



В. Ф. Селеменев, Л. В. Рудакова, О. Б. Рудаков,
Н. А. Беланова, А. А. Назарова

ФОСФОЛИПИДЫ НА ФОНЕ ПРИРОДНЫХ МАТРИЦ



ФОСФОЛИПИДЫ НА ФОНЕ ПРИРОДНЫХ МАТРИЦ

Монография



Воронеж
Издательско-полиграфический центр
«Научная книга»
2020

УДК 543.635.4
ББК 24.239.329
Ф81

А в т о р ы:

В. Ф. Селеменев, Л. В. Рудакова, О. Б. Рудаков,
Н. А. Беланова, А. А. Назарова

Р е ц е н з е н т ы:

зав. кафедрой биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный университет»,
д-р биол. наук, профессор В. Г. Артюхов;
зав. кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный университет»,
канд. хим. наук, доц. Т. В. Елисеева

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего
образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной
деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.*

Фосфолипиды на фоне природных матриц : монография /
Ф81 [В. Ф. Селеменев, Л. В. Рудакова, О. Б. Рудаков, Н. А. Беланова,
А. А. Назарова]. – Воронеж : Издательско-полиграфический центр
«Научная книга», 2020. – 318 с. – ISBN 978-5-4446-1492-1. – Текст :
непосредственный.

В монографии обобщены сведения об органических соединениях, относящихся к группе фосфолипидов и других физиологически активных веществ. Рассмотрены физико-химические свойства фосфолипидов, терпенов, стероидов, витаминов, сфинголипидов, гликолипидов и жирных кислот. Представлена взаимосвязь фосфолипидов и вышеперечисленных соединений. Показан механизм изменения свойств фосфолипидов при контакте с ионообменными материалами.

Приведено описание методов выделения и определения фосфолипидов и сопутствующих химических соединений из природных смесей различного состава.

Монография представляет интерес для научных работников химических и биохимических лабораторий, для исследователей, работающих в области спектральных методов анализа, хроматографии, ионного обмена, пищевой технологии.

УДК 543.635.4

ББК 24.239.329

© Селеменев В. Ф., Рудакова Л. В.,
Рудаков О. Б., Беланова Н. А.,
Назарова А. А., 2020

© Оформление.

Издательско-полиграфический центр
«Научная книга», 2020

ISBN 978-5-4446-1492-1

Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ	6
Глава 1. СВОЙСТВА ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ЛИПИДОВ.....	10
1.1. Жирные кислоты	10
1.2. Простые липиды	19
1.3. Терпены	24
1.4. Стероиды	26
1.5. Сфинголипиды.....	28
1.6. Гликолипиды	29
1.7. Жирорастворимые витамины	30
Глава 2. ФОСФОГЛИЦЕРИДЫ (ФОСФОЛИПИДЫ).....	36
Глава 3. ОРГАНИЗОВАННЫЕ СРЕДЫ С УЧАСТИЕМ ФОСФОЛИПИДОВ	45
3.1. Общие сведения о процессах саморегуляции и организованных средах.....	45
3.2. Вторичная структура фосфолипидов.....	47
ГЛАВА 4. СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН И ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ	58
Глава 5. ГИДРАТАЦИЯ ФОСФОЛИПИДОВ	63
Глава 6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОСФОЛИПИДОВ С ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ.....	84
6.1. Электровалентные взаимодействия с участием фосфолипидов	84
6.2. Взаимодействие фосфолипидов с поливалентными ионами металлов	99
6.2.1. Влияние центрального атома на устойчивость комплексов.....	99
6.2.2. Взаимодействие кардиолипина, фосфатидилглицерина и фосфатидилинозитола с ионами переходных металлов.....	104

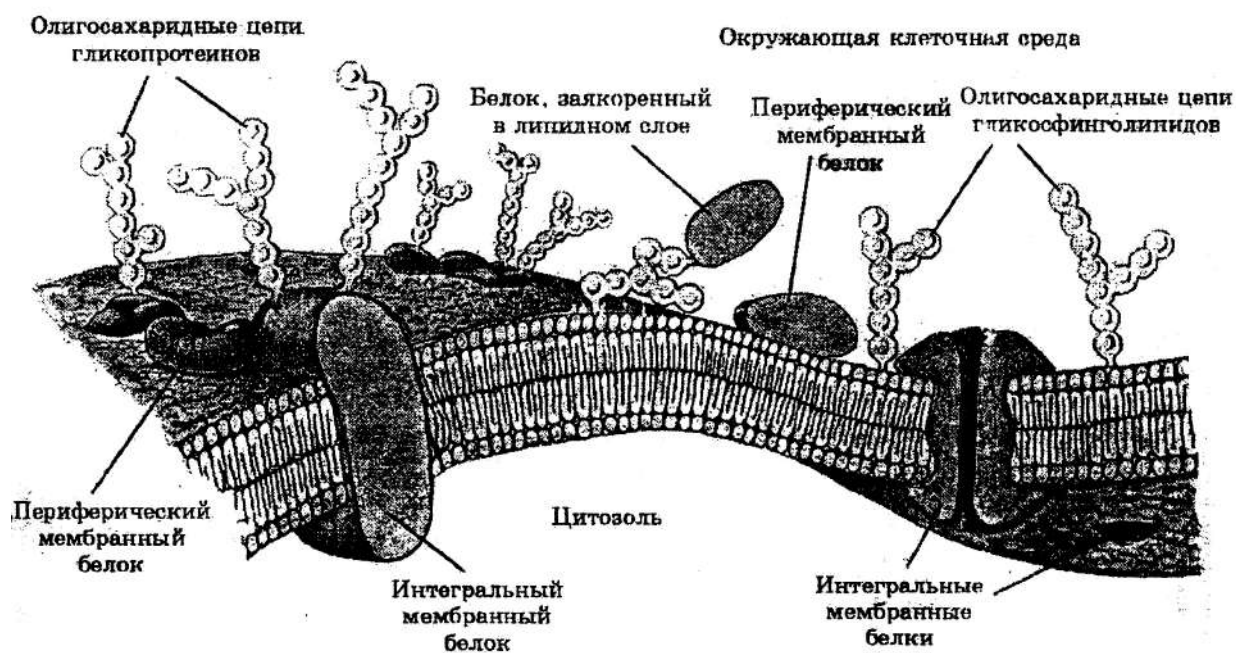
6.2.3. Взаимодействие фосфатидных кислот, фосфатидилглицерофосфата и дифосфоинозотида с ионами переходных металлов.....	109
6.2.4. Взаимодействие фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилхолина с ионами переходных металлов	117
Глава 7. ХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ	126
7.1. Взаимодействия Лондона-Ван-дер-Ваальса в фосфолипидах	130
7.2. Закон действующих масс и выбор стандартного состояния веществ.....	132
7.3. Диполь-дипольные взаимодействия в фосфолипидах.....	143
7.4. Водородные связи в фосфолипидах	150
7.5. Ионы фосфолипидов в водных растворах и биомембранах	162
7.6. Биомембраны – транспортные системы.....	178
7.7. Физиологические функции структурных компонентов фосфолипидов, липопротеидов и биологических мембран	186
Глава 8. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ	218
8.1. Определение сквалена в растительных маслах.....	218
8.2. Выделение фосфолипидных концентратов из семян масличных культур и их исследование методом ТСХ	220
8.3. Выделение фосфолипидного комплекса семян амаранта.....	230
8.4. Выделение и фракционирование фосфолипидов из масла семян амаранта методом колоночной хроматографии.	235
8.5. Сравнение результатов определения сквалена в растительных маслах методом ТСХ и ГЖХ	239

8.6. Расчет коэффициентов распределения углеводов между газовой и конденсированной (пленка модификатора) фазами.....	248
8.7. Метод кондукто- и потенциометрии для определения ацетильных групп и солевых форм свекловичного пектина.....	250
8.8. Определение аминокислот в препарате «Гидролизин» и «Нефрамин»	256
8.9. Хроматографическое разделение и определение аминокислот в мицеллярных и циклодекстриновых фазах.....	261
Глава 9. ХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ И МУЛЬТИСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ.....	274
9.1. Общие сведения о химических и биологических сенсорах.....	274
9.2. Определение глицина и глицил-глицина в водных и спиртовых растворах с применением пьезорезонансного сенсора.....	277
9.3. Определение углеводов в водных растворах с использованием пьезорезонансного сенсора	279
9.4. Экспресс-оценка качества бензинов пьезорезонансными сенсорами.....	282
9.5. Определение глицина в модельных растворах и лекарственном препарате.	285
9.6. Определение степени свежести мяса прудовой рыбы.....	290
Список использованной литературы	293

Предисловие

Объектом рассмотрения монографии являются фосфолипиды. Авторы предлагают начать обсуждение их свойств с известной структуры типичной эукариотической плазматической мембраны, приведенной ниже:

Структура типичной эукариотической плазматической мембраны



Мембрана состоит из двух монослоев фосфолипидов, обращенных друг к другу гидрофобными «хвостами» - остатками жирных кислот. На внешней стороне мембраны зафиксированы белки, заякоренные в липидном слое, а также периферические мембранные белки. Кроме того, со стороны окружающей клеточной среды прикреплены олигосахаридные цепи гликопротеинов и олигосахаридные цепи гликофинголипидов.

Интегральные мембранные белки, находящиеся в самом мембранном слое, обеспечивают транспортные функции для определенных физиологически активных неорганических ионов между окружающей клеточной средой и цитозолем.

К настоящему времени наряду с установлением состава, структуры, свойств фосфолипидов, разработки способов выделения фосфолипидов из масел и получения фосфолипидного концентрата, были определены протекторная, регуляторная, аккумуля-

лятивная, механическая и транспортная функция фосфолипидов. Согласно существующей в молекулярной биологии теории для структуры биологических мембран характерна жидкостно-мозаичная модель, в которой гидрофобные «хвосты» направлены друг к другу и частично перекрываются. Обе поверхности биослоя «сконструированы» гидрофильными головками, что обеспечивает стабильность биослоя в водной среде, поскольку его поверхность легко гидратируется молекулами воды.

Постоянный интерес к проблеме физико-химических и физиологических свойств биологических мембран и входящих в их структуру компонентов отражен в монографии перечнем фамилий исследователей и их публикаций, цитируемых в данном издании.

Авторы монографии считают обоснованным и полезным тот факт, что отдельные разделы посвящены как объяснению ранее не рассматриваемых в литературе реакций и взаимодействий амфипатических липидов и сопутствующих их компонентов, так и обсуждению гипотез, которые в дальнейшем могут быть привлечены к объяснению процессов в системах «физиологически активное вещество – растворитель – сорбент». Последнее непосредственно связано с процессами анализа, выделения, разделения и концентрирования фосфолипидов, пептидов, аминокислот, пектинов, сахаров, жирорастворимых витаминов, сфингомиелинов, неопределенных углеводов, жирных кислот.

В частности, авторы предлагают рассматривать процесс формирования мембранных биослоев как многостадийный процесс, способный к самоорганизации. Началом формирования мембраны в растворе является «спаривание» двух молекул (ионов) фосфолипида (супрамолекулярная реакция). Кроме того, авторы считают обязательным при рассмотрении химических взаимодействий фосфолипидов учитывать наличие четырех гидрофильных группировок и их различия по участию в реакциях протолита (рК функциональных групп). Необычное для ряда исследователей явление, когда при сорбции ионов физиологически активных веществ их коэффициент активности значительно превышает единицу и активность будет больше концентрации, также обсуждается в монографии.

При рассмотрении процессов пересыщения фосфолипидов в сорбентах и фрагментов аминокислот, входящих в их структуру, авторы первостепенное значение отдают наличию водородных связей и туннельных переходов протона.

Взаимодействие фосфолипидов с поливалентными ионами металлов впервые рассматривается на основе классификации электронного строения катионов металлов. Предложена концепция формирования хелатных структур, образованных ионами переходных металлов и ионами фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидных кислот, кардиолипина.

Монография составлена на основе накопленного авторами многолетнего опыта чтения лекций по хроматографическим и сорбционным процессам в Воронежском государственном университете, в Воронежском государственном техническом университете, в Воронежском государственном медицинском университете, а также многолетних научных совместных исследований по общей проблеме «Равновесные и неравновесные процессы с элементами самоорганизации в системах «физиологически активное вещество – растворитель – сорбент при сорбции ФАВ ионитами».

При написании книги авторы ставили перед собой цель изложить материал таким образом, чтобы другие исследователи, аспиранты и студенты могли овладеть хроматографической и биохимической терминологиями, освоить общие приемы по анализу, выделению разделению и концентрированию биологически активных соединений из масел и полупродуктов переработки масел. При подготовке монографии авторы постоянно пользовались трудами таких крупных ученых как А. Ленинджер, И. Хайс, К. Мацек, М. Диксон, Э. Уэбб, Ф. Умланд, А. Янсен, Дж. Пименткл, О.Мак-Клелан, Ф. Гельферих, Л. Оргел, К. Бальхаузен, М. Кейтс, С. Бретшнайдер, И. Тиноко, Х.-Д. Хельтье, Н.Арутюнян, Е. Корнена, Б. Мясоедов, Ю.Золотов, С.Штыков, В. Копылова-Валова, Б. Беленький, В. Даванков, М. Цурюпа, Е. Сумина, С. Дмитренко, В. Артюхов, В. Котов, И. Платонов, Г. Цундель, А. Калач, А. Зяблов, Г. Евтюхин, Г. Лайтинен, В. Паронян, В. Дейнека и другие.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам кафедры аналитической химии ВГУ и НОЦ «Иониты и мембраны» Бутырской Е.В., Васильевой В.И., Елисеевой Т.В., Карпову С.И., Синяевой Л.А., Мироненко Н.В., Котовой Д.Л., Зяблову А.Н., Бабенко Н.К., материал НИР которых послужил основой написания отдельных разделов монографии. Авторы весьма признательны Артюхову В.Г. и Елисеевой Т.В. за ценные критические замечания и труд по рецензированию данной книги.

Авторы будут глубоко признательны читателям за критические замечания и добрые пожелания, которые могут быть существенны для переосмысления и доработки отдельных положений или способов их изложения в монографии, что будет необходимо и весьма полезно при выполнении научных исследований по обсуждаемой проблеме.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Глава 1. Свойства отдельных групп липидов

1.1. Жирные кислоты [1-11, 55, 59, 64-66, 81]

Эти соединения являются «строительными блоками» для нейтральных жиров, гликолипидов, фосфолипидов, эфиров холестерина, некоторых витаминов и восков. Поэтому представляется необходимым рассмотреть основные физико-химические свойства этих кислот. В настоящее время идентифицировано более 100 различных жирных кислот (ЖК) в липидах животных, растений, микроорганизмов. Молекулы их представляют собой длинные углеводородные цепи (гидрофобная часть) с концевой карбоксильной группой (гидрофильная часть). ЖК отличаются степенью их ненасыщенности (могут содержать одну или несколько двойных связей), положением кратных связей в цепи, длиной углеводородных фрагментов (табл. 1.1., рис. 1.1.). Общими свойствами природных ЖК можно считать следующие: содержание, за редкими исключениями, четного числа атомов углерода (от 14 до 24); чаще всего в липидах растений и животных встречаются ЖК с 16 и 18 атомами углерода; содержание ненасыщенных ЖК, как правило, выше, чем насыщенных (такие жиры остаются в жидком состоянии до 5С° и ниже). В липидах высших организмов кратная связь в большинстве случаев находится между 9-м и 10-м углеродом. Если в молекуле присутствует две или большее количество двойных связей, то они разделены почти всегда метиленовой группой $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$. Дополнительные двойные связи чаще встречаются на участке между 10-м атомом С и метильным концом углеводородной цепи, pK_a карбоксильной группы составляет около 4,5-5,0, что нужно учитывать при физиологических исследованиях ($\text{pH}=7,0$), когда ЖК находится в форме аниона. Согласно номенклатуре, IUPAC углерод карбоксильной группы в жирных кислотах именуется С-1, а остальные углеродные атомы нумеруются последовательно, начиная с этой позиции. Среди ненасыщенных ЖК у высших организмов наиболее часто встречаются олеиновая, линолевая, линоленовая, арахидоновая кислоты (табл. 1.1.).

Насыщенные и ненасыщенные ЖК во многом отличаются по своей структурной конфигурации. В насыщенных ЖК наиболее

вероятной конфигурацией является вытянутая симметрическая форма, поскольку она энергетически более выгодна (рис. 1.1). Однако, в принципе, в случае насыщенных ЖК углеводородная цепь способна принимать бесчисленное множество конфигураций, обусловленных полной свободой вращения вокруг одинарных связей [95]. В ненасыщенных кислотах возможность вращения вокруг двойных связей приводит к жесткому изгибу углеводородной цепи. В природных ЖК двойная связь находится в *цис*-конфигурации (рис. 1.1б), создавая изгиб цепи приблизительно под углом 30°. В случае *транс*-формы (редкие жирные кислоты) двойной связи конформация цепи отличается от конформации насыщенных цепей, *цис*-формы менее стабильные, чем *транс*-формы.

Переходы *цис*- в *транс*-форму происходят при высоких температурах при наличии катализаторов. Например, олеиновая кислота легко переводится при нагревании в элаидиновую кислоту, являющуюся *транс*-изомером и имеющую более высокую температуру плавления. Из природных жирных кислот в природе широко распространена только одна жирная кислота в *транс*-форме – вакценовая (табл. 1.1).

Таблица 1.1. Анионы некоторых природных жирных кислот.

Анионная форма кислоты	Наименование ЖК*	Число атомов С	t _{пл} , °С
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COO ⁻	Лауриновая	12	44,2
CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COO ⁻	Миристиновая	14	53,9
CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COO ⁻	Пальмитиновая	16	63,1
CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COO ⁻	Стеариновая	18	69,6
CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COO ⁻	Арахидиновая	20	76,5
CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COO ⁻	Лигноцериновая	24	86,0
CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ CHCOO ⁻	Пальмитолеиновая	16	-0,5
CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CHCOO ⁻	Олеиновая	18	13
CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COO ⁻	Линолевая	18	-9
CH ₃ (CH ₂)(CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COO ⁻	Линоленовая	18	-17
CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COO ⁻	Арахидиновая	20	-49
CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₉ COO ⁻	<i>Транс</i> -вакценовая**	18	44
CH ₃ (CH ₂) ₇ -CH(CH ₃)-(CH ₂) ₈ COO ⁻	Туберкулостеариновая**	19	-

*pK_a кислот в пределах 4,5-5,0;

** Необычные жирные кислоты.

С увеличением длины углеводородного радикала точки плавления жирных кислот повышаются. В качестве примера можно привести точки плавления лауриновой, миристиновой и пальмитиновой кислот (табл.1.1). Вызвано это усилением дисперсионных сил взаимодействия между соседними углеводородными цепями, что требует больших затрат энергии при плавлении. В тоже время эти силы уменьшаются при увеличении количества двойных связей, молекулы ненасыщенных кислот в *цис*-форме сворачиваются по двойным связям, уменьшается их гидродинамический радиус. В связи с этим температуры плавления их снижаются по сравнению с насыщенными аналогами.

Жирные кислоты с длинной цепью практически нерастворимы в воде, но их натриевые и калиевые соли (называемые мылами) образуют в воде мицеллы, стабилизируемые за счет дисперсионных взаимодействий (рис. 1.2). На этой упрощенной схеме указаны возможные пути поведения липидов в системе, указаны возможные пути поведения липидов в системе «гидрофильный - гидрофобный растворитель» (карбоксильные группы обозначены кружками; неполярные фрагменты – зигзагообразными линиями). Мицеллы могут содержать сотни и даже тысячи молекул ЖК.

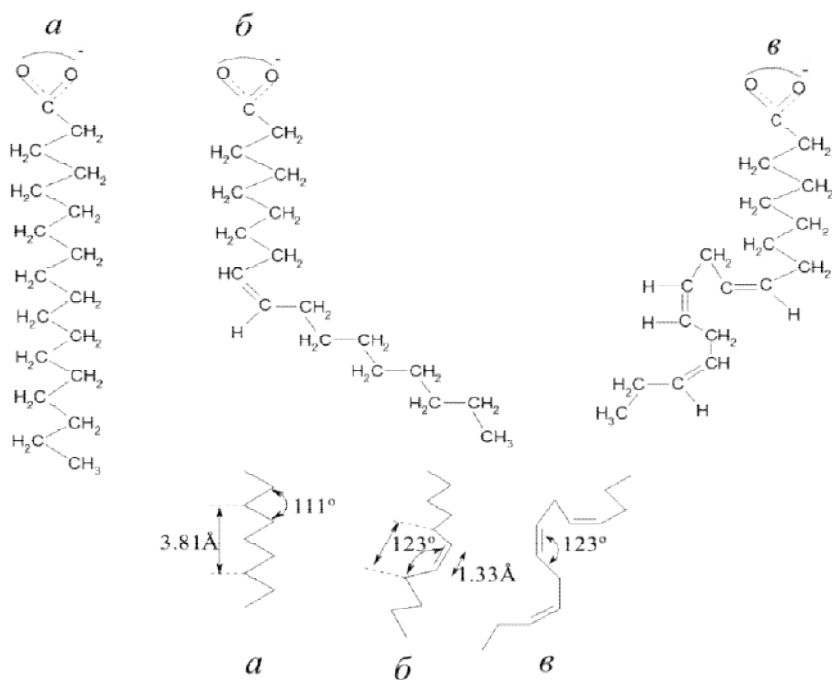


Рис. 1.1. Конфигурация связей: *а* - в стеарате; *б* - в олеате; *в* - в линолеате (*цис*-связи вызывают изгиб фрагментов ненасыщенных ЖК) [1, 55, 95].

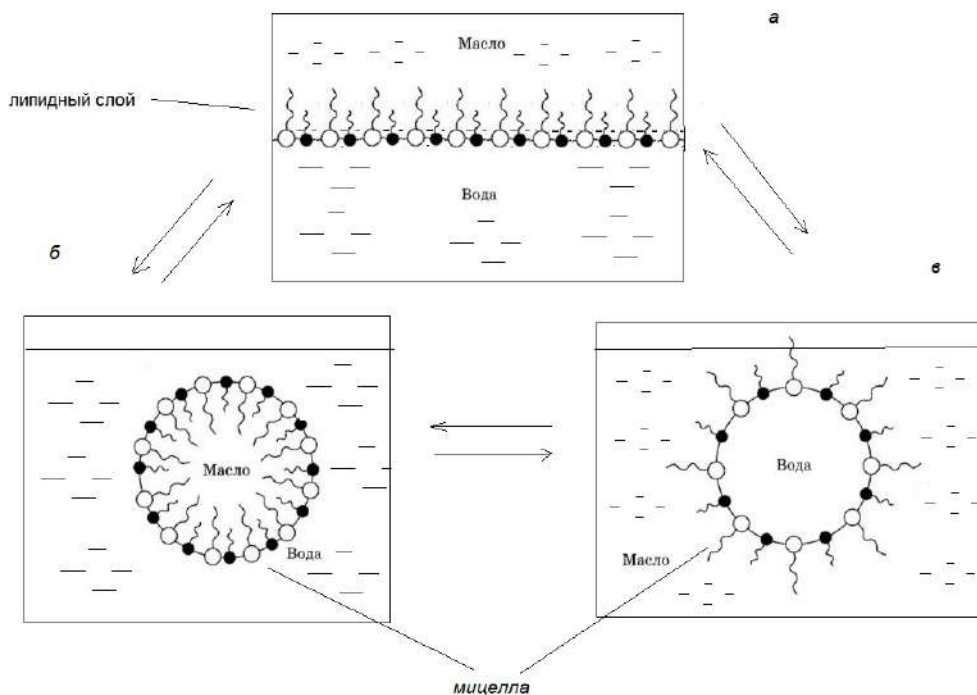


Рис. 1.2. Липидный слой (а) на границе раздела в системе вода-масло; мицелла липида (б) после интенсивного диспергирования в воде и после диспергирования в масле (в). (Упрощенная схема).

