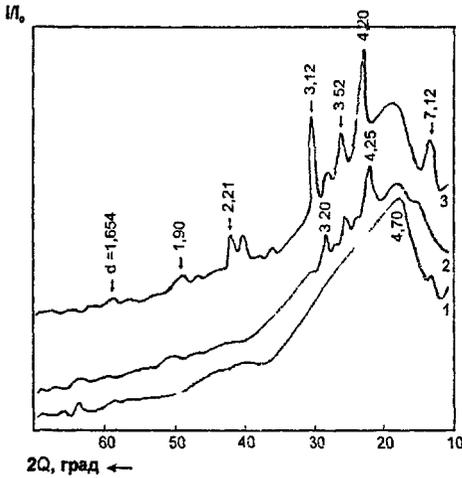


Рис.13 Дифрактограмма катионообменника КУ-2x8: 1 – Н – форма; 2 – КУ-2x8, насыщенный Тир 3 – КУ-2x8, насыщенный Phe I_0 – относительная интенсивность; 2θ – угол дифракции; d – межплоскостное расстояние.

Организация аминокислоты в фазе сшитого полиэлектролита за счет различных межмолекулярных взаимодействий приводит к уменьшению эластичности цепей полимера и проявляется в снижении осмотического давления. На образование наиболее упорядоченных структур в фазе ионообменника при сорбции Phe указывают большие изменения осмотического давления в системе при любом влагосодержании. Выявлено, что изменение свободной энергии сорбции воды более выражено для катионообменника в форме фенилаланина. Значительное изменение величины ΔG_{hydr} характерно при сорбции первых двух молекул воды, когда взаимодействие вода-активные центры наиболее интенсивно.

Определен ряд гидратационной способности для катионообменника в аминокислотной форме: $\text{H}^+ > \text{Cys}^+ > \text{His}^+ > \text{Tyr}^+ > \text{Phe}^+$, который согласуется с рядом гидрофобности аминокислот в растворе и изменением избирательности в ряду исследуемых аминокислот. Полученные результаты являются прямым свидетельством влияния характера гидратационных взаимодействий на селективность катионообменника к аминокислотам.

Методом термогравиметрии дана количественная оценка содержания молекул воды в фазе сшитого полиэлектролита, различающихся подвижностью.

Показано изменение кинетических характеристик растворителя под влиянием полярных и неполярных групп аминокислот. Количество молекул воды, взаимодействующих с функциональными группами противоиона и катионообменника, то есть обладающих меньшей подвижностью уменьшается в ряду противоионов: $\text{Cys}^{\pm} > \text{His}^{\pm} > \text{Tyr}^{\pm} > \text{Phe}^{\pm}$.

Термодинамика сорбции аминокислот. Дана оценка дифференциальным термодинамическим функциям сорбции аминокислот (свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии). Значения ΔH_{X1} рассчитывали по температурным зависимостям определяемых равновесных характеристик и результатам calorиметрических измерений. Хорошее соответствие между данными подтверждает достоверность определяемых значений коэффициента ионного обмена при сорбции аминокислот из предельно разбавленных растворов.

Установлены зависимости дифференциальных значений термодинамических функций сорбции аминокислот от ионного состава катионообменника (рис.14,15). Процесс сорбции аминокислот в выбранном диапазоне концентраций экзотермичен, следовательно, селективность сорбции усиливается с понижением температуры.

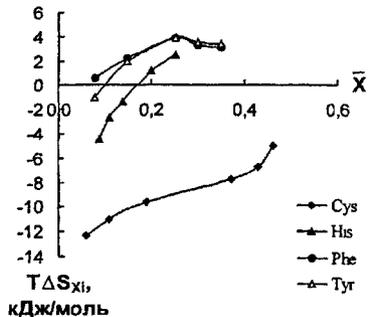
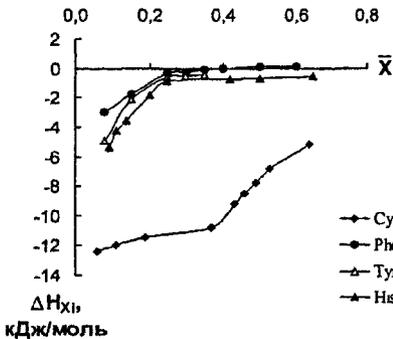


Рис.14. Зависимость энтальпийного фактора от степени заполнения сульфокатионообменника КУ-2х8 аминокислотой при 293 К.

