УДК 544.72

**Н. А. САНКЕВИЧ, ЛИ СЯО ЦЗИН,
В. В. ЛИТВЯК, С. А. МЕЧКОВСКИЙ**

МЕТОД pK-СПЕКТРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ПРОТОЛИТИЧЕСКИХ И КАТИОНООБМЕННЫХ СВОЙСТВ АМИНОКИСЛОТ

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В ионообменных процессах и процессах комплексообразования в жидких системах оценка энергии межионного взаимодействия затруднена в связи с большими эффектами многочастичных корреляций [1] и прерывисто-ступенчатым характером диссоциации формирующихся структур [2]. Это особенно проявляется при исследовании буферных свойств ион-молекулярных систем, включающих протонодонорные и протоноакцепторные группы различной природы [3]. Метод pK-спектроскопии можно отнести к числу наиболее приемлемых применительно к таким системам, поскольку энергетические характеристики частиц в данном случае определяются не по степени их влияния на электромагнитное излучение, а по изменению химической активности одного из участвующих в обменном процессе компонентов [4]. Установленные на основе ионометрических измерений микроскопические константы равновесия [5, 6] позволяют разрешить многие противоречия в толковании механизмов образования комплексов металлов с полифункциональными лигандами. Особую значимость приобретает функциональная зависимость этих констант от концентрации иона металла, лиганда или величины другого показателя, обладающего свойствами параметра напряженно-деформационного состояния системы [7]. При этом открывается возможность реализации предельных условий конкретного механизма формирования соединения.

К описанию процессов, реализующихся в условиях стехиометрии, применимо уравнение Гендерсона — Хассельбаха — Грегора [8] в форме

$$\mathrm{pH} = \mathrm{pK}_a + n\lg\left[\alpha/(1-\alpha)\right], \qquad (1)$$

где α — степень проработки системы, n — эмпирический коэффициент, характеризующий уровень нелинейности между константой равновесия и величиной α.

Применение метода pK-спектроскопии в исследовании протолитических и донорноакцепторных свойств аминокислот и поликарбоновых кислот представляет безусловный интерес в связи с разнообразием их функций в биологических и технологических процессах [9, 10], обусловленных высокой лабильностью структурных формирований в жидких средах и связанным с этим варьированием энергии химических связей донорно-акцепторной и электростатической природы.

Нами изучены бренстедовские pK-спектры L-гистидина, L-аргинина, аминокапроновой (6-аминогексановой) и цитраконовой кислот. L-аминокислоты вхо-

дят в состав белковых молекул, находят широкое применение в медицине, производстве пищевых продуктов. Аминокапроновая кислота играет важную роль как ингибитор фибролиза в крови и тканях живых организмов, выполняет ряд других важных биологических функций.

В протолитических процессах аминокислоты проявляют многоступенчатость и высокую чувствительность констант равновесия на каждом этапе протонизации-депротонизации к свойствам среды, способным оказывать влияние на состояние всей молекулы. Для ε-аминокапроновой кислоты, например, процесс диссоциации может быть представлен следующим образом:

$$NH_3^+(CH_2)_5COOH \underset{+H^+}{\overset{k_1,\ -H^+}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{цвиттер-ион}}{NH_3^+(CH_2)_5COO^-} \underset{+H^+}{\overset{k_2,\ -H^+}{\rightleftharpoons}} NH_2(CH_2)_5COO^-$$

$$+H^+ \underset{-H^+}{\overset{k_4}{\rightleftarrows}} \qquad\qquad -H^+ \underset{+H^+}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}}$$

$$NH_2(CH_2)_5COOH,$$

где k_1, k_2, k_3 и k_4 — микроскопические константы диссоциации, связанные термодинамическим соотношением: $k_1 \cdot k_3 = k_2 \cdot k_4$.

По результатам ионометрических измерений в традиционном варианте имеется возможность определить только две константы ионизации (K) : $K_1 = k_1 + k_3$ — для карбоксильных групп; $K_2 = k_2 + k_4$ — для аминогрупп. Вместе с тем расчеты, выполненные на основе данных потенциометрического титрования глицина, показывают, что в зависимости от пути ионизации молекулы (изменение pH от кислых значений к щелочным и наоборот) микроскопические константы аминогруппы различаются на два порядка. Изменение ионизации той или иной группы влияет на взаимодействие этой группы с ближайшим окружением, меняя соотношение клатратной и гидратной структур в связанной воде [9]. Взаимное влияние функциональных групп в наибольшей степени проявляется у аминокислот, где группы находятся в непосредственной близости. Особенностями кодируемых аминокислот, составляющих основу биологических процессов в земных условиях, являются их хиральность (L-форма), сочетание явно выраженных основных и кислотных групп, наличие боковых групп с широким диапазоном гидрофильных и гидрофобных свойств, способность к участию в H-связях с молекулами растворителя [9].