Характерное расположение неполярных групп в молекулах, образующих мицеллы, обусловлено тенденцией молекул H_2O к достижению состояния максимальной неупорядоченности (максимальной энтропии). В этом состоянии для воды характерно наличие межмолекулярных взаимодействий за счет Н-связей. Внедрение в воду гидрофобных структур требует затраты энергии, т.к. в этом случае молекулы воды вынуждены расположиться более регулярно, чем в «чистой» H_2O , т.е. иметь меньшую энтропию.

Ненасыщенные ЖК участвуют в реакциях присоединения по двойным связям. Поэтому относительное содержание двойных связей в кислоте можно оценить путем титрования галогенами. Для природных высших ЖК характерны реакции окисления, образования простагландинов, этерификации, образование ангидридов, галогенгидридов, амидов [93-96].

В настоящее время большое внимание исследователей привлекает изучение слабых взаимодействий в химических и биологических объектах (1, 9, 15, 20, 23, 55, 74, 80, 98, 100, 137, 160, 161, 195, 203, 213, 231, 243, 245, 246). Это вызвано тем, что сла-

бые лабильные связи во многих случаях определяют протекание химических и биохимических реакций для ряда реальных природных объектов. Слабые взаимодействия определяются межмолекулярными силами Лондона и Ван-дер-Ваальса (55, 161, 166, 172, 213, 234) и условно подразделяются на дисперсионные, индукционные и ориентационные. Взаимодействия дисперсионного типа «индуцированный диполь – индуцированный диполь» существуют даже между нейтральными молекулами не имеющими постоянных дипольных моментов [160]. Молекула, не имеющая постоянного дипольного момента, может приобрести мгновенный дипольный момент благодаря флуктуации электронного распределения в молекулах. Взаимодействия между такими диполями и индуцированными диполями флуктуаций называются Лондоновскими и они создают всегда силы притяжения между молекулами. Силы Лондона зависят от поляризуемости взаимодействующих молекул (то есть от деформируемости электронных облаков молекул) [160].

Наряду с взаимодействиями Лондона в незаряженных молекулах существуют силы Ван-дер-Ваальса, которые включают взаимодействия: «постоянный диполь – постоянный диполь», (ориентационный эффект); «постоянный диполь – индуцированное дипольное притяжение» (индукционный эффект); стерическое отталкивание [160].

Взаимодействия Лондона – Ван-дер-Ваальса обычно считаются неспецифическими силами, но они могут стать специфическими, когда имеются хорошо подобранные сочетания молекул (действие специфических липидов в мембранах, связь антиген – антигено, связывание ферментом субстрата, сигнальный трансдуктор [55, 160], стекинг – эффекты нуклеиновых оснований в нуклеиновых кислотах [247].

Слабые взаимодействия могут возникать и за счет водородных связей [8, 18, 20, 23, 27, 39, 47, 54, 55, 77-81, 110, 132, 137, 139, 155-170, 213, 232, 246-250], характерной особенностью которых является то, что в них принимает участие атом водорода, уже присоединенный к другому ковалентно связанному атому в молекуле. К числу доступных и эффективных методов, позволяющих обнаружить специфическое участие водородных атомов в Н-

связи по особенностям их колебаний, является ИК-спектроскопия. Жирные кислоты в ИК-спектрах имеют широкую полосу О-Н... не при 3640 см^{-1} , как спирты, а при $\sim 3300\text{-}2500\text{ см}^{-1}$ (ассоциаты молекул). Полоса при $1740\text{-}1700\text{ см}^{-1}$ характерна связям С=О в недиссоциированных группах -COOH [93, 94, 97]. В солях карбоновых кислот проявляются полосы при $1610\text{-}1550\text{ см}^{-1}$ и $1420\text{-}1300\text{ см}^{-1}$, относящиеся к асимметричным (ν_{as}) и симметричным (ν_{s}) валентным колебаниям группы -COO⁻. Колебания СН₂ групп проявляются при $2940\text{-}2915\text{ см}^{-1}$ (ν_{as}) и при $2870\text{-}2845\text{ см}^{-1}$ (ν_{s}), а также в виде группы полос при $1350\text{-}1180\text{ см}^{-1}$. В последнем случае число полос дает сведения о длине углеродной цепи [94, 97] (табл. 1.2). В спектрах ПМР жирных кислот сигнал карбоксильного протона находится в области $\delta=11$ миллионных долей (м.д.) и по сравнению со спиртами смещен на 5,5 м.д. в слабое поле [93, 97].

Из табл. 1.2. следует, что между молекулами карбоновых кислот существует Н-связь. Об этом свидетельствует уменьшение частоты валентных колебаний ν и увеличение частоты деформационных колебаний δ для групп -С=О; -О-Н; -СН₂- [97, 139]. Таким образом, можно предположить, что, помимо образования ассоциатов за счет взаимодействия между карбоксильными группами -COOH, в образовании Н-связей могут принимать участие метиленовые группы -СН₂- углеводородных фрагментов карбоновых кислот. В литературе [139, 251-253] приведены данные о возможности образования подобной водородной связи между хлороформом и пиридином; между молекулами HCN; между молекулами ацетиленовых углеводородов; между С-Н-группами, находящимися в α -положении к карбонильному кислороду, в диоксане, диметилосалате, масляной кислоте [139, 254].

Однако, для высших карбоновых кислот (табл. 1.2) участие -СН₂- групп в образовании Н-связей нами отмечено впервые. Можно полагать, что взаимодействие с карбоксильной группой наиболее предпочтительно будет с близлежащими -СН₂-группами (в положении δ - или γ -атома углерода и кислорода С=О).

Таблица 1.2. Характеристические частоты поглощения групп атомов ЖК [3, 77, 93, 94, 97, 139, 157, 161, 246]

Частоты колебаний ν , см^{-1}			$\Delta\nu$, см^{-1}	Отнесение колебаний
	Стеариновая кислота	Олеиновая кислота		
3010	-	3008	-2	$\nu =\text{CH}$ в $\text{RCH}=\text{CHR}'$ (<i>транс</i>)
2962	2956	-	-6	$\nu_{\text{as}}-\text{CH}_3$
2925	-	2918	-7	$\nu_{\text{as}}^{**}-\text{CH}_2-$
	2911	-	-14	
2853	-	2844	-9	$\nu_s^{**}-\text{CH}_3$; $\nu_s-\text{CH}_2-$
	2843	-	-10	
2726	2686	2674	-40; -52	$\nu -\text{OH}$ в $-\text{COOH}$ (связанная)
1720	1698	1703	-22; -17	$\nu -\text{C}=\text{O}$ в $-\text{COOH}$
1467	1471	1472	4;5	$\delta_{\text{as}}^{*}-\text{CH}_3$; ножничное $-\text{CH}_2-$ в цепи
1421	1431	1433	10;12	δ_{as} ножничное $-\text{CH}_2-$ в цепи
1400	1413	1413	13	$\delta_{\text{as}} -\text{CH}_2-$ рядом с $\text{C}=\text{O}$; CH в $-\text{C}=\text{CH}$
1375	1379	1382	4; 7	$\delta_s-\text{CH}_3$; $\delta -\text{O}-\text{H}$
1300	1312	1316	12; 16	$-\text{CH}_2-$ веерные; $-\text{COOH}$ в димерах
1245-1180	1252-1182	1266-1192	Группа полос	$-\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2-$ маятник. неразветвленная цепь с $-\text{COOH}$ в конце
1125-1120	1104	1104	-21; -21	$\nu -\text{OH}$ с $\text{C}-\text{OH}$ в 5 или 6-членных циклах
935	944;886	953;895	9;18	Широкие полосы неплоских δ в $-\text{OH}$ в COOH
750;720	817;737	817;744	67; 67	$(-\text{CH}_2-)_n$ маятниковые
-	608	612	-	δCH в циклах

* ν и δ – валентные и деформационные колебания;

** as и s – асимметричные и симметричные колебания

При этом образуются 5- или 6-членные циклы, то есть идет процесс хелатизации [138, 139, 210]:

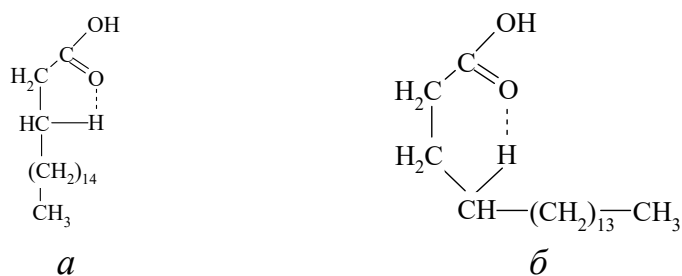


Схема 1.1

На правомерность таких взаимодействий указывают исследования Ж.Ф. Диппи, Р.Т. Арнольда, Л. Спранга, которые установили, что константа протолиза жирных кислот C_4 - C_9 уменьшается не так быстро как для кислот C_2 - C_3 и предположили о наличии внутримолекулярной связи $C-H \cdots O=C<$ с участием γ – атома углерода и $O=C<$ карбоксильной группы. Аналогичные процессы происходят и в ароматических кислотах [139, 251, 252, 255]. Исходя из этого, а так же из того, что 6-членные хелатные циклы очень устойчивы [138], можно полагать предпочтительность структуры б (схема 1.1).

Следует оценить, какие подтверждения в ИК-спектрах соответствуют сказанному выше. Бесспорно, что для метиленовых групп наблюдаются заметные сдвиги ν_{as} в спектрах и стеариновой, и олеиновой кислот (7 и 14 см^{-1} соответственно), а также максимумов при 1431 и 1433 см^{-1} , соответствующих ножничным колебанием CH_2 -групп. Особый интерес вызывает наличие в спектрах ЖК сдвигов для плоскостных (маятниковых) колебаний CH_2 -групп (817 см^{-1}) неплоских колебаний OH в группах $-COOH$ (при 2686 и 2683 см^{-1}) и ν_{OH} в $-C-OH$ – группах с 5-ти или 6-тичленными циклами (1104 см^{-1}) (см. рис. 1.3), кроме того, пики при 608 и 612 см^{-1} условно можно отнести к δ колебаниям $-C-H$ в циклах. Таким образом, наличие в высших ЖК циклических структур с образованием H -связей между метиленовыми группами, находящимися в γ -положении, и карбонильным кислородом в $O=C-OH$ группах, обосновано.

Нельзя отрицать того факта, что $-COOH$ группы могут образовывать не только внутри, но и межмолекулярные водородные связи. Подобную «ассоциацию» можно назвать «смешанной», так как имеет место наличие нескольких групп-доноров и акцепторов протонов [139, 246-248, 256]. В пользу этого говорят пики при 1312 и 1316 см^{-1} , которые можно отнести к колебаниям $-COOH$ в димерах и группу полос в области 1266 - 1182 см^{-1} , характерных маятниковым колебаниям групп $-CH_2-$ с неразветвленной цепью, имеющие на конце карбоксильные группы.

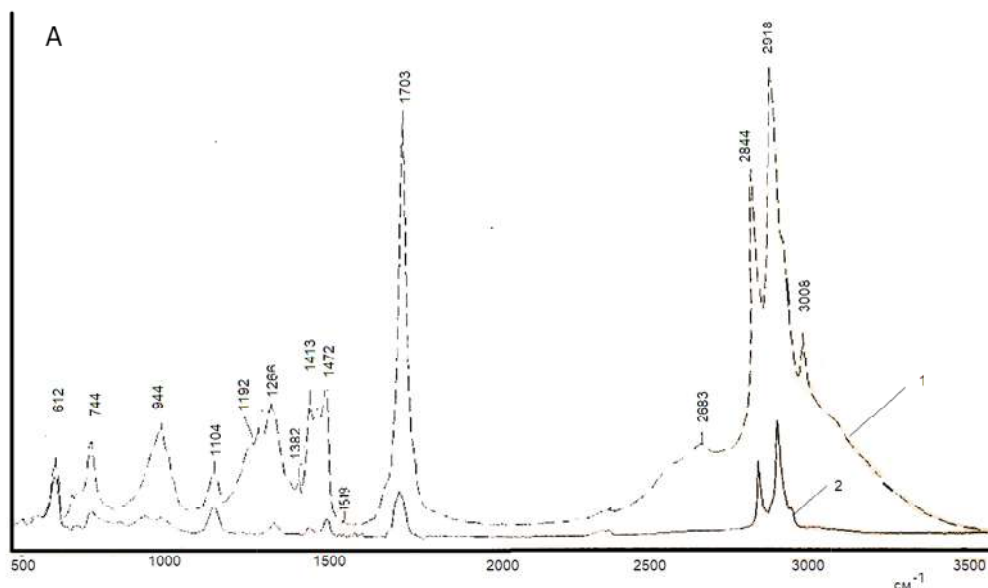


Рис. 1.3. ИК-спектры высших карбоновых кислот на кремниевой пластине в CHCl_3 : 1 – олеиновая кислота; 2 – стеариновая кислота

Межмолекулярные Н-связи между молекулами кислот при этом могут возникать следующим образом:

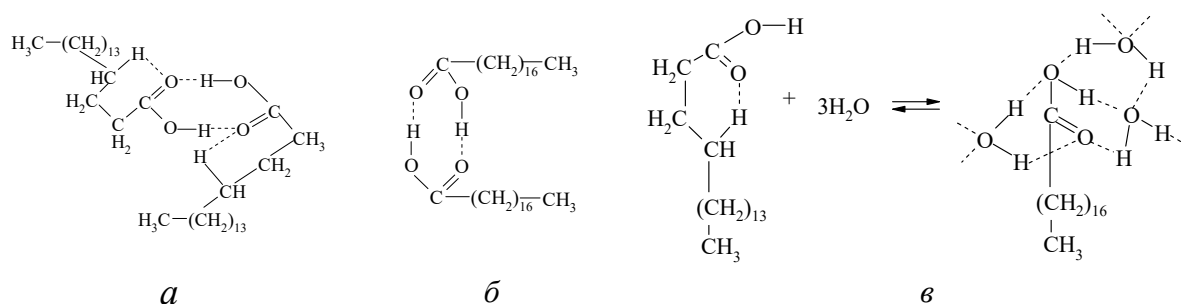


Схема 1.2

В обоих случаях процесс ассоциации может происходить только в случае конформационной перестройки молекул, то есть изменения вращательных моментов [66, 95, 96, 210]. Эти изменения в конформации затруднены, во-первых, большими размерами молекул, а во-вторых, меньшей устойчивостью 8-членных хелатных циклов (по сравнению с 6-членными в схеме 1.1б), следовательно, процессы 1.2а и 1.2б являются равновероятными, а процесс 1.1б – реален, о чем свидетельствуют и литературные данные, и данные ИК-спектроскопии. Квантово-химическое моделирование по программе Гуссиан отдельных фрагментов высших ЖК, которые относятся к объектам супрамолекулярной химии

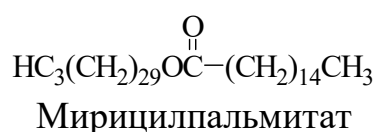
[143, 144], позволило также подтвердить справедливость существования хелатных структур 1.1б и 1.2.

Водородные связи в водных растворах имеют различную энергию, так как существует конкуренция между Н-связями внутримолекулярными (т.е. в самом веществе), Н-связями между молекулами воды и Н-связями «растворенное вещество – вода». В молекулах жирных кислот карбоксильные группы способны с водой образовывать водородные связи, что будет приводить к ослаблению Н-связей между $>C=O \dots H-CH<$ внутри молекулы [77, 258] (см. схему 1.2в). При этом, если E_H (энергия) Н-связи $[C=O \dots H-CH<]$ не превышает 25 кДж/моль, то энергия Н-связей $[H-O-H \dots O=C<]$ достигает величины до 90 кДж/моль, а для $[H-O-H \dots O<^H_H]$ до 40 кДж/моль [77]. Вызвано это не только наличием -COOH групп, но и присутствием углеводородных групп в ЖК, которые приводят к упорядочиванию молекул воды в сетке Н-связей вблизи метильных и метиленовых групп (схема 1.2в). Такое взаимодействие получило название гидрофобного эффекта и проявляется в виде совместного («кластерного») воздействия на структуру воды [160]. Такие гидрофобные (боящиеся воды) взаимодействия играют огромную роль в биологических системах. В частности, полярные молекулы липидов образуют в воде двухслойные полосы (рис. 1.2) или мицеллы, в которых углеводородные «хвосты» спрятаны внутри, а полярные группы расположены на поверхности, подвергаясь воздействию воды [160]. Следует обратить внимание, что понятие «гидрофобное воздействие» не отражает полностью природу межмолекулярных процессов и совместное влияние сил Лондона, Ван-дер-Ваальса и водородных связей.

1.2. Простые липиды [1-7, 55-60, 64, 65]

Простые липиды – это эфиры жирных кислот. Их можно разделить на две группы: нейтральные ацилглицеролы и воски. Воски представляют собой сложные эфиры высокомолекулярных жирных кислот и одноатомных спиртов с длинной углеводородной цепью (схема 1.3.).

Они являются твердыми веществами с ярко выраженными гидрофобными свойствами. Жирные кислоты в них содержат от 24 до 36 углеродных атомов (четное число), а спирты – 16-30 углеродных атомов. Воски образуют защитную смазку на коже, шерсти, перьях, плодах и листьях высших растений. Например, жир овечьей шерсти ланолин является смесью жирно-кислотных эфиров двух стеринов – ланостерина и агностерина: главными компонентами пчелиного воска являются сложные эфиры пальмитиновой кислоты:



Часто в состав восков входят также обычные ЖК и спирты, а также высокомолекулярные кетоны [55].

Нейтральные ацилглицеролы – сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и ЖК (схема 1.3). В зависимости от этого различают моноацил-, диацил- и триацил-глицеролы. Последние встречаются в природе наиболее часто. Среди природных жиров преобладают ненасыщенные триглицериды, причем R-радикалы могут быть остатками различных жирных кислот. Простые ацилглицеролы не содержат ионных групп, являются нейтральными липидами с L-конфигурацией.

Таблица 1.3. Содержание масел в семенах масличных культур [3, 7, 55, 78, 81].

Культура	Содержание	
	Масел, %	Фосфолипидов, %
Подсолнечник	35,0	0,3-0,8
Соя	20,0	1,6-2,9
Хлопчатник	28,2	1,0-1,8
Лен	29,5	0,4-0,8
Арахис	49,0	1,0-2,3
Горчица	32,2	0,8-2,6
Кукуруза	5,3	0,6-1,1
Мак	45,0	1,3-3,2
Рапс	32,0	0,2-0,8
Клещевина	16,8	0,2-0,3
Амарант	5,0-8,0	10,2-13,3

Основной функцией триацилглицеролов является запасание и хранение энергии и углерода, поэтому они – важнейшие компоненты пищевых продуктов. Триацилглицеролы, имеющие жидкую консистенцию именуют маслами, а твердую – жирами. Жиры, как правило, содержат остатки насыщенных жирных кислот и содержатся в животных тканях. Масла содержат в основном остатки ненасыщенных кислот и присутствуют в плодах и семенах растений. Семена перечисленных культур в табл. 1.3. используются в масложировой промышленности для получения пищевых масел.

На схеме 1.3 приведены структуры восков (а) и глицеролов с ацильными группами: б) 1-ацил-L-глицерол; в) 1,3-диацил-L-глицерол; г) триацил-L-глицерол.

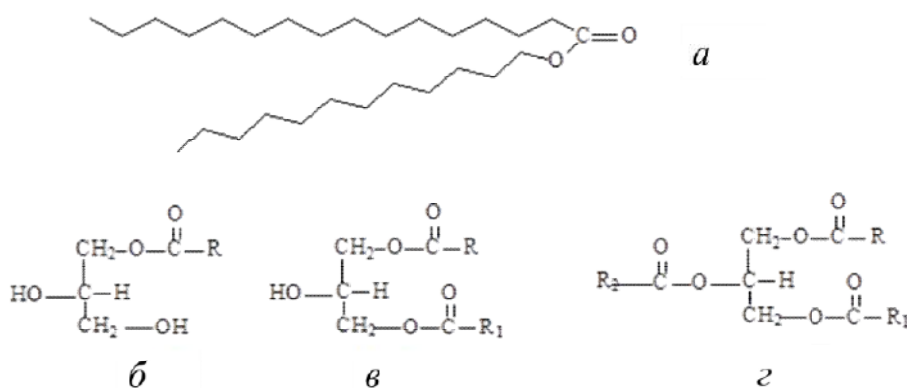


Схема 1.3

На схеме 1.4 приведен пример образования простагландина (б) из ненасыщенной 8, 11, 14-эйкозантириеновой кислоты путем замыкания циклопентадиенового цикла в середине цепи. Простагландины – модуляторы гормональной активности (в частности понижают кровяное давление).

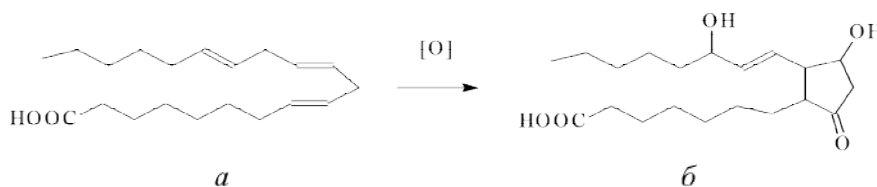


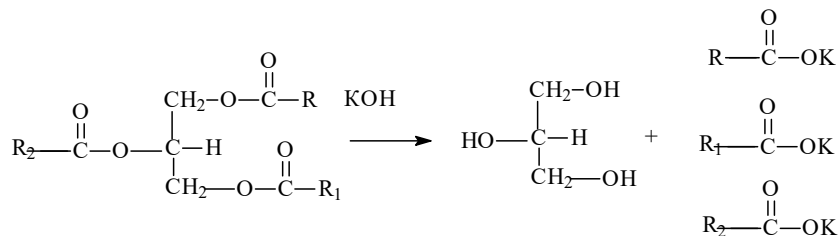
Схема 1.4

В большинстве масел содержание простых и смешанных триацилглицеролов подчиняется так называемому правилу максимальной разности. В соответствии с этим правилом в состав

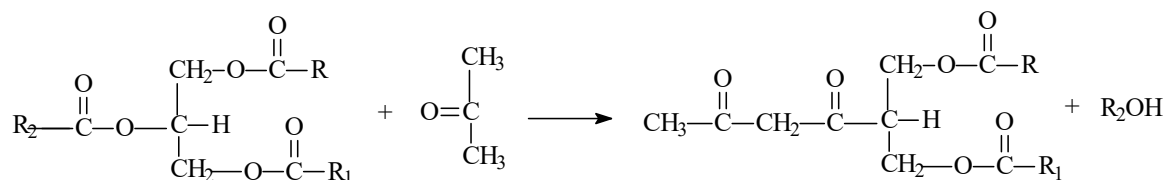
масел и жиров входят преимущественно смешанные триацилглицеролы, в состав молекул которых входят три разные ЖК. У таких триацилглицеролов число разных молекулярных форм (стереоизомеров) равно 18. Молекулы триацилглицеролов, содержащие две разные по природе кислоты, присутствуют в меньших количествах. С глицерином они могут быть связаны в виде 6 стереоизометров. Молекулы триацилглицеролов, содержащих только кислоту одного вида, присутствуют в маслах и жирах в наименьшем количестве. Следует отметить, что у второй гидроксильной группы глицерина наиболее вероятно присоединение ненасыщенных ЖК.

По способности высыхать на воздухе масла подразделяются на высыхающие (конопляное, льняное), полувсыхающие (кукурузное, хлопковое, соевое, арахисовое, подсолнечное, рапсовое), невысыхающие (касторовое, миндальное, оливковое). Это свойство масел как раз и определяется их кислотным составом. Высыхающие масла содержат большое количество линоленовой кислоты; в состав полувсыхающих масел входит большое количество линолевой и олеиновой кислот; невысыхающие масла в основном представлены триацилглицеролами олеиновой, рицинолеиновой и насыщенных ЖК, содержание которых в маслах невелико (10-15%), однако в некоторых из них (хлопковое, арахисовое, рапсовое) оно может достигать 20%.