Рис.15. Зависимость энтропийного фактора от степени заполнения сульфокатионообменника КУ-2х8 аминокислотой при 293 К.

Обнаружено уменьшение экзотермичности и смещение величины $T\Delta S_{X_1}$ в сторону положительных значений с ростом степени заполнения катионообменника аминокислотой, что обусловлено дегидратацией сшитого полиэлектролита и реорганизацией Н-связей в системе.

Влияние строения бокового радикала аминокислоты отражается и на характере изменения энтальпии и энтропии процесса и усиливается с ростом сорбционного параметра. Более отрицательные значения ΔH_{X_1} и ΔS_{X_1} относятся к сорбции цистеина, а более положительные — к сорбции фенилаланина. Наибольшая гидрофобность фенилаланина и способность бензольного радикала фенилаланина к специфическому π - π — взаимодействию с матрицей катионообменника проявляются в положительном значении энтропийного фактора и переходе энтальпийной составляющей из области отрицательных в область положительных значений. Энтальпийный характер взаимодействия убывает в ряду: **Cys >His >Tyr >Phe**. Эти изменения коррелируют с возрастанием селективности сорбции и большей дегидратацией катионообменника при переходе от более гидрофильного цистеина к более гидрофобному фенилаланину. Таким образом, взаимодействие катионообменника с рассматриваемыми аминокислотами имеет различный характер, который обусловлен соотношением гидрофильных и гидрофобных свойств противоионов. Полученный результат имеет практическое значение для процессов разделения аминокислот на катионообменнике.

Впервые определено влияние межфазного переноса растворителя на величину свободной энергии ионного обмена. Полученные значения энергии Гиббса (ΔG_w) переноса воды из фазы ионообменника во внешний раствор при сорбции аминокислот указывают на положительный вклад дегидратации в величину свободной энергии сорбции. Обнаружено снижение влияния межфазного переноса растворителя в ряду аминокислот: **Phe >Tyr >His >Cys**.

Влияние температуры на равновесные характеристики сорбции. Рассмотрено влияние температуры ниже 295 К на равновесные характеристики сорбции аминокислот. Анализ экспериментальных данных позволил выявить возрастание селективности катионообменника к аминокислотам с изменением

температуры от 293 до 278 К, в большей степени проявляющееся для фенилаланина. Степень заполнения катионообменника биполярными ионами фенилаланина превышает его емкость при температуре 293 К в 1,2 раза, при 283 К - в 2 раза, при 278 К - в 2,3 раза. Рост селективности ионообменника к аминокислотам с понижением температуры обусловлен увеличением вклада необменных взаимодействий в системе за счет образования ассоциатов аминокислот. Установлено, что изменение температуры от 295 К до 278 К приводит к значительному росту коэффициента распределения аминокислот. Факторами, определяющими проявление температурного эффекта, являются изменение гидратационных характеристик сшитого полиэлектролита и характер межмолекулярных взаимодействий при сорбции аминокислот.

Результаты ИК спектроскопии подтверждают наблюдаемое увеличение необменной составляющей сорбции с понижением температуры за счет образования ассоциатов аминокислоты в фазе катионообменника. Для катионообменника, насыщенного аминокислотой при температурах ниже 293 К, отмечено увеличение интенсивности полос поглощения в области $1630-1650\text{ см}^{-1}$ (колебания NH_3^+ -групп, связанных с COO^- -группами) и в диапазоне $1600-1500\text{ см}^{-1}$ (колебания, обусловленные бензольным и имдазольным радикалами).