Цель данной работы — разработка способов оценки сходства и различия влияния карбоксильных и аминогрупп на свойства сопутствующих функциональных групп. При этом целесообразно провести сопоставление микроскопических констант кислотности аминокислот и бифункциональных карбоксильных кислот. Нами в качестве примера исследованы pK-спектры цитраконовой кислоты на фоне растворов солей металлов, различающихся по величине зарядов катионов и степени жесткости электронных структур.

Объекты исследования выбраны с учетом того, что избирательность взаимодействия металлов с полифункциональными лигандами играет исключительно важную роль как в биологических процессах, так и в решении технологических проблем [9, 10]. Ионы натрия выполняют решающую функцию при регулировании осмотического давления и водно-солевого баланса организма на мембранном и клеточном уровнях.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Потенциометрическое титрование исследуемых образцов кислот проводили при помощи иономера И-130 с использованием стеклянного индикаторного электрода и хлорсеребряного электрода сравнения. Водные растворы кислот готовили по навескам, соответствующим 10^{-3} моль аналита. Фоновые растворы солей металлов в объеме 20 см^3 содержали $2 \cdot 10^{-3}$ моль однозарядного иона металла или $1 \cdot 10^{-3}$ моль двузарядного иона металла. Дозы титранта (0,1 М водный раствор NaOH) составляли 0,5 см^3. Растворы перемешивали с помощью магнитной мешалки. Температуру фиксировали на уровне 20 ± 1 °С, время установления равновесия — 2 мин.

По полученным кривым титрования были построены рК-спектры исследуемых кислот для ионообменных процессов H^+ — Na^+, H^+ — Cs^+, H^+ — Sr^{2+} и H^+ — Cu^{2+}, рассчитаны параметры уравнения Грегора по специально составленному алгоритму линейно-кусочной аппроксимации, по которому на основе величин микроскопических констант кислотности вычислены значения угловых коэффициентов функции Грегора и коэффициенты корелляций полученных зависимостей рК от степени проработки полиэлектролита на каждом участке спектра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены экспериментальные данные, иллюстрирующие характер зависимости угловых коэффициентов функции Грегора для аминокислот и двухосновной карбоновой кислоты от величин микроскопических констант протолитической кислотности при варьировании свойств ионов металлов (величины положительного заряда, радиуса, жесткости), замещающих протон в процессе ионометрического титрования. Общим для этих систем является непостоянство параметров n как функции pK_a. Величина n в десятки раз превышает единицу в интервале изменения показателя протолитической кислотности 2,5—10,5. В наибольшей мере эти эффекты проявляются в области величины pK_a 4—9. Как видно, явление самоорганизации в процессе замещения протона на металл является весьма показательным фактором. Большие отклонения от закона действующих масс могут быть объяснены необычно высоким энергетическим ресурсом протонных барьеров [11] водорастворимых полиэлектролитов в слабокислотной и слабоосновной областях жидкой фазы. В результате самоорганизации структурных единиц системы формируется диффузионный двойной электрический слой, препятствующий замещению протонов на ионы металла. При формировании за счет электростатических и диффузионных сил эти структуры очень динамичны и чувствительны к изменению ионного состава среды.

Для исследуемых систем особую значимость имеет уровень жесткости ионов металла, замещающих протоны. Об этом свидетельствуют качественные различия функций $n = f(\text{pK})$ при обмене Cs^+ — H^+, Sr^{2+} — H^+ и Cu^{2+} — H^+ (рис. 1, *а—в*).

Согласно [12] величины микроконстант равновесия в значительно большей мере отражают специфику ионообменных процессов в сравнении с макроконстантами, поскольку измеренные по электрохимическому показателю величины pK нельзя приписать процессу депротонирования конкретной донорной группы. При этом отщепление протона сопровождается существенной структурной перестройкой формирующегося комплекса. Как показывают результаты выполненных нами экспериментов, роль протонных барьеров при связывании ионов меди аминокислотами многократно ниже в сравнении с теми же процессами для ионов натрия, цезия, стронция. В особенности это отражается на величинах *n* для аминокапроновой кислоты (рис. 1, *в*).