Триацилглицеролы способны вступать во все химические реакции, характерные сложным эфирам. Наибольшее значение имеет реакция омыления. В результате этого процесса образуются жирные кислоты и глицерин:



Взаимодействие триацилглицеролов с кетонами приводит к образованию 1,3-дикетонных групп [93, 95]:



Простые липиды при сильном перемешивании с водой образуют эмульсии, которые нестойки и быстро разделяются на два слоя – жир и воду. Для получения стойких эмульсий (рис. 1.2 б, в) Необходимо присутствие третьего вещества –эмульгатора, легко абсорбирующегося на поверхности раздела двух фаз. Молекула эмульгатора состоит из углеводородной цепи (гидрофобный фрагмент) и полярной или ионной группы (гидрофильный фрагмент) (амфипатическая структура). При взбалтывании масла с водой в присутствии эмульгатора (мыла, фосфатидов, белков, синтетических ПАВ) на поверхности мицелл (рис. 1.2.) появляется тончайшая пленка, состоящая из адсорбированных молекул эмульгатора, гидрофобный конец которых погружен в масло, а гидрофильная часть – в водную фазу. Эмульсия в этом случае приобретает свойства стабильности. Сами мицеллы в настоящее время рассматриваются как микрореакторы, в которых на нано-уровне происходят химические и биохимические процессы [80, 98-101]. Устойчивость мицелл объясняется снижением поверхностного натяжения на поверхности капли воды (рис. 1.2 б), создает непрерывный переход от капли жира к водной фазе (и наоборот), что препятствует слиянию мицелл друг с другом.

Эмульгирование – важнейший этап в физиологических процессах при всасывании и усвоении организмом жиров, при образовании и функционировании биомембран. Эмульсии широко используются в пищевой промышленности, мыловарении, при производстве косметических средств, растительных пигментов, в тонкослойной мицеллярной хроматографии (ТСХ).

Химия липидов до недавнего времени считалась малоинтересной и очень запутанной областью. Связано это было с отсутствием эффективных методов выделения, концентрирования и разделения липоидных физиологически активных (ФАВ) веществ. Однако с усовершенствованием хроматографических методик и приборов открылись возможности для тонкого разделе-

ния и анализа липидов, понимания новых (до сих пор малоизвестных) функций, выполняемых в организме этим классом органических веществ [1-23].

Известно несколько классов и подклассов липидов: жирные кислоты, ацилглицерины (нейтральные жиры), фосфоглицериды, гликолипиды и сфинголипиды, некоторые воска, эфиры холестерина, терпены, жирорастворимые витамины. В каждом из них имеется ряд молекулярных форм, различающихся как природой остатков жирных кислот, так и наличием различных полярных (гидрофильных) групп. В организме липиды выполняют, по-видимому, четыре основные функции [1-3]: 1) они служат структурными компонентами мембран; 2) служат своеобразным депо, в котором накапливаются запасы метаболического топлива; 3) могут выступать в качестве «переносчиков» этого топлива; 4) выполняют защитную роль (в листьях высших растений, в клеточных стенках бактерий, в коже позвоночных, в наружном скелете насекомых). Некоторые вещества, относимые к липидам, обладают высокой биологической активностью (фосфолипиды, витамины А, D, E, K, простагландины, липопротеиды).

Следует отметить, что большинство липидов может быть выделено из структур живых клеток путем экстрагирования неполярными растворителями (эфирами, хлороформом, бензолом и его гомологами) [3-7]. Однако, дальнейшее их фракционирование невозможно без хроматографических методов [8-54]. Для более глубоких исследований липидов необходимо также использовать современные спектральные методы анализа (УФ-спектрофотометрии, ИК-спектроскопии, ЯМР- и масс-спектрометрии), а также методы квантово-химического моделирования. Кратко представим свойства и некоторые характеристики классов (подклассов) липидов.

1.3. Терпены [1, 4, 17, 32, 48, 55, 64, 73, 75]

К числу липидных компонентов, имеющих в клетках, принадлежат терпены, молекулы которых построены из фрагментов пятиуглеродного углеводорода изопрена (2-метил-1,3-бутадиена). Терпены с двумя изопреновыми группировками называются монотерпенами; три группировки – сесквитерпенами; 4, 6 и 8 – ди-

терпенами, тритерпенами и тетратерпенами. Молекулы терпенов имеют и линейное, и циклическое строение (или их сочетание в одной молекуле). Двойные связи в линейных сегментах у большинства терпенов находятся в устойчивой *транс*-конфигурации. Однако, в некоторых терпеноидах, например, в витамине А и в каротиноидах (см. ниже в разделе 1.7), отдельные двойные связи имеют *цис*-строение.

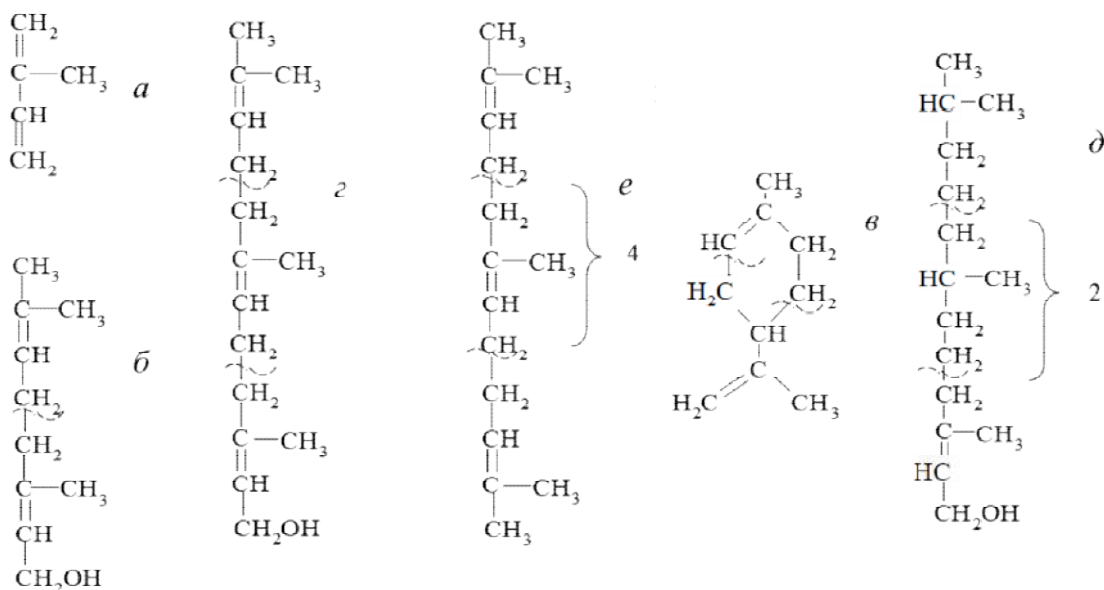


Схема 1.5

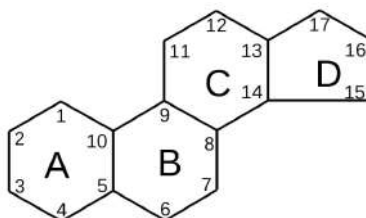
Молекулы терпенов могут иметь расположение изопреновых «блоков» по типу «голова к хвосту» (в редких случаях «хвост к хвосту») (схема 1.4): а) изопрен; б) гераниол; в) лимонен; г) фарнезол; д) фитол; е) сквален. Штриховые линии означают «разделение» изопреновых единиц, цифры у фигурных скобок показывают число изопреновых единиц в линейной структуре.

В растениях обнаружено большое число моно- и сесквитерпенов, которые придают аромат растениям и служат главными компонентами «душистых масел», получаемых из растений. Моно-терпены – гераниол, лимонен, ментол, пинен, камфора и карвон, являются главными компонентами гераниевого, лимонного, мятного, скипидарного, камфорного, тминного масел. Фарнезол – типичный представитель сесквитерпенов. Представителем дитерпенов является фитол (линейный терпеноидный спирт – один из компонентов фотосинтетического пигмента хлорофилла и вита-

мина А). Тритерпенами являются сквален и ланостерин – предшественники при биосинтезе холестерина. Из других высших терпенов необходимо выделить каротиноиды, принадлежащие к группе тетратерпенов.

1.4. Стероиды [1, 3, 55, 65, 76, 78, 93-95]

Среди природных стероидов, которые содержат в своем составе фенантреновые группировки, можно отметить желчные кислоты, гормоны надпочечников, мужские и женские половые гормоны, а также некоторые стероиды с необычайно высокой биологической активностью, являющиеся ядами. Все эти соединения относятся к производным пергидроциклопентанфенантренового ядра, содержащего три конденсированных циклогексано-вых кольца:



Пергидроциклопентанфенантреновое зерно

В клетках стероиды присутствуют в следовых количествах, но их представители – стерины, содержатся в клеточных структурах в значительных количествах. Стерины имеют разветвленную алифатическую цепь из восьми и более атомов углерода при С-17, а также спиртовую (гидросильную) группу у С-3. Они существуют в виде свободных спиртов, а также в виде эфиров, у которых гидроксильная группа при С-3 этерифицирована жирной кислотой с длинной цепью. Следует отметить наличие метильных групп у С-10 и С-13 и восьмиуглеродную часть цепи у С-17.

На схеме 1.6 представлены структуры некоторых стероидов: холестерина (а), эфира холестерина (б), тестостерона – стероидного мужского гормона (в), холата натрия – желчной соли (г), стигмастерола – растительного стерола (д).

Стероиды в настоящее время классифицируются как полипре-ноловые (изопреновые) соединения (схема 1.6). Наиболее распространенный стерин животных тканей – холестерин (холесте-

роль). Несмотря на то, что холестерол играет существенную роль в развитии сердечнососудистых заболеваний, считается положительным фактом способность его при смешивании с глицеридами и фосфооридами поглощать воду. Холестерол, синтезируемый в клетках млекопитающих, это не только компонент различных мембран, но и предшественник стероидных гормонов (тестостерон, эстрадиол, альдестерол) и солей желчных кислот (схема 1.6).

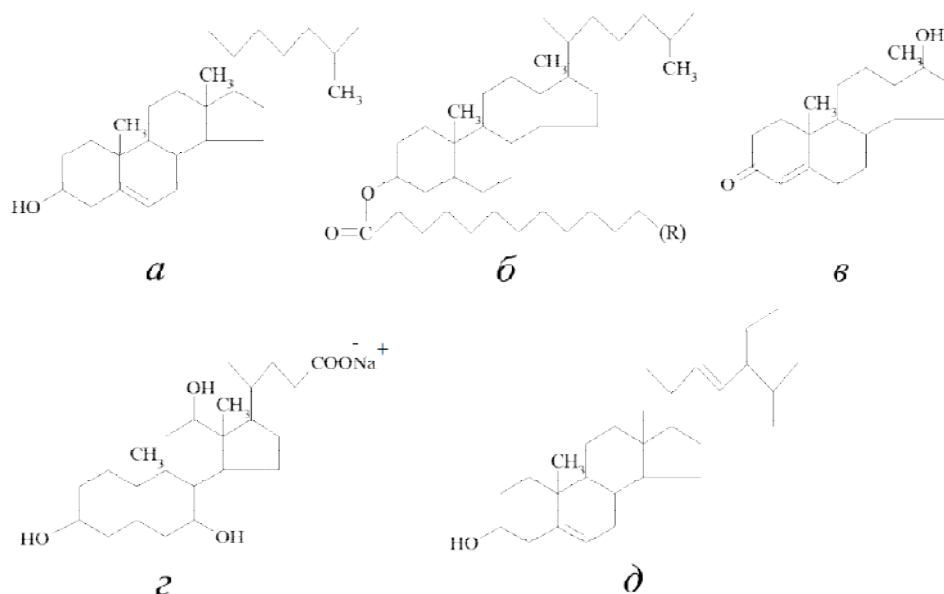


Схема 1.6

Единственной гидрофильной составляющей холестерола является группа у атома С-3. В связи с этим максимальная растворимость холестерола в воде – 10^{-8} моль/л. Эфиры холестерола (более гидрофобные по сравнению с самим холестеролом) обнаружены в липопротеинах крови, которые выступают как депо хранения холестерола.

Холестерол в растениях не обнаружен, но в них имеются другие стеринны, называемые фитостеринами. К ним относятся ситостеринны и стигмастерол (схема 1.6 д). В дрожжах и мицелиальных грибах содержатся микостеринны, например, эргостерин, который под действием УФ-света превращается в витамин D. Необходимо отметить, что в отличие от ацилглицеролов и восков, относящихся к омыляемым, терпены и стероиды принадлежат к неомыляемым липидам.

1.5. Сфинголипиды [1, 55, 64, 75, 76, 93-96]

Сфинголипиды также как ацилглицеролы и воска относятся к омыляемым липидам. Они являются амфиопатическими липидами и содержатся как в мембранах животных, так и в растительных мембранах. На схеме 1.7 представлены структурные формулы сфингозина (а), *транс*-4-сфингозина; церамида, имеющего ацильную длинноцепочечную группу у аминогруппы сфингозина (б); галактоцереброзида [штрихами обозначен фрагмент сфингозина (в)], сфингомиелина [штрихами обозначен остаток фосфатидилохолина (г)]; ганглиозида G_{M2} [штрихами выделена N-ацетилнейраминовая кислота (д)].

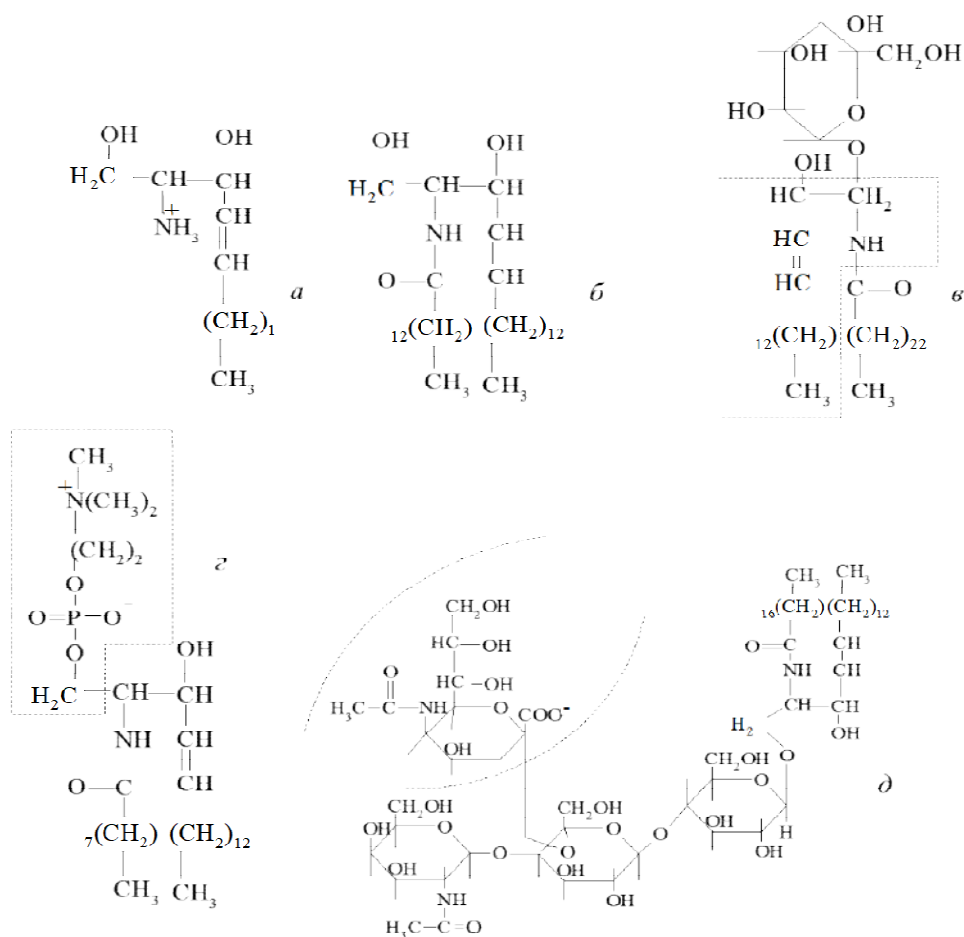


Схема 1.7

Каркасом структуры сфинголипидов является *транс*-4-сфингенин (сфингозин) (схема 1.7 а). Его можно именовать как эритро-2-амино- Δ^4 -(*транс*)-октадецен-1,3-диол. Группы -ОН и -NH₂ находятся в *цис*-положении (как в эритрите). При расщепле-

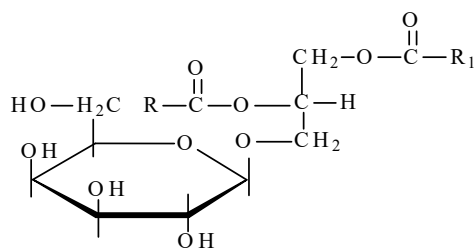
нии из него получается L-серин, следовательно, связанный с аминогруппой асимметрический атом С сфингозида имеет такую же конфигурацию, как и L-С-атомы у L-α-аминокарбоновых кислот. Сфингозин состоит из двух фрагментов – гидрофильной части и гидрофильного «хвоста».

Церамид (схема 1.7 б) содержит жирную кислоту, соединенную с аминогруппой при С-2 сфингозида амидной связью. Церамиды являются метаболическими предшественниками всех сфинголипидов. Выделяют в группе сфинголипидов цереброзиды – гликосфинголипиды, содержащие один моносахаридный остаток, присоединенный через β-гликозидную связь к атому С-1 церамида (схема 1.7 в). Полярной группой у галактоцереброзидов выступает β-галактозильный остаток. Галактоцереброзиды распространены в тканях нервных клеток и составляют около 15% липидов миелиновых оболочек.

Отличительной особенностью сфингомиелинов является наличие в них группы холина (схема 1.7 г). Они представляют собой сложные эфиры, включающие жирную кислоту, холин, фосфорную кислоту и сфингозин. Конформационно сфингомиелины весьма сходны с фосфоглицеридами, а именно, в нашем случае с фосфатидилхолином (глава 2). Оба этих соединения способны существовать в биполярной форме; содержат фосфат, холин и две алифатических цепочки.

1.6. Гликолипиды [1, 55, 64, 75, 76, 93-96]

Большой класс гликолипидов составляют ганглиозиды. К гликолипидам можно отнести и рассмотренную выше группу цереброзидов, содержащих группировку сахара. Среди гликолипидов наиболее широко распространены галактозилдиацилглицеролы:



Галактозилдиацилглицерол

Эти соединения содержатся в различных растительных тканях. Обнаружены они в митохондриях, хлоропластах, локализованы в мембранах, в некоторых водорослях. Упомянутые гликолипиды (ганглиозиды) – сложные, богатые углеводами липиды с олигосахаридными фрагментами. В структурном отношении ганглиозиды сходны с цереброзидами с той разницей, что вместо галактозы они имеют в своем составе сложные олигосахариды. Кроме того, олигосахаридные фрагменты содержат N-ацетилнейралиновую кислоту. Вследствие этого, карбоксильная группа может депротонироваться, а ганглиозиды будут находиться в анионной форме. Метаболизм ганглиозидов в настоящее время – сфера активных медицинских исследований. Установлено, что состав мембранных гликолипидов сильно меняется при развитии злокачественных опухолей.

1.7. Жирорастворимые витамины [1, 55, 64, 75, 76, 93-96]

Витамины – низкомолекулярные пищевые вещества различной химической природы. Организму они требуются в ничтожно малых количествах. Человеческий организм не синтезирует витамины или синтезирует их в небольшом количестве. Витамины не являются пластическими веществами (каковыми считаются полиненасыщенные жирные кислоты, незаменимые аминокислоты) или источником энергии. Они участвуют в обмене веществ не как субстраты биохимических реакций, а как участники процессов биокатализа и регуляции этих реакций. Витамины часто входят в состав коферментов, необходимых для функционирования биологических катализаторов (ферментов). Открытие витаминов принадлежит российскому ученому Н.И. Лунину. В настоящее время известно около двух десятков витаминов. Они подразделяются на две группы: водорастворимые и жирорастворимые.

К числу жирорастворимых витаминов принадлежат витамины А, Е, К и D. Витамины вообще-то не так просты, как кажется, и как их хотят представить некоторые ученые, связанные с производителями и распространителями поливитаминных комплексов. К примеру, они предпочитают говорить о витаминах вообще – витамине Е, витамине К, витамине А. В природных источниках эти витамины присутствуют в очень малых количествах. Они

имеют одну общую особенность: построены жирорастворимые витамины из фрагментов изопреноидного типа (подобно терпенам и стероидам). Витамин А содержится только в животных тканях. Растения лишены этого витамина, однако они содержат группу веществ, которые служат предшественниками этого витамина у млекопитающих.

Источниками витамина А являются яичный желток, сливочное масло, печень, особенно некоторых рыб (треска, морской окунь) и морских животных (тюлень, кит, морж). Витамин А существует в виде двух витамеров (форм) A_1 и A_2 (ретинол₁ и ретинол₂). Они представляют собой спирты, содержащие боковую цепь из двух изопреновых единиц, к которой присоединено шестичленное алициклическое кольцо (в кольце A_2 на одну двойную связь больше, чем у A_1). Таким образом витамин А можно характеризовать как монотерпен относительно боковой цепи, но фактически ретинол является (с учетом цикла) дитерпеном, содержащим во всей молекуле 4 изопреновых группировки.

В растительных пищевых продуктах (моркови, салате, шпинате, щавеле, зеленом луке, красном перце, тыкве, чернике, черной смородине, черноплодной рябине, крыжовнике, абрикосе, персике и др.) содержится каротиноидные пигменты, имеющие вдвое больший молекулярный вес, чем ретинол (α -, β -, γ -каротины) (схема 1.8). На схеме 1.8 формула а) витамин A_1 ; б) каротин- β (двойной штриховкой указана точка окисления и превращения в витамин A_1); в); витамин Е; г); витамин K_1 ; д) витамин K_2 .

При окислительном распаде этих пигментов в животных тканях образуется витамин А. Недостаток витамина А в организме ведет к нарушению роста и к развитию ксерофтальмии. У человека ранним симптомом недостаточности ретинола является «куриная слепота», при которой нарушается нормальная функция палочек сетчатки (зрительных рецепторов, чувствительных к сумеречному свету). Суточная профилактическая доза для взрослого человека – 1,5 мг (5000 МЕ, - т.е. 1 мг витамина А соответствует 3300 МЕ).

Под названием «витамин Е» известны восемь различных соединений (витамеров), близких по химической природе и биологической активности, которые получили название «токоферолы».

результате отрыва атома водорода от гидроксильной группы. Такие радикалы, вступая во взаимодействие со свободными радикалами, участвующими в образовании органических пероксидов, предотвращают окисление ненасыщенных липидов. Витамин Е участвует в биосинтезе гемма, белков, в тканевом дыхании, пролиферации клеток и других процессах клеточного метаболизма. Токоферолы в настоящее время нашли применение в комплексной терапии сердечнососудистых заболеваний, глазных болезней, для подавления побочных реакций при химиотерапии [76, 102]. В комплексной терапии сердечнососудистых, глазных и других заболеваний дают внутрь по 0,05-0,10 г. витамина Е 1-2 раза в сутки курсами по 1-2-3 недели.

Витамин К открыли в 1929 году, его называют противогеморрагическим (коагуляционным) витамином, т.к. он способствует нормальному свертыванию крови. И лишь в 1997 году научное сообщество согласилось признать тот факт, что витамин К важен еще и для здоровья костной ткани.