Равновесие обмена в системе Н-сульфокатионообменник-фенилаланин-цистеин. Исследованы закономерности сорбции ароматической аминокислоты (фенилаланина) и алифатической (цистеина) на Н-сульфокатионообменнике при их совместном присутствии в растворе. Взаимовлияние аминокислот проявляется как в виде изотерм сорбции, так и в величине сорбционных параметров. Присутствие ароматической аминокислоты в растворе приводит к изменению вида изотермы сорбции для цистеина. Влияние цистеина отмечается в уменьшении сорбционной способности катеонита к фенилаланину. Это связано с конкуренцией между ассоциацией индивидуальных аминокислот и образованием ассоциатов фенилаланин-цистеин за счет взаимодействия цвиттерионной карбоксилатной группой ароматической аминокислоты с SH-группой цистеина. Отмеченные различия в величине коэффициента избирательности для

фенилаланина и цистеина свидетельствуют о большей селективности катионообменника к ароматической аминокислоте.

Установлено влияние соотношения аминокислот во внешнем растворе на равновесные характеристики сорбции. Анализ экспериментальных данных позволил выявить следующие закономерности. По мере уменьшения соотношения $C_{Cys/Phc}$ характерно: более резкое возрастание сорбционной способности катионита к фенилаланину по сравнению с монотонным уменьшением количества поглощенного цистеина; увеличение коэффициентов распределения между фазами раствора и катионообменника для ароматической аминокислоты; рост коэффициента разделения аминокислот.

Межфазное распределение компонентов взаимосвязано и определяется различными факторами: возможностью ассоциации между фенилаланином и цистеином, которая снижается по мере уменьшения соотношения $C_{Cys/Phc}$; различием в характере взаимодействия аминокислот с катионообменником (энтальпийным характером сорбции цистеина и энтропийным фенилаланина); различием в гидратационных параметрах аминокислот.

Глава 4. Кинетика сорбции аминокислот. Применение формально-кинетического подхода при выборе модели, описывающей экспериментальные кинетические данные процесса сорбции фенилаланина и тирозина на H-катионообменнике (зависимости степени превращения (α) от продолжительности процесса (τ)) на основе закономерности $g(\alpha) = f(\tau)$, позволило определить механизм отдельных стадий процесса и кинетические характеристики сорбции.

На начальном этапе сорбции ($\alpha < 0,53$) для фенилаланина и ($\alpha < 0,47$) для тирозина процесс контролируется внутримолекулярным транспортом и описывается уравнением трехмерной диффузии: $g(\alpha) = [1 - (1 - \alpha)^{1/3}]^2$. Понижение температуры проявляется в уменьшении подвижности аминокислоты, что связано с увеличением необменной составляющей сорбции и большей степени дегидратации катионообменника. Меньшие значения эффективного коэффициента диффузии для тирозина обусловлены большей гидрофильностью аминокислоты.

На следующем этапе при всех исследуемых температурах процесс контролируется реакцией на межфазной границе и описывается уравнением:

$g(\alpha) = [1-(1-\alpha)^{1/3}]$. Подтверждением данному механизму являются результаты термодинамического описания процесса сорбции аминокислот, отражающие взаимосвязь энергетических и структурных изменений в системе, а также экспериментально наблюдаемое уменьшение объема гранул сшитого полиэлектролита при сорбции аминокислот. Изменение температуры от 293 до 278 К приводит к снижению скорости процесса на данном этапе примерно в 1,5 раза. При сорбции тирозина характерно более раннее проявление химической стадии, меньшие значения константы скорости и более высокие значения энергии активации (для Phe - 14,3 кДж/моль; для Tug - 16,5 кДж/моль).

Лимитирующей стадией на конечном этапе процесса является образование и рост зародышей новой фазы. Процесс описывается уравнением: $g(\alpha) = -\lg(1-\alpha)^{1/3}$. Локализацию процесса обуславливает неравномерное распределение на поверхности и в фазе ионообменника неравноценных активных центров аминокислот. Значения энергии активации для Phe и Tug составляют соответственно 15,4 кДж/моль и 17,3 кДж/моль. Увеличение скорости процесса с понижением температуры на данном этапе, по-видимому, связано с реализацией более выгодных структурных ассоциатов аминокислот с участием функциональных групп и матрицы катионообменника.