Очевидно, наличие R-боковых групп в молекулах аминокислот существенно снижает контрастность в способности жестких и мягких ионов металлов к замещению протона в аминогруппах. Безусловно, сказывается расстояние между

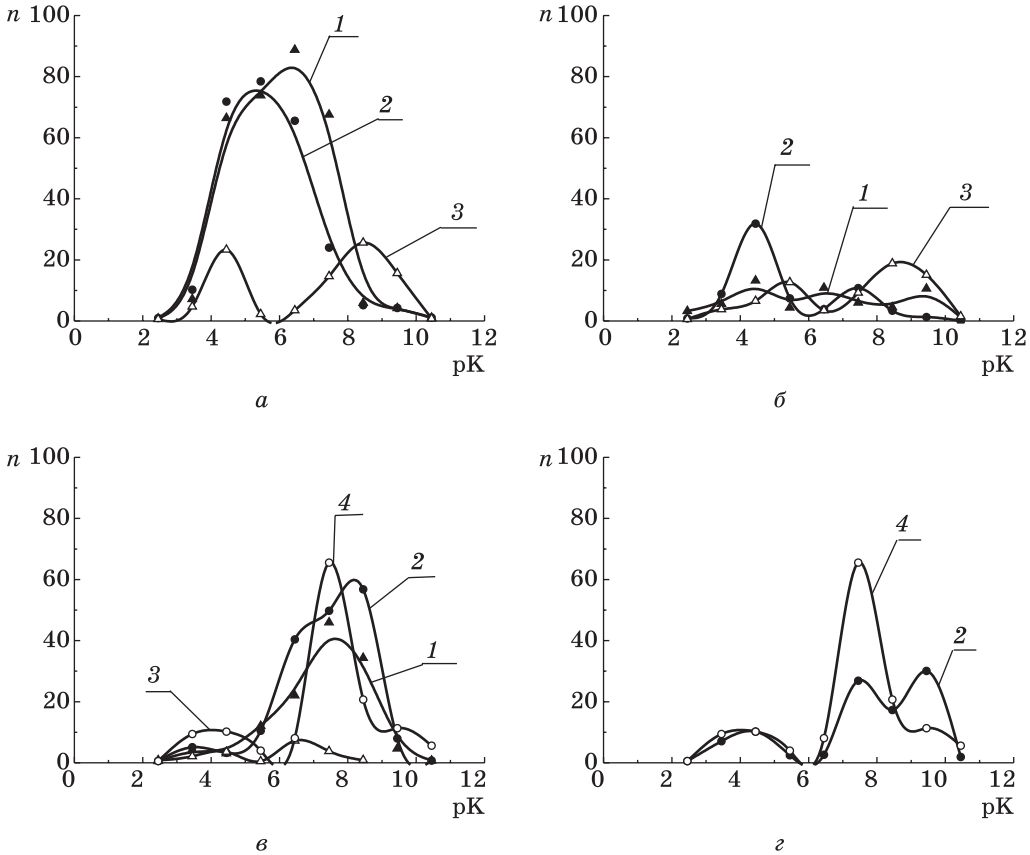

Рис. 1. Угловые коэффициенты функции Грегора в зависимости от pK_a:
а — L-аргинин; *б* — L-гистидин; *в* — аминокапроновая кислота; *г* — цитраконовая кислота.
Фоновый электролит: *1* — Na^+; *2* — Cs^+; *3* — Cu^{2+}; *4* — Sr^{2+}

карбоксильными и аминогруппами в молекулах, приводящее к усилению взаимного влияния в процессе образования комплексов. Существенную роль при этом может играть участие протонодонорных и протоноакцепторных групп в формировании водородных связей как с однородными молекулами, так и с молекулами растворителя.

Как показано в [13], структурные формирования в жидкой воде обладают высокой способностью к передаче дальнодействующей информации, копирующей информационные свойства функциональных групп. По утверждению авторов [1, 14], вода в растворах полиэлектролитов существует в трех разновидностях: 1) первый гидратационный слой функциональных групп и противоионов; 2) слой с нарушенной структурой водородных связей; 3) вода с обычной надмолекулярной структурой, характерной для жидкого состояния. Вода этих разновидностей по-разному проявляет информационные характеристики и способность к участию в процессах самоорганизации, включая формирование протонных барьеров. Последнее в большей мере отражается на процессах обмена «ион металла — протон», что, в свою очередь, определяет характер зависимости показателя n от степени превращения Н-формы аминокислот в ее металл-форму.

Как показывают данные рис. 1, *г*, для бифункциональной карбоновой кислоты так же, как и для аминокислот, характерно немонотонное изменение угловых коэффициентов функции Грегора при увеличении степени замещения протонов функциональных групп на ионы металлов. Это подтверждает исключительно важную роль надмолекулярных структурных образований воды в растворах электролитов.