Установлено, что он работает в организме в комплексе с еще двумя витаминами А и D, выполняя роль своеобразного регулятора. Витамин К регулирует поступление Ca^{2+} к тому месту, где он должен быть, и уводит оттуда, где его быть не должно. Это очень важный для здоровья фактор, так как этот элемент в виде иона делает прочным ткань зубов и костную ткань, испытывающих сильные механические нагрузки. Удивительно, что Ca^{2+} при содействии витаминов А, D, К аналогичным образом придает дополнительную жесткость и стенкам кровеносных сосудов. В данном случае выполняется один из философских принципов, - закон единства и борьбы противоположностей, - в случае костей накопление ионов Ca^{2+} полезно, а появление этих ионов вредит эластичности сосудов. Происходит такой процесс по всей длине стенки сосуда с образованием плотных холестериновых бляшек. В результате просвет сосуда сужается, а его стенка разрушается. Следует отметить, что этот эффект воздействия витамина К пока не нашел широкого обсуждения в научных кругах, хотя важность его очевидна. Ведь сужение сосудов, образование тромбов, разрыв сосудов – это внутренние кровоизлияния, инсульты и инфаркты.

Подобно витамину Е, витамин К состоит из смеси нескольких витаминов, главные из которых К₁ и К₂. Поскольку первого в продуктах обычно на порядок больше, то в изучении отдали предпочтение именно ему, а свойства К₂ серьезно не исследовали. Однако оказалось, что все полезные свойства (дополнительно к свертыванию крови) связаны исключительно с витамином К₂. К₁ в этом отношении полный пассив. Между тем весь XX век медики и диетологи делали все возможное, чтобы изгнать витамин К₂ из нашего питания. Каким образом? Витамин К₁ содержится в зеленых листовых веществах (шпинате, капусте, салате, зеленых томатах, люцерне), а также в плодах шиповника, в хвое, в злаках. А вот К₂ в них мало, он синтезируется в организме животных и птиц, питающихся травами, плодами, злаками. По сути дела, К₁ (филлохинон) в организме животных является полупродуктом, из которого синтезируется К₂ (менахинон). Фактически мы имеем дело с двумя разными витаминами и пришло время рассматривать их именно таким образом. Так как витамин К₂ жирорастворимый, он накапливался в жире животных, а также молоке и во всех продуктах, которые из него делают (табл. 1.4).

Таблица 1.4. Содержание витамина К₂ в продуктах.

№ п/п	Продукт	Содержание К ₂ (мкг в 100 г)
1	Молоко и мясо обезжиренные	0
2	Яичный белок	0,4
3	Лосось	0,5
4	Молоко 2% жирности	0,5
5	Цельное молоко 3,5-4% жирности	1,0
6	Капуста квашеная	4,8
7	Печень телячья	5,0
8	Бекон	5,6
9	Фарш говяжий	8,1
10	Ножка куриная	8,5
11	Грудка куриная	8,9
12	Колбаса «Салями»	9,0
13	Печень куриная	14,1
14	Масло сливочное	15,0
15	Творог	24,8
16	Желток яичный	15,5-32,1
17	Сыры мягкие	56,5
18	Сыры твердые	76,3
19	Паштет из гусиной печени	369,0

Вспомнив главный диетический принцип (молочные продукты, мясо, птица должны быть обезжирены), мы должны признать, что, употребляя обезжиренные продукты, мы сами себя лишаем витамина K_2 . Сливочное масло, один из главных его источников, променяли на маргарины и спреды. А самих животных и птицу перевели на корма, лишенные K_1 (премиксы, костная и рыбная мука, комбикорма с ростовыми веществами и антибиотиками) и перестали их кормить злаками и травами.

В результате домашние животные перестали синтезировать для нас K_2 , а молочные продукты стали менее полезными. Между тем, суточная потребность в витамине K_2 для взрослого человека составляет около 70 мкг. Ранним признаком гиповитаминоза K_2 является пониженное (до 35%) содержание протромбина в крови.

Существуют несколько разновидностей витамина D (D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , D_5). Практическое применение в настоящее время имеют витамин D_2 и витамин D_3 (кальциферол и холекальциферол соответственно) (схема 1.9). Витамины D – производные стероидов. D_2 образуется в тканях животных из переваренного растительного стерина (эргостерина) под действием УФ-света. D_3 образуется из 7-дегидростерина в печени трески, тюленя и других морских животных. Витамины D регулируют обмен фосфора и кальция в организме, способствует своевременному их отложению в растущих костях, является специфическим средством против рахита. Активность препаратов витамина D выражается в международных единицах (МЕ): 1МЕ содержит 0,025 мкг химически чистого витамина D.

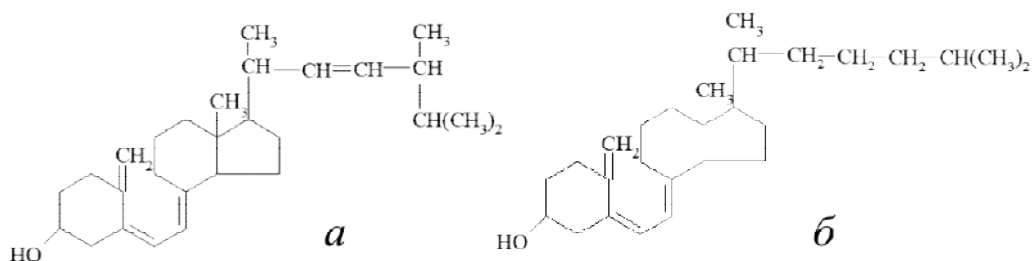


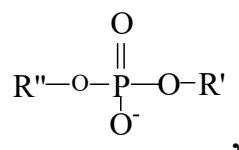
Схема 1.9.

На схеме 1.9 представлены: а) витамин D_2 (кальциферол) и б) витамин D_3 (холекальциферол).

Глава 2. Фосфоглицериды (фосфолипиды) [1-19, 21-38, 41-46, 48-53, 55-60, 64, 65, 68-73, 75-95]

Многие липиды (сфинголипиды, стероиды) являются важнейшими компонентами биологических мембран, окружающих протоплазму клеток и содержащиеся в ней субклеточные структуры: ядро, митохондрии, пластиды, мезосомы. Наиболее распространенные липиды в мембранах – фосфоглицериды (фосфоглицеролы, глицерофосфолипиды, фосфолипиды), которые могут образовывать липидный бислой, т.к. являются амфипатическими соединениями. Отличительной особенностью этой группы липидов является их более сложная структура гидрофильной части молекулы. В отличие от триаглицеролов в фосфолипиде одна из первичных спиртовых групп глицерина этерифицирована не жирной, а фосфорной кислотой. Исходным компонентом для всей серии фосфолипидов является, таким образом, не глицерин, а глицерофосфорная кислота.

Фосфолипиды (ФЛ) являются важнейшими фосфосодержащими веществами липидного характера, входящими в состав растительных масел (табл. 2.1). Однако, несмотря на то, что ФЛ представляют собой важнейший класс фосфоросодержащих соединений, для них нет единой классификации. Если рассматривать ФЛ как несимметричные диэфиры фосфорной кислоты [103-105], а также характер R-радикалов в этих диэфирах, можно говорить о наличии различных стереоизомерных форм:



где R' – азотистые основания, аминокислоты, глицерин, миоинозит и т.д.; R'' – ацильные, алкильные и алькенильноэфирные производные глицерина, диолов, аминодиолов.

Глицерофосфорную кислоту (схема 2.1), следовательно, можно представить либо D-глицеро-1-фосфатом, либо L-глицеро-3-фосфатом. В связи с такой неоднозначностью было принято соглашение – строить стереохимическую классификацию произ-

водных глицерина на основе стереоспецифической нумерации атомов углерода:

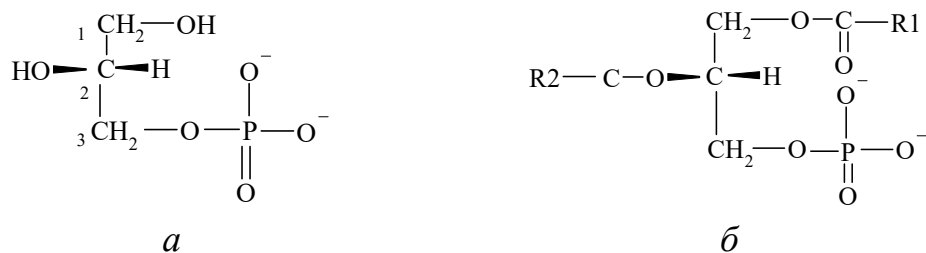
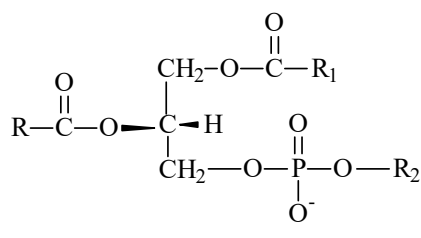


Схема 2.1

На схеме 2.1: а) sn-глицеро-3-фосфорная кислота в анионной форме; б) фосфатидная кислота. В соответствии с этой нумерацией (обозначаемой sn), вторичную гидроксильную группу на проекции располагают слева, а изомер называют sn-глицеро-3-фосфорной кислотой. Она принадлежит к стереохимическому L-ряду. При этерификации гидроксильных групп в положении 1 и 2 образуются фосфатидные кислоты (схема 2.1 б) радикалами R1 и R2 у которых являются остатки насыщенных и ненасыщенных ЖК.

Одна из OH-групп остатка фосфорной кислоты может вступать в реакцию этерификации со спиртовыми компонентами (аминоспиртами, аминокислотами, инозитолом, глицеролами), давая фосфолипиды:



где R₂ – остаток азотистого основания или полиола.

Наибольшей популярностью пользуются классификация, предложенная М. Кейтсом, согласно которой природные ФЛ делятся на две большие группы: глицерофосфатиды и сфингофосфатиды (рис. 1.7). В свою очередь по современной классификации глицерофосфатиды подразделяются на два класса: полиолсодержащие и азотсодержащие (основания и кислоты). В табл. 2.1 приведены основные группы ФЛ. Следует обратить внимание на тот факт, что в структуре ФЛ может отсутствовать один радикал

ЖК. В этом случае образуется подгруппа лизоформ фосфолипидов, указанных в табл. 2.1 и обозначаемых буквой «Л» (например, ЛФС – лизофосфатидилсерин).

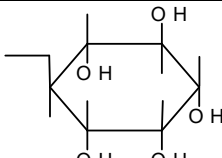
Полиолсодержащие фосфолипиды в свою очередь подразделяются на полиглицерофосфолипиды и фосфатидилинозитолы.

Фосфоглицериды отличаются друг от друга по размерам, форме, полярности, заряду полярной (ионной) группы «головы» молекулы. Каждый тип фосфоглицеридов может быть представлен большим числом различных соединений, отличающихся набором остатков двух ЖК. Обычно они содержат один остаток насыщенной и другой остаток ненасыщенной кислоты (последняя стоит чаще всего у С-2 глицерина).

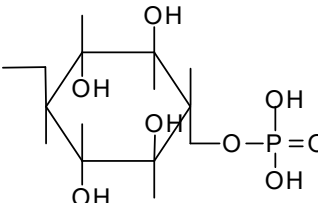
Простейшим фосфоглицеридом можно считать фосфатидную кислоту, не имеющую спиртовых компонентов у фосфорной кислоты (табл. 2.1). В клетках ЖК содержится в незначительных количествах, но играет значительную роль в биосинтезе других ФЛ.

Таблица 2.1. Характер R₃-группировок у различных фосфолипидов и константы протолиза функциональных групп (pK_i) в них.

Фосфолипиды	R ₃	pK _i
1	2	3
Фосфатидные кислоты (ФК)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—P—OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	1,8 (≡PO ₂ H ₂) 6,2 (≡PO ₂ H) [−]
Фосфатидилхолин (ФХ)	$\text{—(CH}_2\text{)}_2\text{N}^+(\text{CH}_3\text{)}_3$	1,5 (≡P—OH) 13,0 (N ⁺ (CH ₃) ₃)
Фосфатидилэтаноламины (ФЭА)	$\text{—(CH}_2\text{)}_2\text{N}^+\text{H}_3$	1,5 (≡P—OH) 10,0 —(N ⁺ H ₃)
Фосфатидилглицерин (ФГ)	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2 \\ \\ \text{CHON} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	1,8 (≡P—OH)

фосфатидилинозитол (ФИ)		1,6 ($\equiv P-OH$)
-------------------------	---	-----------------------

Окончание табл. 2.1

1	2	3
Фосфатидил-О-аминоацетилглицерин (ФААГ) с остатком лизина	$^+NH_3-(CH_2)_4-\overset{+}{\underset{NH_3}{CH}}-\overset{O}{\underset{ }{C}}-O-CH_2-\overset{CH_2}{\underset{CHOH}{ }}$	1,5 ($\equiv P-OH$) 8,95 (αNH_3^+) 10,5 (δNH_3^+)
Кардиолипид (КЛ)	$R_2-OC-CHO-CH_2-O-\overset{OH}{\underset{O}{\underset{ }{P}}}-O-CH_2-\overset{CH_2}{\underset{CHOH}{ }}$ $ $ CH_2O $ $ CO $ $ R_1	1,7 ($\equiv P-OH$) 6,0 ($\equiv P-OH$)
Фосфатидилинозитол-4-фосфат (ФИФ)		1,9 ($\equiv PO_2H_2$) 6,8 ($\equiv PO_2H^-$) 6,0 ($\leftarrow P=O$)
Сфингомиелин (СМ)*	$R_1-\overset{CHOH}{\underset{NH}{\underset{ }{C}}}-CH_2-O-\overset{O}{\underset{OH}{\underset{ }{P}}}-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$ $ $ $O=C-R_2$	1,5 ($\equiv P-OH$) 12,8 ($N^+(CH_3)_3$)

*) СМ в гидрофильной части наряду с четвертичным аммониевым основанием и остатком фосфорной кислоты имеет амидную и спиртовую группу.

Наиболее распространенными в организмах высших растений и животных являются фосфатидэтаноламин (ФЭ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС). В этих фосфатидах при гидратации появляется возможность существовать не только в анионной, катионной, но и в биополярной форме (рис. 2.1 в, г, ж). Область существования этих форм определяется константами протолиза кислотных и основных группировок, а также величинами рН внешнего раствора. Необходимо отметить, что благодаря наличию в фосфатидилсерине двух кислотных группировок (в

отличие от ФЭ и ФХ) область существования его в форме $[\text{ФС}\pm]$ ограничивается узким интервалом рН (в области 1,0-3,5).

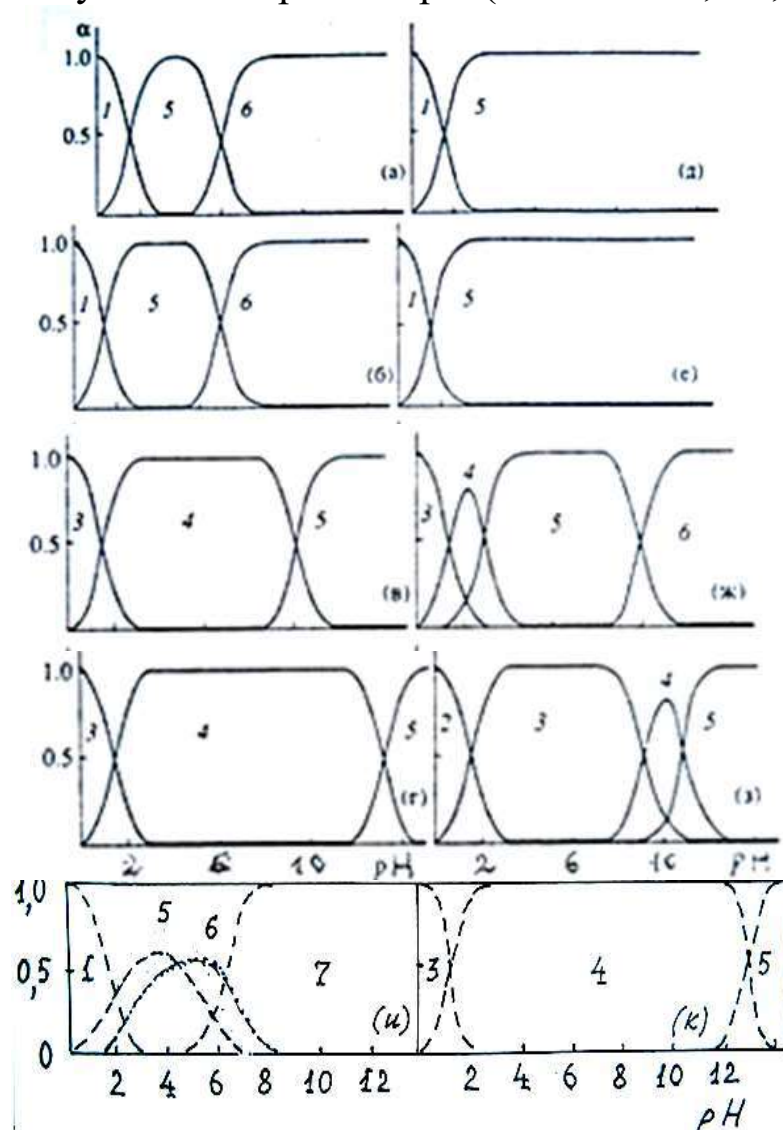


Рис. 2.1. Диаграммы ионных форм фосфолипидов в водных растворах при изменении величины рН:

а - фосфатидные кислоты (ФК); *б* - кардиолипид (КЛ); *в* - фосфатидилэтаноламины (ФЭА); *г* - фосфатидилхолин (ФХ); *д* - фосфатидилинозитол (ФИ); *е* - фосфатидилглицерин (ФГ); *ж* - фосфатидилсерин (ФС); *з* - фосфатидил-о-аминоацетилглицерин (с остатком лизина) (ФААГ); *и* - фосфатидилинозитол-4-фосфат (ФИФ): 1 - незаряженная молекула; 2 - двухзарядный катион; 3 - однозарядный катион; 4 - цвиттер-ион; 5 - анион однозарядный; 6 - анион двухзарядный; 7 - анион трехзарядный.

Заслуживает внимания рассмотрение кислотно-основных свойств сфингомиелина (СМ), который присутствует в плазматических мембранах большинства клеток млекопитающих. СМ можно считать сложным эфиром, состоящим из холина, фосфорной кислоты и двух жирных кислот. Можно в некотором смысле

считать и СМ и фосфадитилхолин близкими аналогами по кислотно-основным свойствам (табл. 2.1 и рис. 2.1 г, к). Однако, СМ в составе (в «головке») одной из ЖК содержит амидную группировку и вторичную спиртовую группу, которые при гидратации будут вести себя особым образом [18, 27, 39, 47, 77, 107].

Исследуя гидратацию аминокислотных остатков, Булл [107] пришел к выводу о существовании соотношения между количеством связанной воды и характером функциональной группы. Гидрофильные группы были разделены им на четыре класса: алифатические (серин, треонин) и ароматические (тирозин, диоксифенилаланин) гидроксильные группы; группа карбоксила (глутаминовая, аспарагиновая); основные группы (аргинин, лизин, орнитин, гистидин, L-аминогруппа); амидная группировка (аспарагин, глутамин). Гидроксильные, карбоксильные и основные группы ассоциируют около 6 молей воды на 1 моль остатка. Амиды, по мнению Булла, не только не присоединяют воду, а по всей вероятности, препятствуют связыванию воды другими полярными группами.

Учитывая тот факт, что подвижность молекул воды в результате гидрофобного влияния снижается, а структура воды упрочняется, можно полагать симбатное влияние длинных гидрофобных «хвостов» ФЛ и амидных группировок в СМ. Гидрофильные группы и заряженные ионные группировки различным образом влияют на структуру воды. Наиболее полные данные по данному вопросу представлены Сидоровой в [108], Гусевым в [109] и в работе [77] при изучении гидратационных свойств аминокислоты. Установлена независимость чисел гидратации в первом гидратном слое от температуры в интервале 20-50°C, а также от концентрации в интервале значений 0,2-1,4 моль аминокислоты.

В то же время с увеличением рН среды от 1,0 до 12,0 наблюдается рост гидратационных чисел (n) цвиттерлитов в первой гидратной оболочке. Отличается эффект электрострикции (уменьшение) размеров междумолекулярных комплексов «биполярный ион – вода» по сравнению с размерами гидратных оболочек «анион аминокислоты – вода» и «катион аминокислоты – вода».

Другую группу ФЛ можно отнести к фосфатидилглицеролам (глицерофосфолипидам). В табл. 2.1 представлены три ФЛ этой группы: ФГ, КЛ и ФААГ с остатком лизина. ФГ и КЛ существуют в водном растворе в виде незаряженных форм (при $\text{pH} < 2$; рис 2.1 б, е) и в виде анионов (при $\text{pH} > 1,5$). При этом отмечается, что КЛ содержит два остатка фосфорной кислоты и поэтому способен существовать не только в виде однозарядного аниона ($1,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$), но в виде двухзарядного аниона ($\text{pH} > 7$). КЛ отличается от других ФЛ тем, что в его гидрофобную структуру входят не два, а четыре остатка жирных кислот. Остатки ненасыщенных ЖК занимают у КЛ, как правило, положение С-2.

В молекуле ФААГ (с лизином в 3'-О-положении) присутствуют две аминогруппы. Следовательно, ФААГ может находиться в виде двухзарядного катиона, однозарядного катиона, биполярного иона и однозарядного аниона (рис. 2.1 з). Это существенное отличие ФААГ от других фосфатидилглицеролов. Можно провести определенную параллель в проявлении кислотно-основных свойств ФААГ и фосфатидилсерином (хотя их и относят к разным группам фосфолипидов): и у ФААГ и у ФС область существования биполярных ионов сравнительно узкая (pI для ФААГ=10,0; pI для ФС=2,0).

У фосфоглицеридов выделяют еще группу фосфадитилинозитолов (рис. 2.1 д, и). Сам фосфадитилиозитол (ФИ) можно представить, как предшественника более полярных липидов, образующихся за счет включения в гидрофильную часть ФЛ дополнительных фосфатных групп. К таким производным относятся фосфадитилинозитол-4-фосфат (ФИФ) и фосфадитилинозитол-4,5-бифосфат (ФИФ₂) (схема 2.2).

ФИ существует при $\text{pH} < 1,5$ в недиссоциированной форме (рис. 2.1 д), а при более высоких значениях pH остаток фосфорной кислоты отдает протон и ФИ превращается в анион однозарядный (рис. 2.1 а). В этом отношении ФИ идентичен ФГ (рис. 2.1 е). ФИФ содержит три иона водорода, способные вступать в реакцию протолиза, и фосфадитилинозитол-4,5-бифосфат может вступать в реакцию со щелочами, отдавая пять протонов. При этом ФИФ₂ несет три анионных фрагмента (один однозарядный и два двухзарядные).

Поскольку каждый из указанных фосфолипидов может содержать различные жирнокислотные ацильные группы, то название относится не к конкретной молекуле, а к семейству соединений с одинаковыми гидрофильными фрагментами [55].