Глава 5. Исследование динамики сорбции аминокислот на Н-сульфокатионообменнике. Представлены результаты исследования динамики сорбции аминокислот в колонках с неподвижным слоем катионообменника. Показано, что более низкие значения эффективных коэффициентов диффузии фенилаланина и тирозина по сравнению с цистеином проявляются в размывании фронта сорбции в начальный момент и в завершении процесса. Экспериментально установлено, что высокая селективность катионообменника к фенилаланину позволяет использовать ароматическую аминокислоту в качестве вытеснителя и получить концентрированный раствор цистеина.

Результаты изучения равновесия, кинетики и динамики сорбции аминокислот на Н-сульфокатионообменнике послужили основой для разработки метода разделения цистеина и фенилаланина. Показано взаимное влияние аминокислот на динамические характеристики сорбции. Присутствие в исходном

растворе ароматической аминокислоты изменяет ход сорбционного процесса для цистеина: снижается динамическая обменная емкость до проскока, обостряется фронт сорбции и увеличивается степень использования катионообменника. Выходная кривая для фенилаланина отличается резкой асимметричностью.

Возможность разделения ароматической и алифатической аминокислоты впервые изучена в настоящей работе. Через неподвижный слой Н-катионообменника пропускается раствор смеси цистеина и фенилаланина с соотношением концентраций, соответствующих содержанию аминокислот в производственных растворах. Разделяемые аминокислоты сорбируются ионообменником, и вблизи фронта десорбции ионов H_3O^+ происходит вытеснение ионов цистеина. Эксперименты показали, что благодаря большей селективности катионообменника к фенилаланину, ароматическая аминокислота накапливается в фазе ионообменника, а цистеин десорбируется в виде катиона и цвиттериона. Заметный проскок Phe в растворе на выходе из колонки наблюдается, когда концентрация Cu^{2+} приближается к исходной. Показано, что степень извлечения цистеина составляет не менее 50 %.

Установленное влияние температуры на равновесные и кинетические характеристики сорбции аминокислоты предполагает возможность использования температурного фактора в процессах разделения и концентрирования аминокислот. При проведении процесса сорбции аминокислот изменение температуры от 295 до 283 К проявляется в изменении фронта сорбции и увеличении емкости катионообменника. В случае Phe понижение температуры повышает емкость до проскока в 1,4 раза. Данные динамического эксперимента проведенного в двухтемпературном режиме циклического процесса на сульфокатионообменнике в форме цистеина для системы фенилаланин-цистеин показали возможность разделения ароматической и алифатической аминокислот и концентрирование фенилаланина (рис.16).

При проведении первой стадии процесса сорбции аминокислот при температуре 283 К за счет увеличения селективности катионообменника к фенилаланину происходит его концентрирование в фазе ионообменника, тогда как цистеин переходит в объем фильтрата. С повышением температуры до 305 К

селективность к ароматической аминокислоте снижается и наблюдается выброс фенилаланина в фильтрат. В результате одного цикла работы происходит концентрирование фенилаланина в растворе в 1.5 раза.

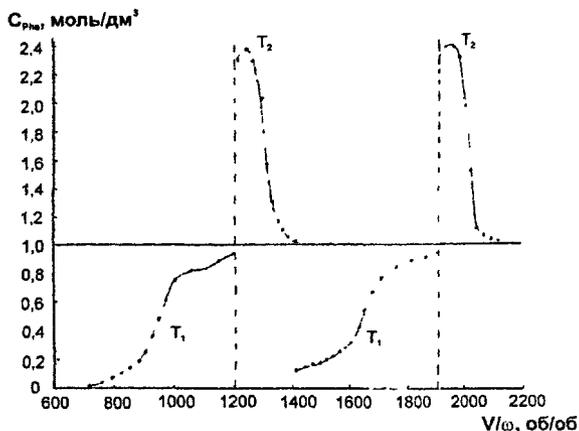
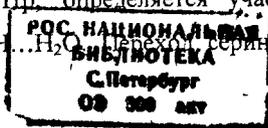