Данные ионометрического титрования белкового препарата «Туберит», полученного из побочных продуктов переработки картофеля, представлены на рис. 2. Для белковых молекул наблюдается качественное отличие зависимости величины pK_a от степени превращения протонной формы функциональных групп в металл-форму в сравнении с молекулами аминокислот. В начальной стадии замещения иона водорода на ион металла угловые коэффициенты функций (эмпирический коэффициент n) $pK_a = f\left[\lg\left(\alpha/(1-\alpha)\right)\right]$ близки к единице, что соответствует обычному процессу катионного обмена в соответствии с законом действующих масс (поэтому представляется нецелесообразным представление результатов эксперимента в координатах n — pK). Существенное увеличение наклона кривых наблюдается при величинах $\alpha > 0{,}5$, т. е. в области, соответствующей обменному процессу «металл — протон» в аминогруппах. Однако и в этой области величины n не превышают 10. Как видно, в случае белка энергетический ресурс протонных барьеров значительно ниже в сравнении с этим показателем

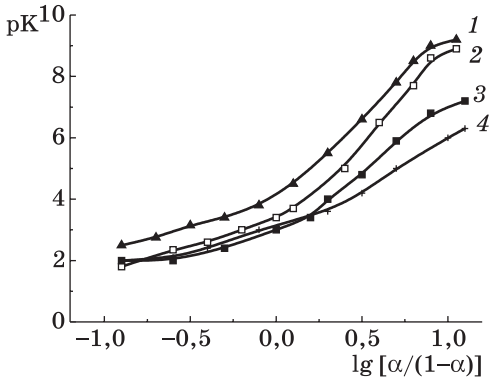

Рис. 2. Функции Грегора для белкового препарата «Туберит». Фоновый электролит: *1* — Na^+; *2* — Ca^{2+}; *3* — Cd^{2+}; *4* — Zn^{2+}

для аминокислот. Наблюдаемое различие правомерно рассматривать как следствие более высокой стабильности водных надмолекулярных структур набухшего белка в сравнении с растворами аминокислот. В этом проявляется и более низкая подвижность полимерных звеньев белка в сравнении с растворами аминокислот.

Как показывают результаты экспериментов, метод pK-спектроскопии можно отнести к числу наиболее перспективных при решении проблем количественной оценки параметров кооперативности и антикооперативности в процессах формирования химических и надмолекулярных соединений при взаимодействии аминокислот и белков с ионами металлов. Эффекты кооперативности обычно относят к структурным изменениям при образовании молекул, а антикооперативность рассматривается как следствие электростатических взаимодействий [15]. Нелинейный характер изменения «эффективных внутренних констант» от степени замещения протонов на ионы металлов существенно осложняет описание равновесий в системах биополимер — металл [12], значимость которых в описании молекулярных, мембранных и клеточных функций биологических объектов не вызывает сомнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лагодзинская Г. В.*, *Юнда Н. Г.*, *Манелис Г. Б.* // Изв. АН. Сер. хим. 2006. № 4. С. 577—601.

2. *Нечипоренко А. П.* // Коллоидная химия в решении проблем охраны окружающей среды. Минск, 1994. С. 31—33.

3. *Долгих О. В.*, *Зуен Ву Тхи*, *Соцкая Н. В.* // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83, № 3. С. 463—467.

4. *Smith D. S.*, *Ferris F. Y.* // Environ. Sci. Technol. 2001. Vol. 35, № 23. P. 4632—4637.

5. *Мечковский С. А.*, *Божко О. В.*, *Вейзе М. А.*, *Карпукович Н. В.* // Выбраныя навуковыя працы БДУ. Мінск, 2001. Т. 5. С. 536—547.

6. *Пинский Д. Л.* // Почвоведение. 1998. № 11. С. 1348—1355.

7. *Зюзин Б. Ф.*, *Терентьев А. А.*, *Галенчик В. П.*, *Савинов Д. А.* // Коллоидная химия в решении проблем окружающей среды. Минск, 1994. С. 84—86.

8. *Лейкин Ю. А.*, *Черкасова Т. А.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т. 4. Вып. 5. С. 625—638.

9. *Шатаева Л. К.*, *Хавинсон В. Х.*, *Ряднова И. Ю.* Пептидная саморегуляция живых систем. СПб. : Наука, 2003. 222 с.

10. *Зацепина Г. Н.* Физические свойства и структура воды. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1998. 184 с.

11. *Цыганов А. Р.*, *Гордеев А. М.*, *Вильдфлуш И. Р.* Биофизические основы рациональных способов внесения минеральных удобрений. Горки : Изд-во Белорусской государственной сельскохозяйственной академии, 2006. 304 с.

12. *Бек М.*, *Надьпал И.* Исследования комплексообразования новейшими методами. М. : Мир. 1989. 414 с.

13. *Дисслер Г. И.*, *Кобзарева С. А.* Поверхностные силы в тонких пленках. М. : Наука, 1973. С. 71—75.

14. *Лук В.* Вода в полимерах. М. : Мир, 1984. С. 50—80.

15. *Кудрев А. Г.* // Журн. аналит. химии. 2001. Т. 56, № 3. С. 256—271.

Поступила в редакцию 29.11.2010.