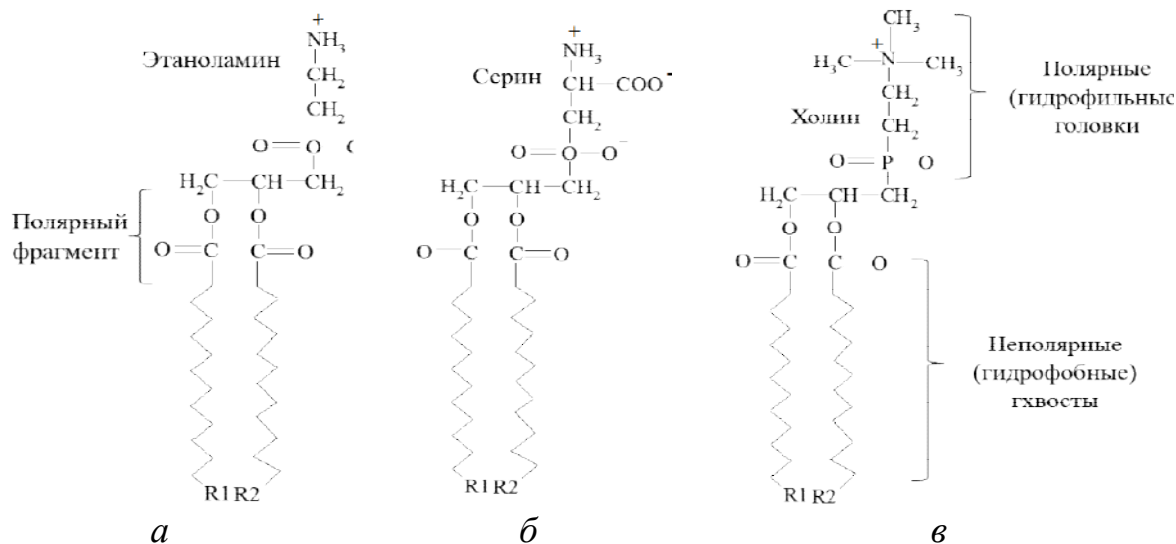
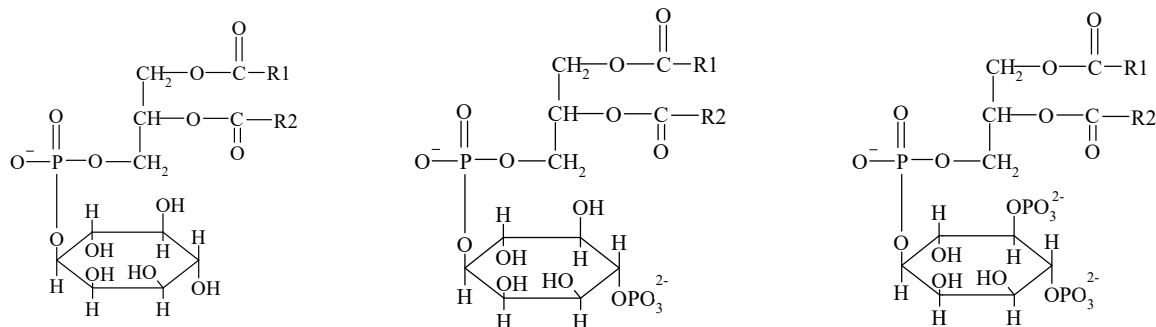


Рис. 2.2. Структурные изображения:

а - фосфатидилэтаноламина; *б* - фосфатидилсерин; *в* - фосфатидилхолина.

Таким образом, при $\text{pH}=7,0$ фосфолипиды находятся в различном ионном состоянии:

- фосфатидилинозитол-4-фосфат – трехзарядный анион;
- фосфатидные кислоты и кардиолипин – двухзарядные анионы;
- серин, фосфатидилинозитол и фосфатидилглицерин – однозарядные анионы;
- фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин – биполярные ионы;
- фосфатидил – 3'-0-лизинилглицерин – однозарядный катион.



Фосфатидилинозитол
(ФИ)

Фосфатидилинозитол-4-
фосфат (ФИФ)

фосфатидилинозитол-4,5-
бифосфат (ФИФ₂)

Схема 2.2.

Из всех липидов наиболее выраженными полярными свойствами обладают фосфоглицериды. Чистые фосфолипиды – плохо кристаллизующиеся, белые, воскообразные вещества. На воздухе и свету ФЛ подвергаются сложным химическим превращениям, связанным со способностью их ненасыщенных фрагментов при воздействии кислорода образовывать различные пероксиды.

Еще одно из особых свойств фосфолипидов может быть связано с их способностью образовывать организованные среды, а в ряде случаев участвовать в процессах саморегуляции [78, 80, 98, 143, 144, 190]. Поэтому целесообразно привести общие сведения об организованных средах и супрамолекулярных структурах.

Глава 3. Организованные среды с участием фосфолипидов

3.1. Общие сведения о процессах саморегуляции и организованных средах

В последние десятилетия прошлого века возникло понятие о принципиально новых типах сред: микро- или наногетерогенных организованных средах. Такие среды отличаются от гомогенных растворителей тем, что в общем объеме растворителя содержатся жидкие нанообъекты (наносистемы) супрамолекулярной природы.

Исходя из природы молекул, образующих наносистемы, способам их взаимодействия, образования и функционирования выделяют два типа организованных сред: среды, на основе образования которых основную роль выполняют мицеллярные системы, образующие собственную микро- (нано-псевдофазу, а также среды, содержащие молекулы-рецепторы с внутренними полостями [98, 143]. Термин «мицеллярные системы» получил свое название исходя из простейших представителей этого типа организованных систем – мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ). Вызвано это тем, что общим признаком всех представителей данного типа организованных систем является наличие в качестве основной составной части дифильных молекул ПАВ, а также способы их образования и подобие физико-химических свойств.

Имеется большое число видов различных мицеллярных систем: прямые (дисперсионная среда – вода) и обратные мицеллы (дисперсионная среда – неводный растворитель); микроэмульсии (масло/вода – водная среда и вода/масло – неводная среда); пленки Ленгмюра – Блоджетт, липосомы, везикулы, липидные межклеточные мембраны; жидкие кристаллы; пленки с молекулярными отпечатками, в зависимости от концентрации ПАВ в растворе могут соседствовать мицеллы различной объемной геометрической формы, что обуславливает разные свойства среды [4]. Образование мицелл и мицеллярных систем происходит за счет самоорганизации молекул (ионов) ПАВ в растворе и не связано с возникновением новых химических связей, что позволяет отнести их к супрамолекулярным структурам [143, 144]. Вторую группу организованных сред составляют растворы различных

молекул-рецепторов (каликсаренов, циклофанов, циклодекстринов, кавитандов), способных образовывать в пространстве трехмерные жесткие каркасы с внутренней полостью. Эти каркасы являются «хозяевами» (рецепторами) для включаемых в полость «гостей», давая начало химическим структурам «гость – хозяин» [144]. В целом организованные среды являются самоорганизованными, термодинамически устойчивыми и динамически равновесными (когда создается их непрерывное образование и распад). Так, например, время пребывания одной молекулы в мицелле составляет $10^{-7} - 10^{-5}$ с. [144]. Организованные среды, таким образом, являются однородными растворами, в которых в основной массе растворителя (неводного или водного) присутствуют наноразмерные системы, образующие собственную нанофазу.

Одним из характерных свойств организованных сред выступает многоцентровое и многофункциональное (электростатическое, донорно-акцепторное, Ван-дер-Ваальсовое, гидрофобное) взаимодействие компонентов (или частей нанопсевдофазы) с сольбилизованным субстратом, среди которых гидрофобное взаимодействие играет доминирующую роль [144, 190]. Фактически этот фактор является общепризнанным в научном сообществе о характере самоорганизации молекул (ионов) ПАВ в растворах. Тем не менее, для ряда систем (в том числе ферментных) исследователи наряду с термином «самоорганизация» использовали термин «саморегуляция». В качестве примера можно привести мультиферментную систему, катализирующую превращения L-треонина в L-изолейцин, процесс, который включает 5 ферментных реакций, в которых продукт, полученный при участии первого фермента, является субстратом для следующего фермента [1]. Накопление L-изолейцина приводит к ингибированию действия фермента L-треониндезаминазы, а сам процесс получил название «ингибирование по типу обратной связи» или «ретроингибирование». Фермент L-треониндезаминазу именуют «регуляторным» или «аллостерическим ферментом», а L-изолейцин «ингибирующий метаболит» - «эффektorом» или «модулятором».

3.2. Вторичная структура фосфолипидов

Известно, что молекулы всех ФЛ содержат полярную группу и два не полярных углеводородных хвоста, что позволило называть их полярными или амфипатическими липидами. В живых системах ФЛ выполняют несколько основных функций: 1) они выступают как структурные компоненты мембран; 2) служат формой, которой концентрируются запасы метаболического топлива, а затем это топливо транспортируется; 3) выполняют защитную роль в коже позвоночных, в листьях высших растений, в клеточных стенках бактерий, в наружном скелете насекомых.

В ряде литературных источников [1, 143] подробно описаны детали молекулярной организации липидных мономолекулярных и бимолекулярных слоев, а также липидных мицелл и мембран. Интересно то обстоятельство, что целостность подобных исключительно тонких (не более 70 Å) структур поддерживается только за счет полярных (диполь-дипольных) и гидрофобных взаимодействий. Отсутствуют данные, которые свидетельствовали бы о наличии прочных ковалентных связей между последовательно расположенными молекулами ФЛ, последовательно встроенными молекулами белков, а также между прилегающими друг к другу фосфолипидными и белковыми молекулами. В связи с тем, что образование мицелл и мицеллярных систем происходит за счет самоорганизации молекул (ионов) ФЛ в растворе и не вызвано возникновением новых химических связей, подобные образования можно отнести к супрамолекулярным структурам [143, 144, 190].

В работе [122] исследовали возможность образования межмолекулярных водородных связей, квантово-химическим способом оптимизировали структуры полярной части индивидуальной молекулы фосфатидилхолина и ее димера. В начальной структуре молекулы фосфатидилхолина при оптимизации остатки ЖК (гидрофобный хвост) были заменены на атомы водорода. Оптимизированная структура молекулы фосфатидилхолина представлена на рис. 3.1.

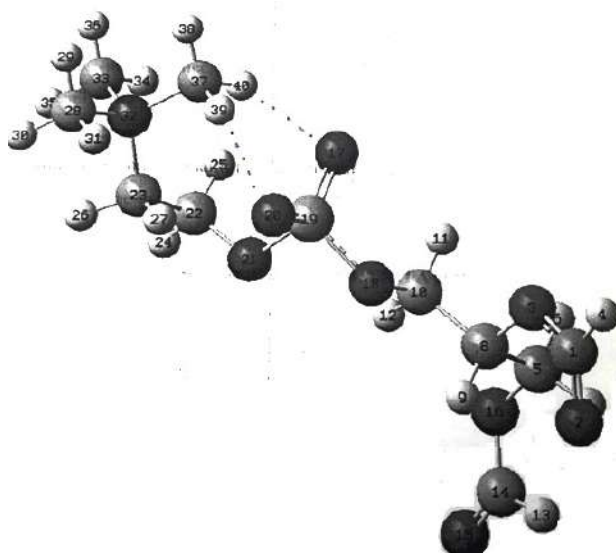


Рис 3.1. Оптимизированная структура молекулы фосфатидилхолина

Расстояния между атомами (табл. 3.1) и величины углов между связями (табл. 3.2) в структуре молекулы фосфатидилхолина позволили установить наличие внутримолекулярных водородных связей между $\equiv\text{C}-\text{H}$ метильных групп с электроотрицательным

фрагментом

$$\begin{array}{c} \text{OR}_1 \\ | \\ \text{O}=\text{P}-\text{O}^- \\ | \\ \text{OR}_2 \end{array}$$

В результате оптимизации между одной из $-\text{CH}_3$ групп, прикрепленный к атому азота и атомами кислорода фосфорнокислой группы образовались две внутримолекулярные водородные связи с длинами 3,09 и 3,03 Å (показаны точечной линией на рис 3.1). Как известно, образование водородной связи $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{}$ возможно, если атом углерода, участвующий в данной связи, образует связь с электроотрицательным атомом (в данном случае это атом азота).

Таблица 3.1. Расстояния между атомами в оптимизированной структуре молекулы фосфатидилхолина

Связь	Средняя длина связи, Å
C-C	1,53
C-H	1,51
P-O	1,61
C-H	1,09
C=O	1,20
C-O	1,41

Таблица 3.2. Углы между связями в оптимизированной структуре молекулы фосфатидилхолина

Валентный угол	Среднее значение валентного угла*	Валентный угол	Среднее значение валентного угла
C-N-C	110,62	C ₍₁₄₎ O ₍₁₆₎ H ₍₁₃₎	113,02
O-P-O	97,20	C ₍₂₂₎ O ₍₂₁₎ H ₍₂₄₎	107,29
N-C-H	108,15	C ₍₅₎ O ₍₁₆₎ H ₍₇₎	110,56
H-C-N	109,56	C ₍₅₎ O ₍₁₆₎ H ₍₆₎	106,49

*Среднеарифметическое значение валентного угла

В оптимизированной структуре молекулы фосфотидилхолина было так же проанализировано разделение электронной плотности, характеризующееся величинами зарядов на атомах по Малликену. В результате анализа выявлено, что заряды на атомах С в холиновой группе имеют отрицательный знак и лежат в интервале от -0,179 до -0,101, исключение составляет атом С, участвующий в С-О связи, заряд на котором равен 0,039. Заряды на атомах Н холиновой группы положительны и лежат в интервале от 0,112 до 0,214. Заряд на атоме N холиновой группы равен -0,399. Таким образом, в целом суммарный заряд холиновой группы положителен, что обусловлено большим числом атомов О в фосфатной группе и глицероловой связке, оттягивающих на себя электронную плотность. Заряды на атомах О фосфатной группы близки между собой и лежат в интервале от -0,679 до -0,541. Заряд на атоме Р равен 1,210.

Заряды на атомах О в глицероловой связке отрицательны, их значение по модулю меньше, чем для зарядов на атомах О фосфатной группы. Величины данных зарядов находятся в интервале от -0,437 до -0,413. Заряды на атомах С в глицероловой связке положительны и находятся в интервале от 0,010 до 0,109. Заряды на атомах Н в глицероловой связке положительны и находятся в интервале от 0,126 до 0,140.

Еще одним доказательством существования мицелл ФЛ как супрамолекулярных образований служит факт практически полного экстрагирования ФЛ из мембран смесями спирта и хлороформа. Если затем добавить эти ФЛ к подвергшимся экстрагированию мембранам, то они снова встроются в мембранную структуру, то есть произойдет процесс реассоциации. Подобный эф-

факт свидетельствует о том, что мембраны можно отнести к системам, имеющим минимум свободной энергии, и поэтому способным к самосборке (самоорганизации).

Возникает вопрос о возможности процессов самоорганизации самих молекул (ионов) ФЛ при формировании мембранных слоев. В изученных литературных источниках нами не было найдено данных по этой проблеме. Единственным обоснованием формирования мембраны являлось допущение, что мембраны образуются из отдельных молекул (ионов) ФЛ. Последнее фактически подразумевает формирование мицеллярного слоя как одностадийный процесс. Однако в ряде случаев периоду формирования мембраны в растворе предшествует «спаривание» двух молекул (ионов) ФЛ. Возможность подобного взаимодействия можно продемонстрировать для фосфатидилхолина, который в области $pH \approx 2$ существует в виде катиона. При $pH \approx 7$ фосфатидилхолин имеет для аминогруппы положительный заряд, так как pK' группы $-N^+(CH_3)_3$ равен 13 [1]. Следовательно, при $pH \approx 7$ фосфатидилхолин будет находиться в виде биполярного иона.

Оптимизированная структура димера полярной части фосфатидилхолина представлена на рис. 3.2.



Рис. 3.2. Оптимизированная структура димера полярной части ФХ

Каждая из двух индивидуальных молекул, образующих димер, имеет по две внутримолекулярных водородных связи. Из данных четырех связей при образовании димера сохраняется

только одна водородная связь, длина которой увеличивается до 3,40 Å. Кроме этого, образуются три межмолекулярные водородные связи (табл. 3.3). Энергию образования димера рассчитывали по следующей формуле $E_{обр} = 2E_I - E_{димера}$. Взаимодействие двух биполярных ионов фосфатидилхолина с участием молекулы воды приводит к образованию ассоциата с двумя циклическими структурами, которые можно рассматривать как псевдохелатные, поскольку роль «комплексообразователя» (вместо иона Me^{+n} в обычных комплексах) взяла на себя молекула H_2O (рис. 3.3). Аналогичный эффект с образованием 7-членного цикла наблюдаются при взаимодействии биполярного иона и катиона фосфатидилхолина (рис. 3.4).

Таблица 3.3. Длины водородных мостиков в оптимизированной структуре димера фосфатидилхолина

Характеристика связи (водородный мостик)	Расстояние между атомами С и О, Å
$C_{(72)}-H_{(53)}\dots O_{(76)}$	3,40
$C_{(28)}-H_{(30)}\dots O_{(80)}$	3,32
$C_{(42)}-H_{(45)}\dots O_{(17)}$	3,06
$C_{(33)}-H_{(34)}\dots O_{(64)}$	3,02

Даже при низких значениях рН при взаимодействии двух катионов ФХ образуются псевдохелатные структуры за счет самоорганизации молекул (ионов) с участием молекул H_2O , но без возникновения новых химических связей. Это позволяет подобные образования катионов и биполярных ионов ФХ отнести к супрамолекулярным структурам [143, 144, 190] (рис. 3.5).

Необходимо отметить, что анионные формы фосфатидилхолина не образуют прочных ассоциатов из двух молекул (рис. 3.3-3.7) из-за отсутствия заряда в группе $-N(CH_3)_3$. В этом случае в процессах «спаривания» возрастает роль гидрофобных хвостов липидов, между которыми возникают дисперсионные взаимосвязи. Подобные «качели», по всей вероятности, будут происходить и в случаях катион – катион, катион – цвиттер-ион и цвиттер-ион – цвиттер-ион фосфатидилхолина.

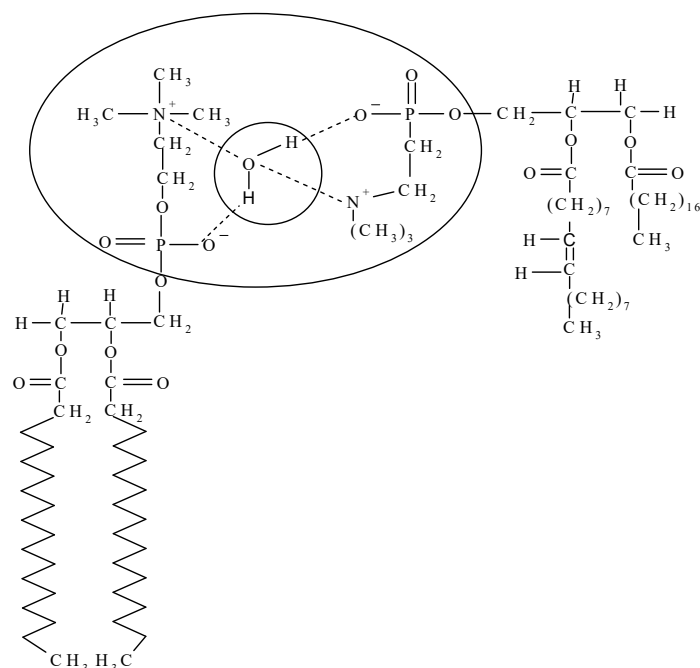


Рис. 3.3. Квазихелатные структуры в системе «биполярный ион + биполярный ион фосфатидилхолина»

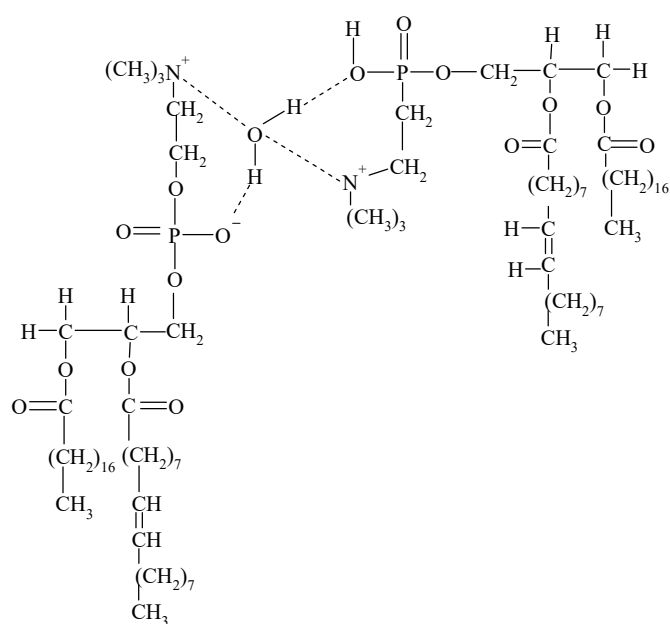


Рис. 3.4. Квазихелатные структуры в системе

Таким образом, при взаимодействии двух молекул (ионов) фосфатидилхолина наблюдается процессы самоорганизации с образованием супрамолекулярных структур. При этом ассоциаты из двух ионов фосфатидилхолина можно охарактеризовать как псевдосорбент, способный к обмену ионов [18, 20]. Набор этих псевдосорбентов приводит к образованию мицелл, к которым в

полной мере можно относиться как к «полноценным» сорбентам (в виде мембран), проявляющим свойства ионообменников (табл. 3.4).

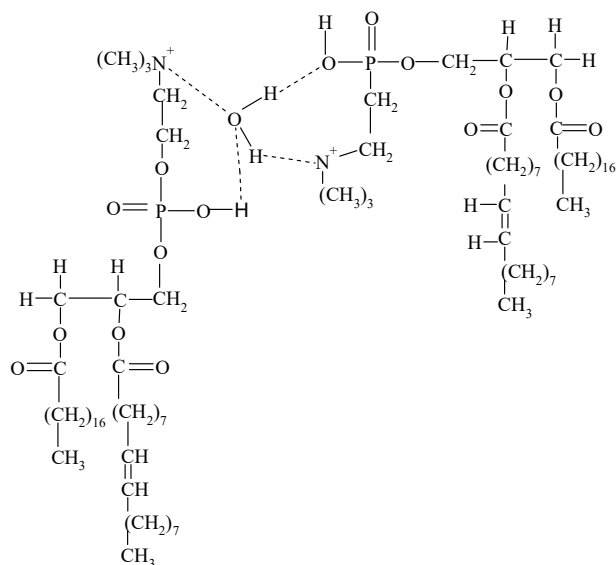


Рис. 3.5. Хелатные структуры

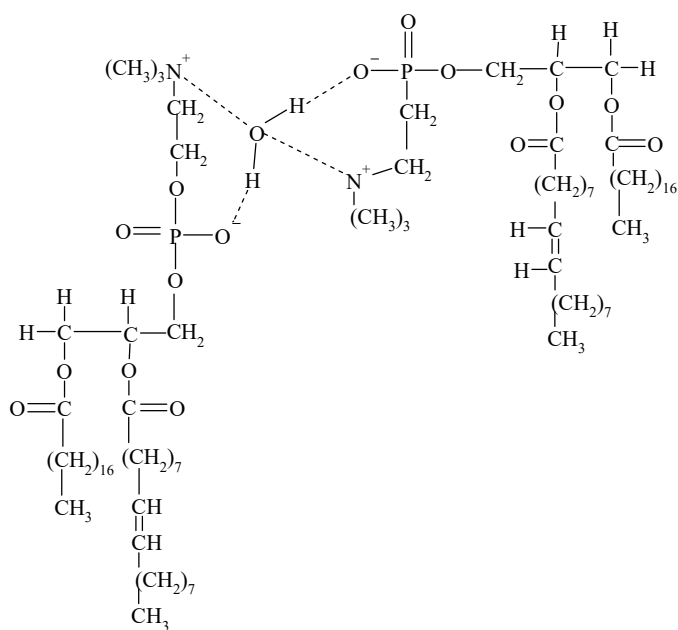


Рис. 3.6. Квазихелатные структуры

Какими величинами можно воспользоваться для описания вариативности в моно- и бимолекулярных слоях различных фосфолипидов? На наш взгляд одной из таких величин может служить параметр ΔpH , определяемый значениями pK_i фосфатной группы и pK_i для аминогруппы (табл. 3.5). Подобный подход является

Окончание табл. 3.4

1	2	3	4	5
1554	1540	1532*	-	$\delta_{as} \text{COO}^-$
1472	1471	1473	1481,1480**	$\nu_s \text{B} \text{N}^+ \equiv$ в биполярных ионах; CH_2
1374	1382	1368	1388	δ_s в CH_3 ; δ OH; $\delta_s \text{COO}^-$
-	-	1320	1260	$\nu \text{P=O}$; $\text{P=O} \cdots \text{HO-P}$; CH_2 (всерные)
1226	1228	1221	1217	$\nu \text{P=O}$ (асс.); CH_2 (маятниковые)
1140	1140	1150	1150	$\nu_{as} \text{P-O-C}$ и C-O-C
1098****	1092	1106	1090	P-O^- ; $^+\text{C=O}^-$; $\nu \text{O} \cdots \text{H}$ в циклах
1080	1072	1064	1062	P-O-C и C-O-C
1042	1020	1020	1046***	$\nu_s \text{P-OH}$; $\text{P-OH} \cdots \text{N}^{+***}$
972	981	966	961	δCH в $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$
820	815	815	814	$(\text{CH}_2)_n$ (маятниковые)
737	760	766	746	H_2O (крутильные); CH_2
611	610	609	614	δCH в циклах

*) для карбонильной группы в ФС;

**) для CH_2 -групп в КЛ;

***) для Н-связей в ФХ;

****) для $\text{P-O} \cdots \text{N}^+$ в ФХ.

Приведенные выше соображения по формированию самоорганизованных сред необходимо адресовать и к другим ФЛ, наряду с ФХ, если фосфатилэтанолламин, который при $\text{pH}=2$ несет, как и ФХ положительный заряд, то фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин, кардиолипин и фосфатидилсахара не несут электрического заряда, хотя их «головки» полярны. Особенностью фосфатидилсерина, содержащего в полярной части α -аминогруппу ($\text{pK}'=10$) и карбоксильную группу ($\text{pK}'=3$), является то, что при $\text{pH}=7$ фосфатидилсерин имеет один положительную и два отрицательных заряда, то есть несет суммарный отрицательный заряд. Отмеченные вариации в полярности и заряде полярных групп, размерах, их форме, оказывает важнейшее влияние на структуру моно- и бимолекулярных слоев, «парных» ассоциатов, фосфолипидных мицелл, природных липопротеидов и мембранных систем [100, 168].