Рис.16. Концентрация ионов Phe на выходе из колонки в двухтемпературном режиме: $T_1 = 283 \text{ K}$; $T_2 = 305 \text{ K}$. Концентрация модельного раствора: $C_{\text{Cys}} = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ моль/дм}^3$; $C_{\text{Phe}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ моль/дм}^3$. Катионообменник КУ-2х8 в форме Cys. V/ω - приведенный объем

ВЫВОДЫ

1. Развита метод изоэлюирования для изучения гидратационной способности твердых образцов биологически активных веществ. Выявлены закономерности взаимодействия воды с кристаллами аминокислот и определены количественные характеристики гидратации, обусловленные доступностью структуры аминокислоты для проникновения молекул растворителя, природой бокового радикала и активностью реакционных центров. Дана оценка свободной энергии Гиббса гидратации аминокислот. Определен и объяснен ряд гидратации: $\text{Cys-Cys} \approx \text{Asp} \approx \text{Gly} \approx \text{Phe} \approx \text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Ala} > \text{HisHCl} > \text{Ser} > \text{LysHCl} > \text{CysHCl}$, совпадающий с распределением аминокислот по шкале гидрофобности, предложенной И.Назаки и С. Тамфордом.

Проанализирована связь гидратационной способности аминокислот с их растворимостью и взаимовлиянием полярных и неполярных групп. Большое сродство молекул воды к тирозину, обладающему меньшей растворимостью по сравнению с Cys-Cys, Asp, Gly, Phe и Trp, определяется участием фенольного радикала Tyr в образовании связи $\text{OH} \dots \text{H}_2\text{O} \dots \text{C}_6\text{H}_4$ тирозина, гидрохлоридов



лизина и цистеина в растворимое состояние в области высокой активности водяного пара позволил определить активность растворителя в их насыщенных растворах, а для LysHCl и CysHCl выявить зависимость активности воды и коэффициента активности аминокислоты от концентрации. Установлено образование устойчивых кристаллогидратов состава $\text{Lys}\cdot\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cys}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$.

2. На основе данных термогравиметрического анализа разработан способ количественной оценки содержания кинетически неравноценных молекул воды в растворе аминокислот и в фазе ионообменника. Развита методика к описанию молекулярно-кинетического состояния растворителя в гомогенных и гетерогенных системах при взаимодействии полярных и неполярных групп. Выявлено, что действие полярных групп аминокислоты проявляется в увеличении подвижности растворителя.

3. Определены термодинамические характеристики образования раствора аминокислот при переходе от предельно разбавленного к более концентрированному. Процесс растворения аминокислот в выбранном диапазоне концентраций эндотермичен и определяется энтропийной составляющей энергии Гиббса. На концентрационной зависимости энтальпии растворения выявлено три области:

- независимости энтальпии растворения в определенном концентрационном интервале;
- линейного увеличения (для аланина и цистеина) или уменьшения (для фенилаланина и гистидина) эндотермичности процесса, определяемого взаимодействием эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации;
- незначительного изменения эндотермичности с ростом концентрации, обусловленного количественной взаимосвязью эффектов гидратации и ассоциации.

Большая величина энтальпии растворения для гистидина является результатом усиления роли специфической гидратации за счет азота имидазольного кольца и цвиттерийной группировки. На основании полученных и литературных данных предложена схема межчастичных взаимодействий и обоснован механизм самоассоциации аминокислот в водном растворе. Показано,

что для фенилаланина ассоциация осуществляется в основном за счет межплоскостного (стэкинг) взаимодействия.

Определены значения энтальпии растворения и гидратации при образовании бесконечно разбавленного раствора. Метод анализа аддитивности групповых вкладов в величину энтальпии растворения позволил установить характер влияния бензольного, фенольного и имидазольного радикалов на структуру воды. Наибольшее структурирующее воздействие бензольного радикала на воду проявляется в изменении знака энтальпии растворения.