Однако, в дальнейшем формировании мезофаз (то есть моно-слоя при структурной организации системы липид-вода) ФХ, ФЭА и СМ по сравнению с ФС и ФААГ имеется ряд особенно-

стей. Отсутствие нескомпенсированного заряда на полярных головках ФХ, ФЭА и СМ приводит к формированию плоских структур в мезофазе. Присутствие нескомпенсированного заряда на полярных головках ФС и ФААГ затрудняет формирование плоских структур (вследствие эффекта электростатического отталкивания) и ведет к образованию радиально ориентированных структур в мезофазе с большой кривизной поверхности.

Можно полагать, что чем больше величина ΔpK_i , тем более значительные затраты энергии требуются для ослабления взаимодействия полярных головок в «парных образованиях» и вступления в силу дисперсионных (гидрофобных) сил углеводородных «хвостов» между двумя молекулами (ионами) ФЛ.

В фосфатидных кислотах (ФК), фосфатидилионизитол-4-фосфате (ФИФ) и кардиолипине (КЛ) роль pK_2 (вместо аминогрупп) выполняют $\equiv PO_2H^-$ –группы и соответственно ΔpK_i соответствуют разнице во второй и первой констант протолиза

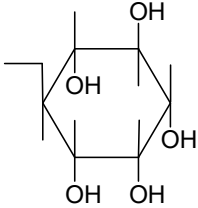
$—O—P \begin{matrix} \nearrow OH \\ \searrow O \\ \nearrow OH \end{matrix}$ в полярных группировках липидов.

Фосфатидилглицерин (ФГ) и фосфатидилинозитол (ФИ) содержат не ионные, а полярные группы, способные участвовать за счет индукционного эффекта в ион-дипольных взаимодействиях между двумя соседними молекулами ФЛ. В связи с тем, что индукционные силы слабее ориентационных, которые характерны для группы ФХ и группы ФК, способность к дисперсионным взаимодействиям у ФГ и ФИ по сравнению с остальными фосфолипидами менее выражена.

Таблица 3.5. Значения параметра ΔpH , определяемого величинами pK_1 фосфатидной группы и pK_i (или аминогруппы pK_2 той же фосфатной группы)

ФЛ	R_3	pK_i [1, 8]	ΔpH
1	2	3	4
ФХ	$—(CH_2)_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$	1,5 ($\equiv P-OH$) 13,0 ($\overset{+}{N}(CH_3)_3$)	11,5
ФЭА	$—(CH_2)_2\overset{+}{N}H_3$	1,5 ($\equiv P-OH$) 10,0 ($\overset{+}{N}H_3$)	8,5

Окончание табл. 3.5

1	2	3	4
ФС	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2 \\ \\ \text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	1,5 ($\equiv\text{P-OH}$) 3,0 (COOH) 10,0 ($\text{---(NH}_3^+)$)	8,5 7,0
ФААГ с остатком лизина	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{---CH---C---O---CH}_2\text{---} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	1,5 ($\equiv\text{P-OH}$) 8,95 (αNH_3^+) 10,5 (δNH_3^+)	7,45 9,0
СМ	$\begin{array}{c} \text{R}_1\text{---CHOH} \\ \\ \text{C---CH}_2\text{---O---P---(CH}_2)_2\text{---N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{NH} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{OH} \\ \\ \text{O=C---R}_2 \end{array}$	1,5 ($\equiv\text{P-OH}$) 12,8 ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)	11,3
ФК	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---O---P---OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	1,8 ($\equiv\text{PO}_2\text{H}_2$) 6,2 ($\equiv\text{PO}_2\text{H}^-$)	4,4
ФГ	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2 \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	1,8 ($\equiv\text{P-OH}$)	-
ФИ		1,6 ($\equiv\text{P-OH}$)	-
КЛ	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{---CH}_2\text{---O---P---O---CH}_2\text{---} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{O} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CO} \quad \quad \quad \text{R}_1 \end{array}$	1,7 ($\equiv\text{P-OH}$) 6,0 ($\equiv\text{P-OH}$)	4,3

Глава 4. Синтез биологических мембран и их функционирование

В научном сообществе принято рассматривать формирование биологических мембран как динамичный многостадийный процесс. При этом выделяют синтез мембранных монослоев и бислойных мембран. В связи с тем, что фосфолипиды сравнительно плохо растворимы в воде в мономерном виде, а стремление их полярных головок максимально контактировать с водой, создается уникальная возможность образовывать многообразные устойчивые структуры при агрегации этих молекул.

Формирование нерастворимых фосфолипидных мембранных слоев на границе раздела вода – воздух происходит в несколько стадий (рис. 4.1). На первой стадии мембранообразующие ФЛ быстро растекаются на поверхности воды (по Ленгмюру, 1933г.), образуя мономолекулярный слой.

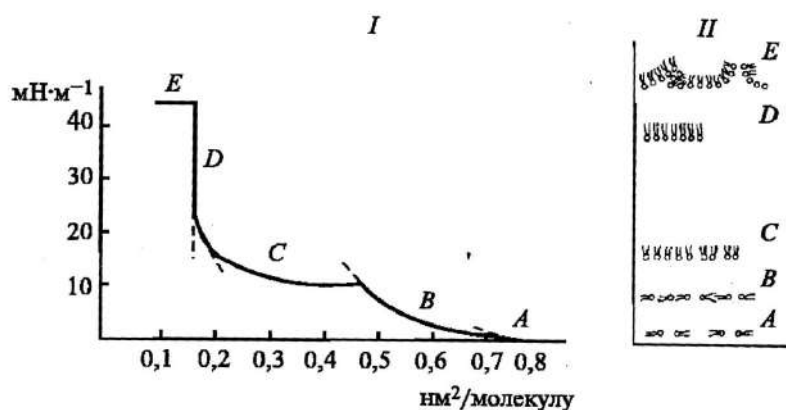


Рис. 4.1. Кривая (изотерма) площадь – давление для монослоя длинноцепочечных липидов (I) и схема расположения липидных молекул на границе раздела фаз воздух – вода (II):

A – состояние двумерного газа; B – растянутая жидкая пленка; C – конденсированная жидкая пленка; D – твердоконденсированное состояние; E – состояние коллапса [190]

Сжатие этого монослоя приводит к появлению межмолекулярных взаимодействий (с нарушением структуры идеального двумерного газа) (рис. 4.1, A). Возрастание давления в монослое приводит к образованию растянутой жидкой пленки ФЛ, где его молекулы обладают, как в обычной жидкости, всеми степенями свободы, но их полярные головки фиксированы на поверхности

раздела фаз (рис. 4.1, В). Углеводородные цепочки молекул ФЛ в растянутой жидкой пленке склонны к агрегации и взаимопроникновению.

Дальнейшее возрастание давления в монослое приводит к формированию наиболее плотной упаковки молекул ФЛ, то есть, к их вертикальной ориентации. В начале подвижность полярных головок вследствие их сильной гидратации в подобном состоянии будет меньше, чем подвижность углеводородных цепочек молекул ФЛ. Это приводит к возможности преимущественного движения молекул в плоскости поверхности (латеральная подвижность), что позволяет рассматривать ФЛ как конденсированную жидкую пленку (рис. 4.1 С).

Следует заметить, что последующее уплотнение слоя при росте давления может произойти лишь за счет разрушения гидратных оболочек полярных головок, вследствие чего слой становится практически несжимаемым и находится в «твердоконденсированном» состоянии (рис. 4.1 D), где площадь поперечного сечения молекул не зависит от длины углеводородных цепочек ФЛ. Площадь поперечного сечения углеводородной цепочки равна $\approx 0,2 \text{ нм}^2$, а предельные площади молекул ФЭА и ФХ в твердоконденсированном состоянии составляют величины $\approx 0,4 \text{ нм}^2$ и $\approx 0,44 \text{ нм}^2$ соответственно. После превышения некоторого предельного давления монослой ФЛ начинает разрушаться и наступает состояние коллапса (рис. 4.1 E).

Использование поверхностных монослоев в качестве модельных мембранных систем имеет ряд ограничений, связанных с тем, что монослой – это только половина липидного слоя, обращенного в газовую фазу. Последнее ограничение можно преодолеть при использовании в качестве мембраны мономолекулярного слоя, находящегося на границе двух несмешивающихся жидкостей (например, в системе вода – углеводород). Более корректные модели, представляющие собой липидные бислои, удастся получить в виде полимолекулярных структур, образующихся ФЛ в объеме водной фазы.

Необходимо отметить, что, хотя полярные группы ФЛ интенсивно взаимодействуют с водой, смешиваясь с ней в любых соотношениях, образующиеся смеси не являются истинными раство-

рами, а образуют многообразные упорядоченные фазы с периодической структурой. Для подобных смесей характерно явление лиоторопного полиморфизма (когда фазы для конкретных ФЛ переходят друг в друга) (рис. 4.2), а также изменение структуры системы ФЛ – вода под действием температурного фактора, получившего название термотропного полиморфизма [190].

Стабильность того или иного типа мезофаз и область их существования определяется дисперсионными взаимодействиями углеводородных «хвостов» (т.е. гидрофобным эффектом), а также эффективной геометрической формой фосфолипидных молекул. К примеру, для ФС и ФААГ, имеющих нескомпенсированный заряд на полярных головках молекул липидов, образует не плоские структуры (из-за электростатического отталкивания), а радиально ориентированные структуры со значительной кривизной поверхности.

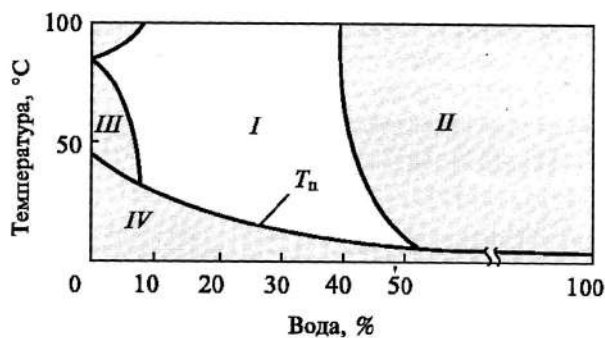


Рис. 4.2. Бинарная фазовая диаграмма смеси яичного ФХ с водой как функция температуры (по В.Ф. Антонову, 1982):

I – жидкокристаллическое состояние липида, ламеллярный бислой; *II* – двухфазная система вода – жидкие кристаллы, ламеллярный бислой; *III* – область, где жидкокристаллические ламеллярные бислойные структуры сосуществуют с гексагональными; *IV* – твердая (гелеобразная) ламеллярная фаза; T_n – кривая температуры фазового перехода [190].

Сложность чередующихся протяженных структур в фосфолипидных слоях определяет механические, магнитные, электрические, оптические, биологические свойства (анизотропию) мембран. Подобные структуры являются типичными жидкокристаллическими (мезоморфными) состояниями ФЛ и характеризуются промежуточными свойствами между жидкостями и твердыми кристаллами [1, 19, 51, 55, 61].

Внутреннее строение фосфолипидного бислоя в жидких кристаллах отличается от состояния в растворе углеводов, несмотря на то, что в обоих случаях эти структуры гидрофобны. Значительная часть анизотропных слоев в жидком кристалле высокоупорядочена и только отдельные относительно небольшие участки в середине биослоя мембраны имеют жидкую структуру. Следует отметить, что оптимальную функциональную активность клеточных мембран определяют жидкокристаллические структуры [52, 55, 190]. С биологической точки зрения из всего разнообразия известных мезофаз наиболее интересны однопространственная ламеллярная и двухпространственная цилиндрическая, или гексагональная (рис. 4.3). Гексагональные (или мицеллярные) структуры обладают способностью формировать сквозные поры в мембранных слоях, что в значительной мере увеличивает проницаемость мембран по отношению к воде и растворенным компонентам [55, 64, 190].

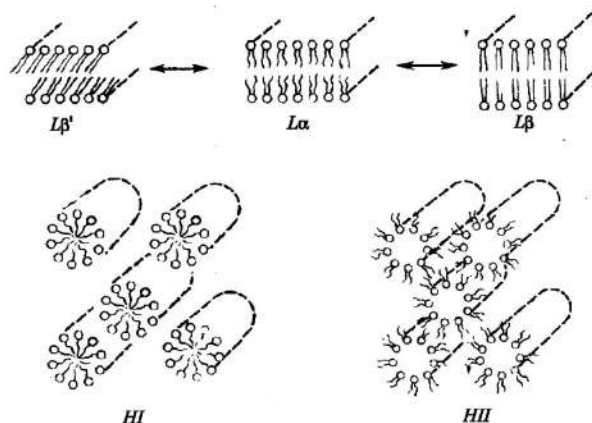


Рис. 4.3. Строение (поперечный разрез) мезофаз [190]:

L – ламеллярная фаза; *α* – жидкоподобная фаза; *β* и *β'* – кристаллические фазы с различным углом наклона цепей к поверхности раздела фаз; *HI* – гексагональная; *HII* – инвертированная гексагональная фаза (вода в липиде)

ФЛ растворимы в большинстве неполярных растворителей (содержащих небольшое количество воды). Лучше всего ФЛ экстрагируются из тканей и клеток смесью этилового спирта и хлороформа. В безводном ацетоне ФЛ растворяются не очень хорошо. При контакте с водой они проявляют свойства амфипатических структур: истинным раствором можно считать ионные (по-

лярные) части фосфолипидов, а остатки жирных кислот (гидрофобная часть) находится в воде в виде мицелл.

Мягкий щелочной гидролиз фосфоглицеридов приводит к отщеплению гидрофобных частей (жирных кислот с образованием мыл). Например, из фосфатидилхолина при этом образуются глицерол-3-фосфорилхолин, т.е. не затрагивается глицерофосфоспиртовый остов исходной молекулы. В сильнощелочной среде наряду с жирными кислотами отщепляется и спирт $-R_3-OH$, однако связь между глицерином и остатком фосфорной кислоты устойчива (образуется глицерол-3-фосфат). Последний гидролизуется быстро в кислой среде.

Гидролиз фосфолипидов специфическими ферментами – фосфолипазами, позволяет выявить структурные особенности ФЛ. Фосфолипаза A_1 и фосфолипаза A_2 осуществляют катализ гидролиза связи между гидрокислотными остатками у C_1 и C_2 соответственно (схема 4.1):

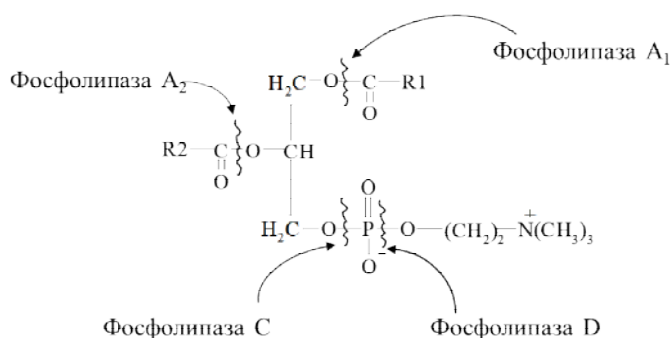


Схема 4.1

Фосфолипазы класса A_2 содержатся в змеином, пчелином и осином ядах, а их воздействие на ФЛ ведет к образованию лизофосфатидов и разрушению клеточной мембраны. Существуют еще два класса фосфолипаз – C и D , которые катализируют разрыв связи между глицеролом и фосфатом (освобождается диацилглицерол) и между спиртовой и фосфорной группой, давая фосфатидную кислоту.

Класс фосфолипидов намного богаче, чем это представлено в табл. 1.4. Например, известно, что мембраны эритроцитов человека содержат не менее 21 типа ФЛ, отличающихся друг от друга жирнокислотными остатками.

Глава 5. Гидратация фосфолипидов [1-5, 7-10, 19-26, 33-38, 42-46, 55, 64-66, 95, 96, 98-101]

В предыдущем разделе фрагментарно было упомянуто об особом поведении в водных растворах ФЛ. Однако данный вопрос требует более подробного рассмотрения, в связи с тем, что характер гидратации и структура гидратных комплексов ФЛ играют решающую роль при выделении, разделении, анализе ФЛ, а также в формировании клеточных структур на уровне мембран.

Обратим еще раз внимание читателя на тот факт, что ФЛ являются амфипатическими молекулами, имеющими полярную (ионную) часть с ионизированным фосфатом и другими заряженными группами, а также длинные неполярные цепочки (остатки жирных насыщенных и ненасыщенных кислот). При переработке масличных семян прессовым или экстракционным способом под влиянием тепловых воздействий, растворителей, влаги ФЛ переходят в масло. Как показано выше, фосфолипидный комплекс растительных масел имеет очень сложный состав, расхождения в данных у различных авторов по составу ФЛ связаны как с методами выделения, так и с природой исследуемых масел. Получение фосфолипидного концентрата как самостоятельного продукта из растительных масел проводится путем гидратации фосфолипидов водой, которая (хотя и не обеспечивает достаточно полного выделения фосфорсодержащих компонентов) является необходимым реагентом отделения ФЛ. В связи с этим ФЛ условно подразделяются на гидратируемые и негидратируемые (остающиеся в масле после процесса гидратации).

Несмотря на то, что гидратация в промышленном производстве масел применяется достаточно длительное время, сущность этого процесса не изучена в достаточной степени, не полностью выяснен механизм взаимодействия воды с ФЛ. Полагаем, что при рассмотрении этого вопроса нужно учитывать следующие аспекты:

- состав гидратируемых и негидратируемых смесей растительных масел;
- возможные (определяющие) силы взаимодействия между отдельными классами соединений в маслах до гидратации;

- представительные операции по разделению и концентрированию фосфолипидов;
- выбор метода анализа для установления механизма взаимодействия «фосфолипид – вода».

В качестве примера рассмотрим групповой состав гидратируемых и негидратируемых ФЛ, выделенных из подсолнечного, соевого, хлопкового, льняного, рапсового, касторового и амарантового масел (табл. 5.1). Авторы [3, 111-124, 126-129] отмечают, что среди ФЛ наибольшее содержание характерно фосфадитилхолинам, фосфатидилэтаноламинам, фосфатидилинозитолам (кроме соевых масел). Минеральный состав ФЛ представлен в основном K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Однако ФЛ содержат и такие ионы как Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} и др. Это свидетельствует о наличии в составе масел не только свободных ФЛ, но и фосфолипидов в виде комплексных соединений. Жирнокислотный состав соевых и подсолнечных ФЛ отличается более высоким содержанием насыщенных кислот по сравнению с жирнокислотным составом триацилглицеринов. Это обусловлено в основном присутствием в ФЛ пальмитиновой кислоты.

Выделение гидратируемых ФЛ приводит к тому, что вместе с ними в гидратируемую фракцию переходят свободные и связанные углеводы, а также неомыляемые липиды. Наличие свободных углеводов в гидратируемых ФЛ объясняется как образованием смешанных ассоциатов, обусловленных возникновением межмолекулярных Н-связей между $R=OH$, $R=O$; NH_2 ; OH – группами ФЛ и $C-OH$; $C=O$ молекул углеводов, так и частичным гидролизом углеводов, которые были связаны с ФЛ ковалентными связями. В процессе экстракции водой происходит разрыв Н-связей, в результате чего углеводы переходят в свободное состояние.

В табл. 5.1 представлены данные минимального и максимального содержания фосфолипидов [3, 78, 81, 111-124, 126-128, 130, 131].

Содержание негидратируемых ФЛ в маслах колеблется в широких пределах (табл. 5.2). Сопоставление состава негидратируемых и гидратируемых ФЛ показывает, что холинсодержащие компоненты в негидратируемых ФЛ обнаруживаются в незначительных количествах. Другие же компоненты ФЛ присутствуют и

в гидратируемых и в негидратируемых фосфолипидах. В негидратируемых ФЛ преобладают безазотистые соединения. Достаточно высокое кислотное число негидратируемых фосфолипидов объясняется присутствием свободных кислых форм ФЛ. Высокое содержание золы (по сравнению с азотом) свидетельствует о наличии солей, которые образуются с кислотными остатками ФЛ.

Таблица 5.1. Состав ФЛ подсолнечных (1), соевых (2), хлопковых (3), льняных (4), рапсовых (5), касторовых (6), амарантовых (7) масел, в %

Фосфолипиды	Масла						
	1	2	3	4	5	6	7
Фосфатидилхолины	16-25	22-41	25-52	24-33	28-35	15	40-45
Лизофосфатидилхолины	3-4	-	4-5	7-15	10-15	3	14-16
Фосфатидилэтаноламины	15-23	13-15	17-22	18-24	20-23	16	20-22
Фосфатидилсерины	13-17	14-16	2-5	14-27	15-17	14	8-14
Фосфатидные кислоты	5-12	11-13	8-16	6-10	3-8	1-2	-
Фосфатидилинозитолы	12-20	6-7	22-27	14-25	28-37	19	16-18
Полифосфатидные кислоты	10-16	12-13	-	-	-	-	-
Дифосфатидилглицерины	8-15	-	3-4	до 1	-	-	-

Объяснение подобных явлений может быть найдено при рассмотрении характера связей между ФЛ и другими компонентами масел. Прежде всего, необходимо отметить, что ФЛ присутствуют в исходных маслах в виде следующих соединений:

- межмолекулярных и ионно-молекулярных комплексов со стероидами, сфинголипидами, витаминами, углеводами, алифатическими спиртами. При этом наиболее прочные комплексы будут образовываться в тех случаях, когда состав их обеспечивается максимально большим количеством ион-ионных, ион-дипольных, и диполь-дипольных связей;

- межмолекулярных и внутримолекулярных комплексов самих фосфолипидов за счет Н-связей, а также координационных связей с двух- и трехвалентными ионами металлов, которые правомочно считать основным активным центром комплекса;

- ассоциатов «низкого» порядка (типа димеров и тримеров) за счет внутримолекулярных Н-связей и ориентации диполей;

- мицелл различного состава, образованных под влиянием межмолекулярных (индукционных, дисперсионных) сил, возни-

кающих при взаимодействии гидрофобных остовов жирных кислот.