4. Установлено различие в характере распределения фенилаланина и тирозина в водном растворе при кристаллизации. Выявлено, что тирозин накапливается в слитке льда, а фенилаланин вымывается в первых фракциях расплава. Полученные результаты послужили основой для разработки способа разделения и концентрирования ароматических аминокислот методом кристаллизации без использования дополнительных реактивов.

5. Выявлены закономерности сорбции ароматических аминокислот и цистеина на Н-сульфокатионообменнике, определяемые строением бокового радикала аминокислоты (природой функциональных групп и их количеством, формой углеводородного радикала), температурой и характером межмолекулярных взаимодействий в растворе. На основе развитых представлений о структуре водных растворов аминокислот описан механизм межчастичных взаимодействий в системе сшитый катионообменник - вода — аминокислота. Показано, что специфичность сорбции фенилаланина определяется π - π -взаимодействием аминокислоты с матрицей катионообменника. Установлен и объяснен ряд селективности аминокислот **Phe > Tyr > His > Cys** на Н-сульфокатионообменнике. Обнаружено увеличение селективности катионообменника к аминокислотам при изменении температуры от 295 до 278 К, в большей степени характерное для фенилаланина.

6. Дана оценка термодинамических характеристик сорбции аминокислот. Процесс поглощения катионообменником дипольных ионов аминокислот экзотермичен и сопровождается уменьшением энтальпийной составляющей сорбции и ростом энтропии. Обнаружено, что энтальпийный характер

взаимодействия убывает в ряду цвиттерлитов: **Cys, His, Tyr, Phe**. Показано, что изменение энтропийной составляющей сорбции аминокислот коррелирует с возрастанием селективности и дегидратацией катионообменника при переходе от более гидрофильного цистеина к более гидрофобному фенилаланину. Определен вклад межфазного переноса растворителя в величину свободной энергии Гиббса сорбции аминокислот.

7. Выявлено взаимовлияние фенилаланина и цистеина на равновесные характеристики сорбции. Показано, что межфазное распределение компонентов в системе катионообменник — фенилаланин - цистеин взаимосвязано и определяется следующими факторами:

- возможностью ассоциации между фенилаланином и цистеином, которая снижается по мере уменьшения соотношения $C_{Cys/Phe}$;
- природой взаимодействия аминокислот с катионообменником (энтальпийным характером сорбции цистеина и энтропийным фенилаланина);
- различием в гидратационных параметрах аминокислот, определяемых соотношением вклада эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации.

8. На основе развитых представлений о явлении коллапса в ион-содержащих полиэлектролитах объяснены наблюдаемые в процессе поглощения цвиттерлитов эффекты сверхэквивалентной сорбции аминокислот и резкого уменьшения набухаемости катионообменника. В основу положено обнаруженное явление образования новой кристаллической фазы в структуре катионообменника при сорбции ароматических аминокислот и выявленное изменение гидратационных характеристик и объема гранул катионообменника. Показано, что самоорганизация фенилаланина в фазе ионообменника реализуется за счет стэкинг-взаимодействия и проявляется в образовании более упорядоченных структур.

9. Кинетика сорбции аминокислот описана на основе формально-кинетического анализа, позволяющего учесть вклад диффузии и химической реакции. На примере фенилаланина и тирозина показано влияние строения бокового радикала и температуры на механизм и кинетические характеристики

сорбции цвиттерлитов. Сорбция тирозина характеризуется более ранним проявлением химической стадии, меньшими значениями константы скорости и более высокими значениями энергии активации, что обусловлено изменением подвижности аминокислоты в результате образования комплекса «фенолят-ион - вода». Понижение температуры проявляется в снижении констант скорости на начальных этапах процесса.

10. Исследована динамика сорбции фенилаланина, тирозина и цистеина на H -сульфокатионообменнике. Определено влияние температуры в области температур ниже 295 К и структуры бокового радикала на динамические характеристики сорбции аминокислот. Показана возможность использования зависимости селективности и сорбционной способности катионообменника от температуры и природы аминокислоты при разделении и концентрировании аминокислот. На основании установленных физико-химических закономерностей сорбции аминокислот сформулированы условия разделения фенилаланина и цистеина.