Таблица 5.2. Состав ФЛ гидратируемых (в числителе) и негидратируемых (в знаменателе), выделенных из подсолнечного (1), соевого (2), льняного (3), хлопкового (4) масел, в %

Фосфолипиды	Масла			
	1	2	3	4
Фосфатидилхолины	27-30/5-9	24-29/7-8	22-38/-	22-25/-
Лизофосфатидилхолины	1-2/1-2	-/2-3	1-5/-	10-11/-
Фосфатидилэтаноламины	19-24/9-21	18-20/6-10	15-30/6-8	16-30/-
Лизофосфатидилэтаноламины	-/2-4	-/3-12	-	-
Фосфатидилсерины	12-15/9-16	14-16/6-11	16-19/17-20	12-13/-
Лизофосфатидилсерины	-/3-8	-/4-8	5-6/6-8	5-8/-
Фосфатидные кислоты	6-10/2-3	28-29/19-20	11-15/	11-12/-
Фосфатидилинозитолы	28-35/6-8	3-7/2-4	7-9/30-35	17-36/-
Полифосфатидные кислоты	10-25/13-22	9-11/6-7	-/-	1-3/-
Лизофосфатидные кислоты	-/12-36	-/39-50	-/14-18	-/-
Дифосфатидилглицерины	16/2	18-20/9-10	-/-	-/-
Фосфогликолипиды	-/-	-/-	9/-	11/-
Глицерофосфат	-/-	-/5-21	-/-	-/-
Сумма ФЛ к массе масла, %	-/0,1-0,2	-/0,2-0,3	0-0,3-0,5	/0,2-0,5
Кислотное число, мгКОН/г	18-21/26-29	17-22/26-27	10-15/20-23	10-17/26-29
Содержание золы, %	4-5/9-10	4-5/13-14	3-5/8-9	2-3/10-11

На основании литературных данных для ФЛ наиболее прочными связями являются координационные связи и ион-ионные связи [132-138]. Вклад Н-связей в общую энергетику ассоциированных комплексов будет зависеть от характера функциональных групп, а также от общего числа водородных связей между диполями ФЛ и диполями других компонентов [95, 110, 132-139]. Поэтому главное действие, которое должна оказывать гидратация для удаления фосфолипидов из масел, заключается в разрушении ионных и межмолекулярных комплексов ФЛ и создания термодинамически неустойчивой системы, способствующей коагуляции ФЛ и выпадением их в осадок.

Исходную систему «фосфолипид – масло» необходимо рассматривать как раствор ФЛ в триацилглицеролах. Растительные масла и их триацилглицеролы по диэлектрической проницаемости ($\epsilon_r=2,9\div3,4$) относятся к растворителям, которые в обычных условиях не способны к образованию Н-связей ни в качестве акцепторов, ни в качестве доноров протона (исключение касторовое

масло), т.е. являются апротонными растворителями. Молекулы ФЛ в масле существуют в виде ассоциатов (мицелл различной формы и размеров, димеров с образованием полярного ядра (рис. 1.2 в). Ядро обычно состоит из определенным образом ориентированных к центру полярных частей молекул ФЛ. В качестве такого ядра могут выступать микрокапельки воды [98-101]. Такая структура, как описано выше, определяется межмолекулярными и ионными взаимодействиями, в которых принимают участие координационные, ионные, водородные, Ван-дер-Ваальсовские силы. Кроме этого, в такой системе принимают участие и действуют силы на фазовых границах раздела между средой и воздухом (поверхностное натяжение), между самими мицеллами. Вполне вероятным является наличие в мицелле сразу нескольких молекул (ионов) ФЛ одного вида или нескольких видов.

Поверхностная активность растворов ФЛ в маслах во всей мере проявляется на границе раздела с полярными растворителями (в частности с водой, сумма которой равна 79,8 Дебая). В данном случае можно говорить о каждой мицелле ФЛ в масле, как о «микрореакторе», в котором особым образом протекают химические реакции [98-101]. Для таких систем характерны такие показатели, как критическая концентрация мицеллообразования (ассоциация) (ККМ или ККА); критические температуры индивидуализации и диссоциации (КТИ и КТД).

Решающим фактором устойчивости мицелл в системе масло – фосфолипиды является энергия взаимодействия ФЛ между собой и ФЛ со средой. Так как молекулы ФЛ более полярны, чем молекулы простых липидов (триацилглицеролов, то энергия связи между фосфолипидами ($E_{\text{ФЛ-ФЛ}}$), больше чем энергия ФЛ со средой ($E_{\text{ФЛ-С}}$), и больше, чем энергия молекул среды между собой ($E_{\text{С-С}}$):

$$E_{\text{ФЛ-ФЛ}} > E_{\text{ФЛ-С}} > E_{\text{С-С}}. \quad (5.1)$$

Особенности химического состава и строения отдельных структур ФЛ, состав среды (триацилглицеролов) влияют на механизм мицеллообразования, определяют степень агрегации, критическую концентрацию ассоциации, ККМ, критическую температуру ассоциации.

Необходимо отметить, что диэлектрическая проницаемость ядра мицеллы (рис. 1.2 в) $\epsilon_{\text{я}}$ выше диэлектрической проницаемости оболочки $\epsilon_{\text{об}}$. Диэлектрическая проницаемость среды $\epsilon_{\text{с}}$ наименьшая:

$$\epsilon_{\text{я}} > \epsilon_{\text{об}} > \epsilon_{\text{с}}. \quad (5.2)$$

В связи с низкой диэлектрической проницаемостью масел ФЛ в такой среде не диссоциируют, а мицеллы не несут зарядов [140]. Однако внутри ядра и оболочки имеются локальные заряды, обусловленные присутствием в структуре ФЛ различных ионных и полярных групп. Можно полагать, что для гидратируемых фосфолипидов при взаимодействии с водой стабильность мицелл меньше, по сравнению с устойчивостью мицелл, образованных с участием негидратируемых форм ФЛ [141].

Рассмотрим в качестве примера взаимодействие фосфатидилхолина с водой, которое в финале реакции приведет к их осаждению, т.е. к превышению ККМ. Следует отметить, что ФХ относится к системам, для которых достижение гелеобразного состояния не требует добавления других полимеров. Гель ФХ формируется низкомолекулярными ПАВ, в качестве которых могут выступать и другие фосфолипиды. Описание равновесных и динамических свойств гелей из ПАВ обычно проводится, исходя из соотношений, полученных в сеточных теориях разбавленных растворов полимеров [154]. Однако Кейтс [143-145] предложил для установления структуры в подобных системах использовать наличие гибких стержнеобразных мицелл, получивших название «червеобразных» (wormlike micelles) «полимероподобных». Эти стержнеобразные мицеллы образуют в объеме раствора трехмерную сетку, обуславливающую вязкоупругие свойства системы. В отличие от полимерных молекул, сохраняющих свою интактность, мицеллярные агрегаты ПАВ [9, 149-153] обратимо диссоциируют. Это способствует возможным перестройкам сеточных структур и определяет изменения в динамических характеристиках ПАВ.

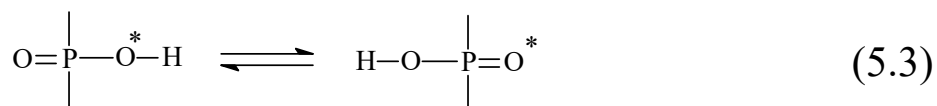
Добавление воды вначале индуцирует трансформацию исходных сферических обратных мицелл фосфатидилхолина (рис. 1.2 в) в эллиптические [146-149]. По этой причине мицеллы ФХ

можно назвать «живыми» или «равновесными» полимерами, т.к. в дальнейшем наблюдается их спонтанный одномерный рост, приводящий к появлению вытянутых стержнеобразных агрегатов. Здесь уместно отметить, что обычные полимеры при определенных условиях также стремятся принять форму «вытянутых» цепочек, обуславливающую наименьшие энтропийные составляющие системы [137, 142].

Можно полагать, что мицеллы фосфатидилхолина в воде в форме стержнеобразных структур имеют минимальную энтропию. Поведение воды в гелевых структурах ФХ не укладывается в сеточную теорию полимеров [154, 150].

В настоящее время авторами [149-150] установлено, что аналогичное воде действие на фосфатидилхолин оказывают такие полярные растворители как этиленгликоль, формамид, глицерин. С помощью ИК-спектроскопии Щипунов с сотр. [149-152] показали, что формирование «полимероподобных» мицелл наблюдается в случае, когда молекулы растворителя имеют возможность образовывать связи одновременно с двумя молекулами фосфолипида, т.е. играют роль связующих «мостиков». С другой стороны, такие полярные растворители как этанол, диэтиленгликоль, диметилформамид, этилендиамин не приводят к образованию мицелл фосфадитилхолина.

Наибольшие изменения при формировании «полимерподобных» мицелл ФХ, как показано в [9] методами ^{31}P -ЯМР, происходят в области фосфатных групп фосфатидилхолина. Об этом свидетельствует уширение сигнала в спектрах ЯМР ^{31}P и его смещение в область слабых полей при взаимодействии с водой, формамидом. Образующиеся Н-связи с участием фосфатной группы фосфатидилхолина (рис. 2.2, 5.1) и гелеобразующими растворителями приводят к агрегации ФХ. Образование Н-связей приводит к перераспределению электронной плотности вдоль цепочки $\text{H}\cdots\text{O}=\text{P}-\text{O}-\text{H}\cdots$. Фактически происходит перераспределение двойной связи между фосфатной группой и молекулами растворителя, в результате для этой группы возможны две граничных структуры:



Результатом подобного динамического равновесия при достаточно активном обмене является уширение линий ЯМР [94], что является дополнительным доказательством образования «мостиковых» структур в системе «фосфатидилхолин – гелеобразующий растворитель» [9] и стабилизации мицелл.

Необходимо отметить, что подобное поведение фосфатных групп можно характеризовать как общее явление, т.к. отмечено не только для фосфатидилхолина, но и для фосфорсодержащих катионитов на основе полистиролфосфиновой кислоты [137] и полистиролфосфоновой кислоты [110] (рис. 5.1). Отличием в этом случае от системы «ФХ – вода» является то, что кроме Н-связи между молекулами воды и ассоциированными кислотными группами, имеются водородные связи между молекулами собственно воды и между H_2O и атомами кислорода кислотных групп. При этом ассоциированные кислотные группы и полимерная матрица стремятся разорвать гидратную структуру, что ведет к росту свободных ОН-групп, чем в «чистой воде».

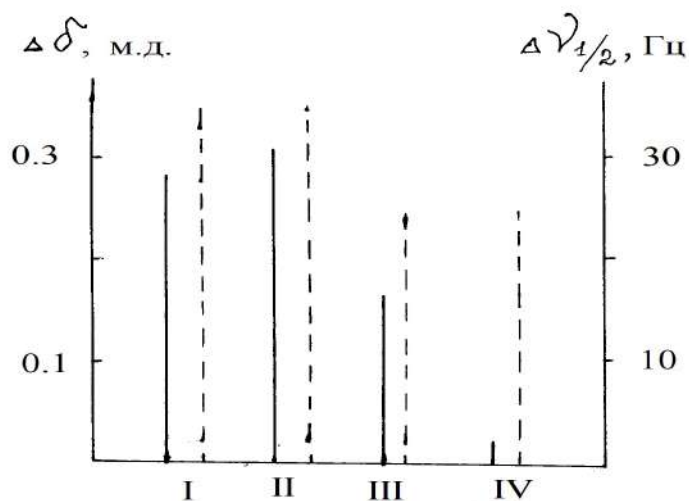


Рис. 5.1. Химический сдвиг (сплошные линии) и полуширина линий (штриховые линии) в спектрах ЯМР ^{31}P 7% раствора ФХ выделенного из сои при соотношении ФЛ/полярный растворитель 1:4.

I – вода; II – формамид; III – диметилформамид; IV – этанол [9]

Обращаем внимание на то, что представленные выше закономерности характерны для катионной формы фосфатидилхолина. Для биполярной формы ФХ в интервале $2,5 \leq \text{pH} \leq 12,0$ гидратация его будет зависеть от структуры ФХ^{\pm} (рис. 3.3). Было бы определенным лукавством учитывать образование Н-связей с водой только остатками фосфорной кислоты ФХ. Если рассматривать фосфатидилхолин в виде катионной формы, то можно полагать, что он будет иметь четыре диполя, одним из которых выступает протонированный остаток фосфорной кислоты (третий диполь схема 5.6).

Две эфирные связи жирных кислот образуют два идентичных диполя в ФХ, в которых кетонная группа $(\delta^+) \text{C}=\text{O}(\delta^-)$ имеет отрицательный избыточный заряд [1, 3, 95, 139]. На схеме 5.6 они обозначены как первый и второй диполи. Четвертый диполь ФХ — остаток четвертичного аммониевого основания. Все вышеназванные четыре диполя (в случае катионной формы ФХ) способны взаимодействовать с H_2O , что способствует стабилизации мицелл фосфолипида при гидратации.

На схеме 5.4 представлен один из вариантов образования «мостиковой» структуры для ФХ и формамида (а) и водой (б) [9].

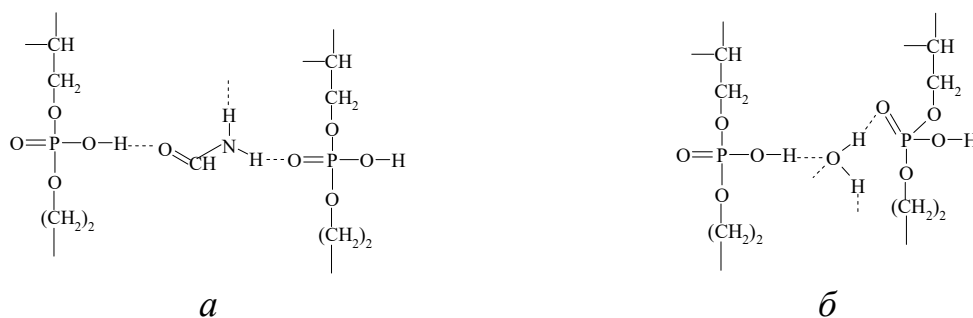


Схема 5.4

На схеме 5.5 представлены варианты существования гидрофильных структур в биполярном ионе фосфатидилхолина, способных взаимодействовать с водой.

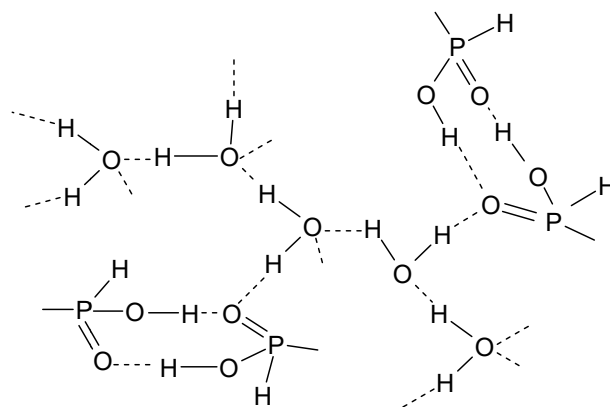


Схема 5.5

На схеме 5.5 представлены гидратные структуры полистирол-фосфиновой кислоты [110].

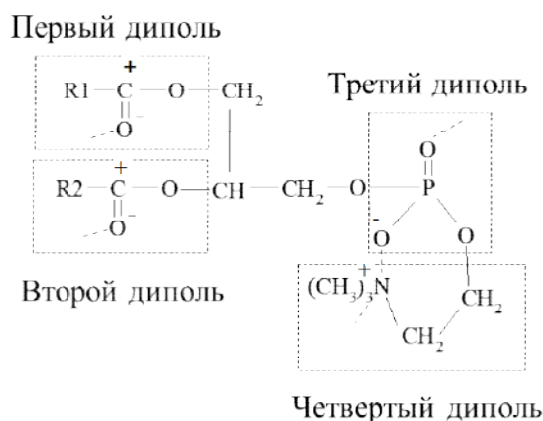


Схема 5.6

В схеме 5.6 не представлены возможные гидратные структуры первого и второго диполей, а также образование Н-связей воды с кислородом групп $\equiv\text{P}=\text{O}$ и $\text{H}_2\text{O}\cdots\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Несколько иная картина будет наблюдаться при гидратации биполярного иона FX^\pm . На схеме 5.6 показано, что цвиттер-ионная форма FX предполагает наличие прочных водородных связей между остатком фосфорной кислоты и бетаиновой группировкой с образованием прочного шестичленного цикла. Фактически это лишает возможности третьему и четвертому диполям активно взаимодействовать с молекулами воды, что приводит к уменьшению устойчивости мицелл фосфатидилхолина в H_2O . Конечным этапом побочного явления выступает разрушение геля и выпадение FX^\pm в осадок [3]. На наш взгляд в этом кроется ос-

новная причина выделения фосфатидилхолина из смеси других ФЛ при гидратационном методе.

При рассмотрении структуры фосфатидилэтаноламина (ФЭА) также можно полагать, что его молекула имеет четыре диполя. Однако, цвиттер-ионная форма ФЭА существует в более узком интервале (по сравнению с фосфатидилхолином) рН ($2,5 \leq \text{pH} \leq 8,5$). Один из возможных вариантов гидратации ФЭА[±] представлен на схеме 5.7. Из этой схемы можно сделать некоторые предположения. Возможность расположения молекул воды

между донорной $^+\text{NH}_3$ и акцепторной группой $\text{O}^--\text{P} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \end{array}$ (по отношению к водороду) увеличивается по сравнению с ФХ[±].

Это вызвано двумя причинами:

1. Наличием 7-членного цикла у ФЭА[±], который менее стабилен по сравнению с 6-членными циклами ФХ[±];

2. Наличием у протонодонорной группировки в четвертом диполе $^+\text{NH}_3$ атомов водорода, способного к образованию Н-связей с молекулами воды [77, 110, 137, 139]. Данные эффекты способствуют увеличению стабильности мицелл ФЭА[±] (по сравнению с ФХ[±]) в воде, что ведет к неполному экстрагированию фосфатидилэтаноламина водой из фосфатидных концентратов.

Возможность гелеобразования при взаимодействии фосфатидилсерина (ФС) с водой лимитируется в основном тем, что образуются стабильные межмолекулярные комплексы между ФС⁻ и водой (схема 5.8). Дело в том, что в условиях выделения (гидратирования) фосфатидилсерин находится в форме однозарядных анионов (схема 5.8), которые гидратируются в большей степени по сравнению с биполярными ионами [1, 8, 18, 108]. Поэтому мицеллы ФС⁻ в воде более устойчивы, чем ФХ[±] и ФЭА[±] и значительная их часть остается в так называемой «негидратируемой смеси» фосфолипидов (или остается в воде в псевдорастворенном состоянии). Авторы [3] располагают «фосфолипиды» по степени убывания гидратируемости в подсолнечных маслах в следующем порядке:



Можно полагать, что термин «по степени убывания гидратируемости» не полностью отражает сущность процессов, происходящих при гидратации масел. Наверное, более корректно в данном случае говорить не только о степени гидратации, но и о стабильности мицелл ФЛ в воде. В ряде случаев для систем «мицелла ФЛ – вода» эти два термина отражают асимбатные физико-химические процессы в гелеобразовании (гидратацию и стабильность мицелл ФЛ в воде и в масле).

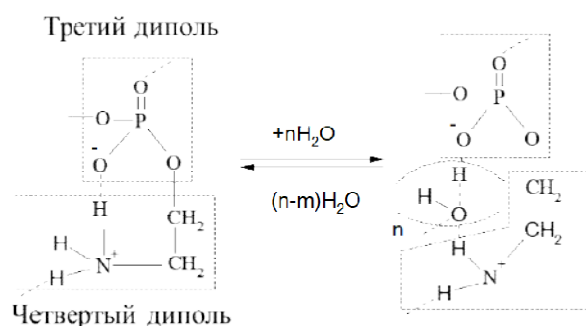


Схема 5.7

На схеме 5.7 представлен один из вариантов гидратации третьего и четвертого диполей фосфатидилэтаноламина в форме ФЭА[±]. Удаление (n-m) H₂O из аквакомплекса означает наличие остаточных гидратных структур в исходном ФЭА (или в процессах его гелеобразования).

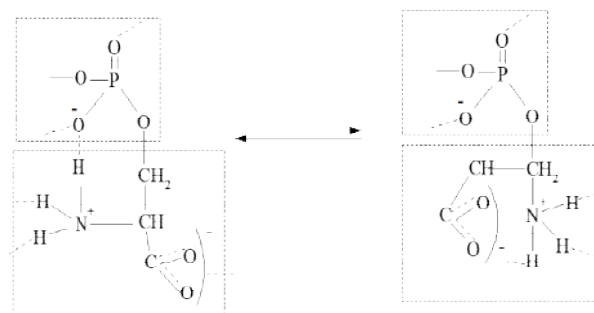


Схема 5.8

На схеме 5.8 показаны возможные трансформации образования циклических структур в однозарядном анионе фосфатидилсерина (ФС⁻). В схеме не указано присутствие молекул воды между донором между донорной группой ⁺NH₃ и акцепторными

группами $\text{O}^--\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2$ и $-\text{COO}^-$ для водорода. Три точки показаны возможные водородные связи ионов с молекулами воды.

Фосфатидилинозитолы (ФИ), фосфатидилглицеролы (КЛ) и полифосфатидные кислоты (ФК), содержащие в качестве четвертого диполя полиоловый фрагмент или остатки фосфорной кислоты (способные нести два отрицательных заряда) (табл. 2.1, рис. 2.1) в наибольшей мере обладают способностью к гидратации. Однако стабильность их мицелл в воде может быть ниже, так как характер связи «мицелла ФЛ – вода» совершенно иной, чем у ФХ, ФЭА, ФС. Фосфатидилинозитолы и фосфатидилглицеролы в области $3,5 \leq \text{pH} \leq 7,0$ находятся в виде однозарядного аниона, т.е. фосфорные группы депротонированы. Поэтому вероятность образования «полимерных мицелл» будет минимальна, а переход в водную фазу из масла предпочтителен.

Фосфатидные, полифосфатидные кислоты, кардиолипид при $\text{pH}=3,5 \div 7,0$ содержат частично депротонированные фосфатные группы (однозарядные анионы) и полностью депротонированные (двухзарядные анионы). Однозарядные анионы ФК, полифосфатидных кислот (ПФК) и дифосфатидилглицеролов (а также КЛ) способны к образованию Н-связей между фосфорнокислыми группами [9] соседних молекул, что придает им стабильность и невыпадение в осадок при гидратации. Та часть ФК, ПФК, КЛ, которая находится в виде двухзарядных анионов, лишена возможности образовывать межмолекулярные Н-связи между фосфорнокислыми группировками. Стабильность этих ионов к осаждению в воде минимальна, а поэтому (как и в случае с ФХ[±] и ФЭА[±]) мицеллы FK^{2-} , PFK^{2-} , KL^{2-} осаждаются при гидратации.

Существование диполей различного состава в отдельных ФЛ подтверждается методом ИК-спектроскопии (рис. 5.2, 5.3). Наличие кетонных групп ($\delta^+\text{C}=\text{O}\delta^-$) первого и второго диполей подтверждается пиками небольшой интенсивности при $1760\text{--}1745\text{ см}^{-1}$ ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$ в кетонах) [97, 110, 139]. Для КЛ характерны четыре подобных диполя [1,55], что в определенной мере объясняет большую интенсивность максимумов при $3420, 3372\text{ см}^{-1}$ (характерных для ассоциатов «вода – вода» с нарушенной структурой и «вода – кетонная группа» [97, 110] соответственно). Третий и четвертый ди-

поли фосфолипидов представляют собой сложные образования из фосфатной группы PO_3^- и групп: триметиламмонийной (ФХ^+); этаноламинной (ФЭА^+); сериновой (ФС^-); инозитоловой (ФИ^-) и протонированной фосфатной группы (КЛ) [1, 55].

Депротонированная фосфатная группа $\text{O}^--\text{P}(=\text{O})_2$ дает колебания при $1100-1040 \text{ см}^{-1}$ и проявляется в спектрах всех ФЛ. В спектре депротонированной фосфатной группы проявляется также интенсивный максимум при 1150 см^{-1} (характерный и для прото-

нированных групп $\text{O}=\text{P}(=\text{O})_2\text{OH}$), который относят к валентным колебаниям $\text{P}=\text{O}$. Общий вид спектров в области $3400-3220 \text{ см}^{-1}$ свидетельствует о том, что депротонированная фосфатная группа образует аквакомплексы различной степени устойчивости. Максимумы при $3265-3226 \text{ см}^{-1}$ относятся к валентным колебаниям H_2O , ассоциированной с группами $\text{P}-\text{O}^-$ (схема 5.9). Можно пола-

гать, что прочность ассоциации $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{O}^--\text{P}(=\text{O})_2$ в определенной степени зависит от присоединенных к фосфорным группам остатков полиола (ФИ , КЛ), азотистого основания (ФХ , ФЭА) или аминокислоты (ФС).