Основное содержание диссертации изложено в следующих статьях:

1. Селеменев В.Ф. Поглощение глутаминовой кислоты сульфокатионитами / В.Ф. Селеменев, З.П. Мирошникова, Л.А. Огнева, И.И. Ермакова, Д.Л. Котова / Журн. физ. химии. - 1985. - Т.59, №8. С. 1992-1995.
2. Селеменев В.Ф. Кинетика дегидратации анионита АВ-17-2П, насыщенного малорастворимыми аминокислотами / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова // Журн. физ. химии. - 1986. - Т.60, №8. - С. 2062-2063.
3. Селеменев В.Ф. Особенности состояния воды в анионите АВ-17-2П, насыщенного глутаминовой кислотой / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова, В.А. Углинская и др. // Журн. физ химии. - Т.60, №9. - С. 2269-2271.
4. Котова Д.Л. Компенсационная зависимость в кинетике дегидратации анионита АВ-17-2П / Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев, Т.В. Елисеева и др. // Журн. физ. химии. - Т.63, №8. - С. 2212-2214.

5. Селеменев В.Ф. Кинетика дегидратации сульфокатионитов в неизотермическом режиме / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова // Журн. физ. химии. - 1990. - Т.64, №4. - С.1130-1133.
6. Селеменев В.Ф. Особенности гидратации анионита АВ-17-2П, насыщенного аминокислотами / В.Ф. Селеменев, Л.Б. Антаканова, Д.Л. Котова // Журн. физ. химии. - 1990. - Т.64, №5. - С. 1405-1407.
7. Селеменев В.Ф. Определение воды в ионообменниках методом термического анализа. - / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова, Н.Я. Коренман и др. // Журн. аналит. химии. - 1991. -Т.46, №2. -414-416.
8. Селеменев В.Ф. Межмолекулярные взаимодействия в системе тирозин-анионит АВ-17 / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова, А.Н. Амелин // Журн. физ. химии. - 1991. - Т.65, №4. - С. 996-998.
9. Селеменев В.Ф. Влияние степени сшивки и вида противоиона на гидратацию сульфокатионита КУ-2 / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова, Н.Я. Коренман и др. // Журн. физ. химии. - 1991. - Т.65, №8. - С.2579-2582.
10. Селеменев В.Ф. Особенности гидратации сульфокатионита КУ-2 при сорбции аминокислот / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова, Л.Б. Антаканова и др. // Журн. физ. химии. - 1994. -Т.68, №8. - С. 1512-1514.
11. Котова Д.Л. Особенности кинетики дегидратации сульфокатионообменников, насыщенных аминокислотами / Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев, Т.А. Кравченко / Журн. физ. химии. - 1997. - Т.71, №10. - С. 1854-1857.
12. Котова Д.Л. Равновесные характеристики сорбции фенилаланина на сульфокатионите КУ-2х8 при различных температурах / Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев, Т.А. Крысанова, А.Н. Зяблов / Журн. физ. химии. - 1998. - Т.72, №9.-С.1676-1680.
13. Рожнова О.И. Спектрофотометрическое определение цистеина в водных растворах / О.И. Рожнова, Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев, Т.А. Крысанова // Журн. анал. химии. - 1999. - Т. 54, №12. - С. 1-3.
14. Котова Д.Л. Особенности кинетики взаимодействия сульфокатионообменника с аминокислотой / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, В.Ф. Селеменев // Журн. физ. химии. - 1999. - Т.73, №7. - С. 1316-1318.

15. Крысанова Т.А. Термодинамические функции процесса сорбции ароматических аминокислот Н-формой сульфокатионита КУ-2х8 / Т.А. Крысанова, Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев, О.И. Рожнова // Журн. физ. химии. - 2000. - Т.74, №2. - С.335-337.
16. Котова Д.Л. Термохимические характеристики растворения цистеина в воде / Д.Л. Котова, О.И. Рожнова, В. Ф. Селеменев, Ю.С.Перегудов // Журн. физ. химии. - 2000. - Т.74, №12. - С.2269-2271.
17. Котова Д.Л. Термодинамические характеристики сорбции цистеина на сульфокатионите КУ-2-8 / Д.Л. Котова, О.И. Рожнова, Д.С. Бейлина и др. // Журн. физ. химии. - 2001.- Т.75, №7.- С.1292 - 1294.
18. Котова Д.Л. Гидратационные характеристики сульфокатионита КУ-2-8, насыщенного ароматической аминокислотой / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, Селеменев В.Ф., Д.С. Бейлина // Журн. физ. химии. - 2001.- Т.75, №11. - С. 2016-2020.
19. Котова Д.Л. Влияние межфазного переноса воды на энергию Гиббса сорбции ароматических аминокислот на сульфокатионите КУ-2х8 в Н-форме / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова // Журн. физ. химии. - 2002. - Т.76, №7. -С. 1328-1330.
20. Котова Д.Л. Особенности гидратации алифатических аминокислот / Д.Л. Котова, О.А. Виноградова, Л.М. Калинина // Журн. физ. химии. — 2002. - Т.76, №12. -С. 2247-2250.
21. Zagorodni A.A. Infrared spectroscopy of ion exchange resins: chemical deterioration of the resins / A.A. Zagorodni, D.L. Kotova, V.F. Selemenev // Reactive Functional Polymers. - 2002. - Vol.53. - P. 1157-1171.
22. Котова Д.Л. Энтальпия растворения фенилаланина в воде / Д.Л. Котова, Д.С. Бейлина // Журн. физ. химии, 2003.- Т.77, №4. - С. 672-674.
23. Котова Д.Л. Особенности динамики сорбции цистеина из растворов, содержащих ароматическую аминокислоту / Д.Л. Котова, О.И. Рожнова В.И. Юденко // Журн. физ. химии. - 2003. - Т.77, №1. - С.112-115.
24. Котова Д.Л. Закономерности сорбции фенилаланинина и цистеина на сульфокатионите в растворе в присутствии цвиттерлитов / Д.Л. Котова, Т.А.

- Крысанова, О.И. Рожнова // Журн. физ. химии. - 2003. - Т.77, №7. - С. 1307-1309.
25. Селеменев В.Ф. Хроматография низкого давления физиологически активных веществ / В.Ф. селеменев, Д.Л. Котова, Г.Ю. Орос, А.А. Загородний // Научное изд-ние «100 лет хроматографии». - М.:Наука, 2003. - С.546-569.
26. Котова Д.Л. Термохимические характеристики растворения гистидина / Д.Л. Котова, Д.С. Бейлина, Т.А. Крысанова // Журн. физ. химии. - 2004. - Т.78, №3. - С.458-461.
27. Влияние температуры на равновесие обмена в системе гистидид-сульфокатионообменник КУ-2х8 в Н-форме / Н.В. Домарева, Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова и др. // Журн. физ. химии. - 2004. - Т.78, №9. - С. 1688-1692.
28. Способ очистки L-лизина от сопутствующих компонентов КЖ, элюатов и маточников / В.Ф. Селеменев, Г.Ю. Орос, В.Ю. Хохлов, Д.Л. Котова и др. // Патент на изобретение РФ №2140902. - 1997.
29. Способ разделения тирозина и фенилаланина в водных растворах / Д.Л. Котова, О.Б. Яценко, В.Ф. Селеменев и др. // Патент на изобретение РФ №2214996.-2002.
30. Котова Д.Л. Термический анализ ионообменных материалов / Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев. - М.:Наука, 2002. - 154 с.
31. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот / В.Ф. Селеменев, В.Ю. Хохлов, О.В. Бобрешова, И.В. Аристов, Д.Л. Котова. Изд-во Воронеж, ВГУ- 2002. - 299.

Опубликованы в изданиях соответствующих списку ВАКа (1-20, 22-24,26,27).