Полосы при 1217 см^{-1} в спектре КЛ (рис. 5.2) отсутствуют на других ИК-спектрах ФЛ, что свидетельствует о наличии в КЛ протонированной фосфатной группы (в отличие от ФХ , ФЭА ,

ФС и ФИ). Как известно [97, 110, 139], $\text{HO}-\text{P}(=\text{O})_2$ взаимодействует с водой, образуя ассоциаты. Об этом свидетельствует наличие в ИК-спектре КЛ интенсивного максимума 3320 см^{-1} (валентные

колебания H_2O , связанной с $\text{HO}-\text{P}(=\text{O})_2$ группами) [97, 110, 139]. В ИК-спектре КЛ имеется широкая полоса при 2317 см^{-1} , обуслов-

ленная валентными колебаниями групп $-\text{OH}$ в $\text{HO}-\text{P}(=\text{O})_2$ группировках с прочными водородными мостиками типа:

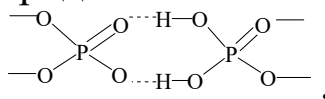


Схема 5.9

Это подтверждается наличием полос при 1260 см^{-1} , характерных для колебаний групп ОН в самих водородных мостиках, образующих сетки гидратных структур [110]. Возможно, это вызвано образованием межмолекулярных ассоциатов гидрофильными группами КЛ.

Для ИК-спектров ФИГ, содержащего полиоловый фрагмент, также характерно образование аквакомплексов не только с фосфатной группой, но и со спиртовыми группами инозита (пики в области $3350\text{--}3340\text{ см}^{-1}$; рис. 5.2) [97, 139].

Таким образом, можно говорить о том, что характерные различия в гидратации рассматриваемых фосфолипидов обусловлены в основном присоединенными к фосфатным группам полиольных остатков (т. е. четвертым диполем).

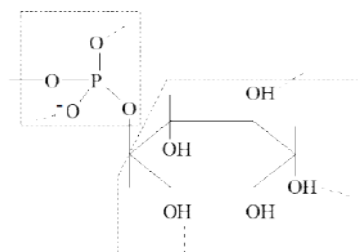


Схема 5.10

На схеме 5.10 показано взаимодействие третьего и четвертого диполей фосфатидилинозитола (ФИГ) с водой (Н-связи с водой указанными точками).

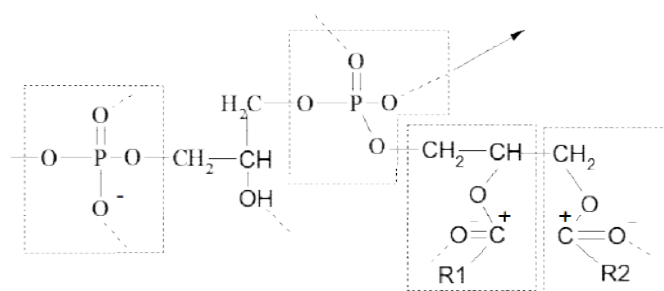


Схема 5.11

На схеме 5.11 показано взаимодействие третьего и четвертого диполей кардиолипина (КЛ) с водой. Стрелкой показана возможность связи между двумя протонированными фосфатными группами и образованием «мостиковой» структуры.

Еще более ярко подобные эффекты проявляются, когда в ФЛ присутствуют остатки азотистых оснований и аминокислот (ФХ, ФЭА, ФС). В ИК-спектрах ФХ^\pm , ФЭА^\pm и ФС^\pm (табл. 5.3, рис. 5.2, 5.3) колебания, характерные для аминогрупп, проявляются в виде пиков, отмеченных для заряженных азотсодержащих группировок:

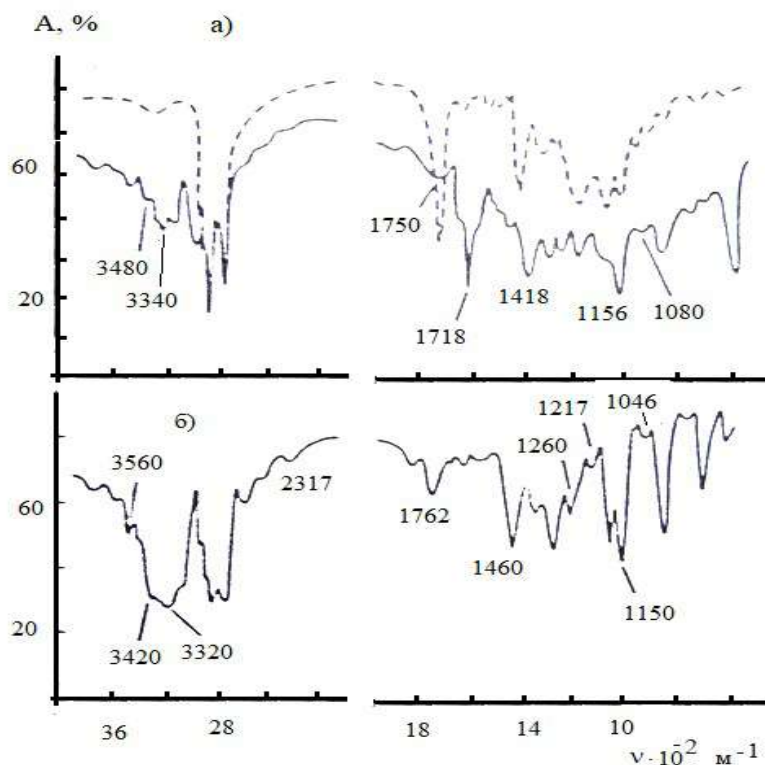
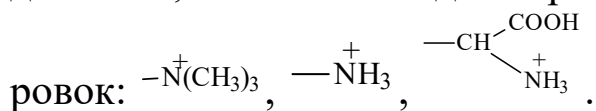


Рис. 5.2. ИК-спектры ФИ (а) и КЛ (б). Штриховой линией обозначен ИК-спектр ФИ по данным [3]

Заряженное четвертичное аммониевое основание не имеет характеристических полос [97, 110] однако при образовании биполярных ионов с участием гидратных структур дает интенсивное поглощение при $3360\text{--}3320\text{ см}^{-1}$ [110]. Поэтому для ФХ имеют место максимумы при 3336 см^{-1} , свидетельствующие о наличии группировки $\equiv\text{P}-\text{O}^-\cdots\cdots^+\text{N}(\text{CH}_3)_3\cdots\cdots\text{OH}_2$ [3, 110].

В ИК-спектрах ФЭА^\pm первичные аминогруппы также образуют в гидратном состоянии биполярные ионы с фосфатными группами $\equiv\text{P}-\text{O}^-\cdots\cdots(\text{H}_2\text{O})_n\cdots\cdots\text{H}_3\text{N}^+$.

Вероятно, они обладают несколько большей энергией, чем в ФХ^\pm , так как максимумы для подобных ассоциатов проявляются при $\nu=3312 \text{ см}^{-1}$ [110, 139]. Кроме того, при 1615 и 1312 см^{-1} проявляются хорошо выраженные полосы (рис. 5.3) характерные для δ_{25} и δ_5 колебаний NH_3 [97, 110].

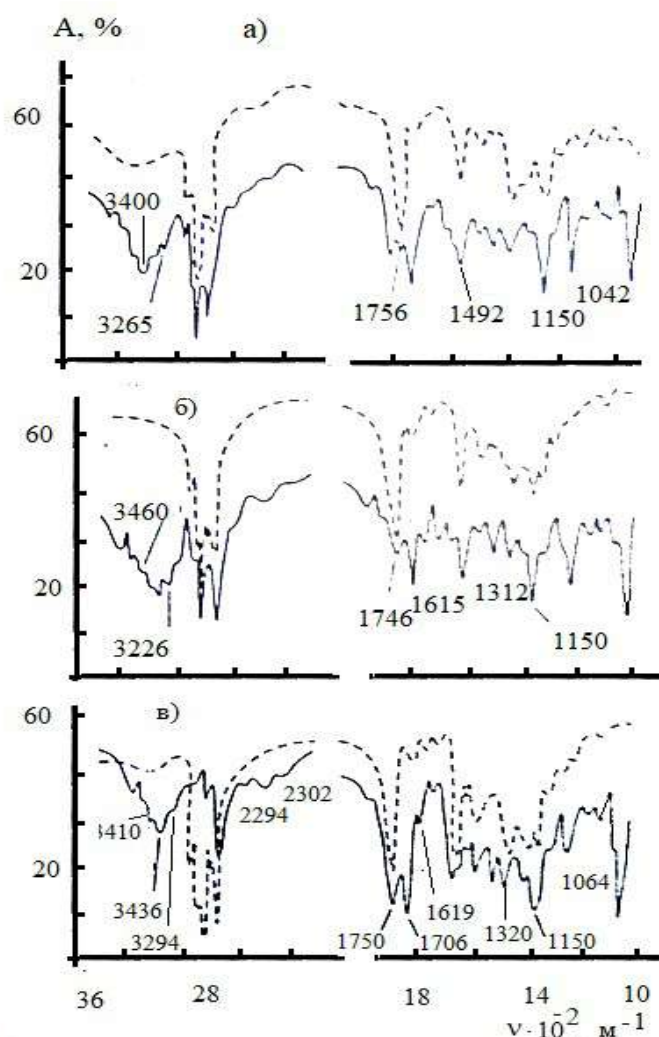


Рис. 5.3. ИК-спектры ФЛ, содержащихся в отдельных электрофоретических зонах фосфолипидного концентрата:

a - ФХ; *б* - ФЭА; *в* - ФС. Штриховыми линиями обозначены ИК-спектры ФХ, ФЭА и ФС по данным [3]

В ФС^- группа Р-ОН испытывает конкурирующее влияние со стороны COO^- -группы при трансформации протона к $-\text{NH}_2$ серинового радикала:

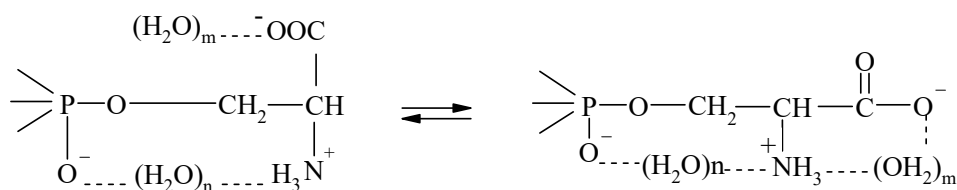


Схема 5.12

В ИК-спектрах ФС^- проявляются хорошо выраженные полосы 1573 ($\delta_{\text{as}} \text{COO}^-$); 1346 ($\delta_5 \text{COO}^-$) при наличии 1620 ($\delta_{\text{as}} \text{NH}_3$); 1320 ($\delta_5 \text{NH}_3$) и 1109 ($\delta_{\text{as}} \equiv \text{P-O}^-$) см^{-1} . Обращает внимание появление в ИК-спектрах ФС^- интенсивного максимума 1706 см^{-1} ($\nu \text{C=O}$ в недиссоциированных группах COOH) [77, 110]. Это дополнительно свидетельствует о сильной акцепторной способности -COO^- по отношению к протонам NH_3 серинового радикала и справедливости схемы 1.15. На основании вышеизложенного, максимумы при 3368 и 3330 см^{-1} (H_2O ассоциированная) могут быть отнесены как к аквакомплексам $\text{-NH}_3^+ \cdots \text{OH}_2$, так и к аквакомплексам $\equiv \text{P-O}^- \cdots \text{H}_2\text{O}$ [110, 139]. Для ассоциатов $\text{OH}_2 \cdots \text{OOC}^-$ (или $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{HOOC-}$) в ИК-спектре ФС характерны полосы поглощения в области 2492 см^{-1} , которые отсутствуют в спектрах других ФЛ [110, 139].

В табл. 5.3 представлены некоторые термодинамические параметры, характеризующие гидратацию индивидуальных ФЛ. Из этих данных следует, что наиболее прочные ассоциаты вода образует с депротонированными фосфатными группировками во всех ФЛ. Энергия связи воды с карбоксилатными группами в ФС^- близка к значениям $E_{\text{OH} \cdots \text{O}}$ в кристаллогидратах [77, 110, 139].

Таким образом, установлено, что решающее влияние на гидратацию фосфатидилипидов оказывает как природа полярных групп способствует образованию «полимерных мицелл» за счет Н-связей между соседними цепочками фосфолипидов и стабилизирует структуру ФЛ в полярных растворителях (вода, формид).

Таблица 5.3. Некоторые термодинамические параметры Н-связей в аква-комплексах ФЛ по данным ИК-спектроскопии

ν , см^{-1}	$\Delta\nu$	E_{H} , кДж/моль	R , А	$-\Delta H$, кДж/моль	$K_{\text{H}}10^5$, см^{-2}	$K_{\text{OH}}10^5$, см^{-2}	$\Delta r_{\text{OH}}10^{-2}$, \AA^0
1	2	3	4	5	6	7	8
Фосфадитилхолин (ФХ[±])							
3610	90	6,38	2,82	13,4	0,890	12,000	0,50
3480	220	15,64	2,79	19,8	2,046	11,566	1,36
3400	300	21,30	2,77	23,6	2,917	10,340	1,62
3336	64	25,87	(2,95)	26,3	-	-	-
3265	435	30,92	2,74	28,7	4,710	9,362	2,33
Фосфатидилэтаноламин (ФЭА[±])							
3612	88	6,26	2,82	13,3	0,863	12,038	0,49
3522	178	12,62	2,80	16,2	1,998	11,720	0,90
3460	240	17,06	2,78	21,0	2,233	10,952	1,27
3384	316	22,46	2,77	24,1	2,937	10,344	1,67
3312	88	27,58	(2,91)	28,4	-	-	-
3226	474	33,70	2,73	29,8	4,346	9,026	2,51
Фосфатидилсерин (ФС[±])							
3500	200	14,22	2,79	19,3	1,890	11,024	1,01
3410	290	20,61	2,77	22,0	2,716	10,233	1,59
3368	32	23,60	(2,99)	25,4	-	-	-
3330	370	26,30	2,95	26,1	3,536	9,867	2,12
3220	480	34,12	2,73	29,9	4,316	9,539	2,60
2492	1208	85,87	2,54	47,2	11,236	3,182	6,41
Фосфатидилинозитол (ФИ)							
3536	164	11,66	2,80	15,3	1,976	11,668	0,86
3480	220	15,64	2,79	19,8	2,046	11,566	1,36
3405	295	20,97	2,77	22,8	3,046	10,286	1,60
3340	360	25,59	2,76	25,7	3,312	10,001	1,90
3238	462	32,84	2,74	30,8	4,336	9,643	2,41
Кардиолипид (КЛ)							
3607	93	6,61	2,82	13,6	0,928	11,900	0,51
3560	140	9,95	2,81	14,9	1,196	11,052	0,70
3420	280	19,90	2,78	20,7	2,612	10,832	1,56
3372	328	23,31	2,77	24,6	3,020	10,275	1,73
3320	380	27,01	2,75	26,2	3,539	9,832	2,03
3260	440	31,28	2,74	27,8	4,121	9,331	2,34
2317	1383	112,06	2,50	52,3	12,372	2,446	6,91

Примечание. $\nu_{\text{O} \dots \text{HO}}^0 = 3700$, $\nu_{\text{NH} \dots \text{O}}^0 = 3400 \text{ см}^{-1}$ [77], $\Delta\nu = \nu^0 - \nu_i \text{ см}^{-1}$. Расчет $E_{\text{H}}R_{\text{OH} \dots \text{O}}$ проводится по формулам, представленным в таблице 5.4 (значения $R_{\text{N} \dots \text{OH}}$ даны в скобках).

Таблица 5.4. Формулы для расчета параметров водородного мостика по величине смещения в ИК спектрах фосфолипидов [77, 139, 156-158].

Параметр	Символ	Единица измерения	Формула для расчета
1	2	3	4
Энергия Н-связи	E_H	кДж/моль	$-\Delta\nu/\nu_{OH}^0 = E_H * 1,6 * 10^{-2}$
1	2	3	4
Энтальпия	ΔH	кДж/моль	$\Delta H = 2,9 \Delta A^{1/2};$ $\Delta\nu = [\Delta A^{1/2}]^2 * 80$
Силовая постоянная Н-связи	K_H	см ⁻²	$K_H = (5,5 \pm 1,2) 10^4 E_H$
Силовая постоянная ОН-связи	K_{OH}	см ⁻²	$-K_{OH} = 8,63(5,5 \pm 1,2) 10^4 E_H -$ $-12,879 * 10^6$
Удлинение ковалентной связи	Δr_{OH}	Å	$\Delta r_{OH} = 5,3 * 10^{-5} * \Delta\nu$
Длина водородного мостика	$R_{OH...O}$ $R_{NH...O}$ $R_{OH...N}$ $R_{NH...N}$	Å Å Å Å	$\Delta\nu = 4,4 * 10^3 (2,84 - R_{O...O})$ $\Delta\nu = 5,48 * 10^2 (3,21 - R_{N...O})$ $\Delta\nu = 6,92 * 10^2 (3,04 - R_{O...N})$ $\Delta\nu^* = 1,05 * 10^3 (3,38 - R_{N...N})$

* $\nu_{OH...N}^0 = 3250 \text{ см}^{-1}$; $\nu_{NH...N}^0 = 3345 \text{ см}^{-1}$;
 $\nu_{NH...O}^0 = 3400 \text{ см}^{-1}$; $\nu_{OH...O}^0 = 3700 \text{ см}^{-1}$;

До этого момента мы не акцентировали внимание при расшифровке ИК-спектров ФЛ на описании колебаний, характерных для алкильных и алкенильных остатков (т.е. гидрофобной части липидов). Однако, хотя в литературе по этому поводу имеются общеизвестные и достоверные данные [1, 3, 18, 20, 132-135, 139, 155], до настоящего времени не обсуждался вопрос о возможности образования Н-связей между CH_2 группами остатков жирных кислот и C=O первого и второго диполей ФЛ. В пользу этого предположения свидетельствуют данные табл. 5.4. Для метильных групп наблюдаются заметные сдвиги при $1471\text{-}1481 \text{ см}^{-1}$ (характерные ножничным колебаниям CH_2 -групп) по сравнению с данными 1467 см^{-1} [3, 47, 97, 110, 139, 167, 257], а также проявляются максимумы при $1090\text{-}1106 \text{ см}^{-1}$ и $609\text{-}614 \text{ см}^{-1}$ (характерные колебаниям $\nu_{O...H}$ и δ_{CH} в циклах с 5 или 6-тью атомами) [257].

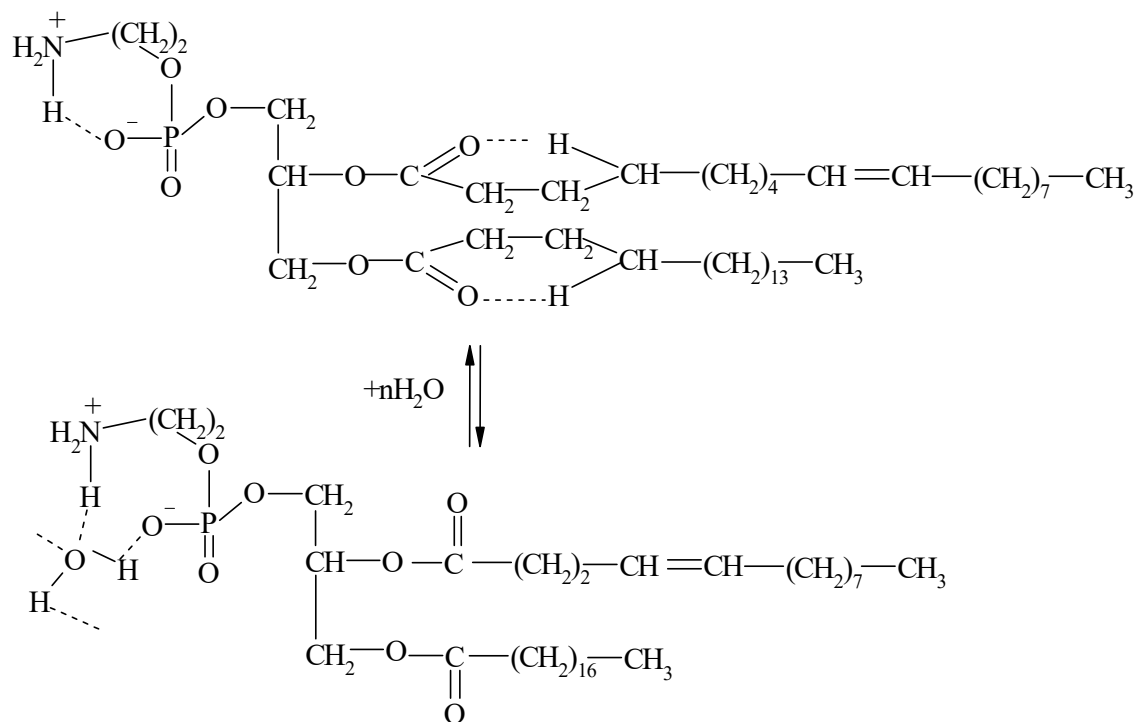


Схема 5.13

В этом случае акцепторами протона при образовании Н-связей выступают группы $=\overset{+}{\text{C}}=\text{O}^-$, а донором протона CH_2 -группы, находящиеся в β - или γ -положении по отношению к $\text{C}=\text{O}$ в первом и втором диполях ФЛ (схема 5.13). Следует заметить, что такие водородные связи будут слабее Н-связей $-\text{O}-\text{C} \leq \cdots \text{H}_2\text{O}$ [246-249, 257] и при гидратации ФЛ подобные циклические структуры будут маловероятны.

Глава 6. Взаимодействия фосфолипидов с ионами металлов

6.1. Электровалентные взаимодействия с участием фосфолипидов

Если исходить из того, что фосфолипиды содержат группы

фосфоновокислые $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ | \\ -\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$, фосфатные $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ | \\ -\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$ и фосфиновокислые $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ | \\ -\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{R} \end{array}$, можно говорить о различном механизме взаимодействия

их с ионами металлов. К ним относятся фосфатидные кислоты (ФК) с группировками $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ | \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$ (табл. 2.1), фосфатидилглицерин

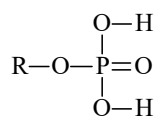
(ФГ) и фосфатидилинозитол (ФИ) с группировками $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ | \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{R}_1 \end{array}$.

Кардиолипин, представляющий производное фосфатидилглицерина, в котором 3'-гидроксил второго остатка глицерина этерифицирован фосфатной группой молекулы фосфатидной кислоты, можно в первом приближении отнести к ФГ. Однако, остов молекулы кардиолипина, включающий три остатка глицерина, связанных друг с другом двумя фосфодиэфирными мостиками через 1- и 3- положения, при $\text{pH} > 8$ имеет два близко расположенных ос-

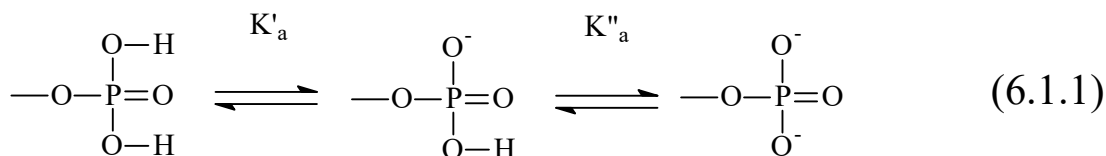
татка с фосфиновокислыми группами $\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ | \\ -\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{R} \end{array}$, которые придают

фосфоглицерину свойства двухзарядного аниона $\begin{array}{c} \text{O}^- \\ | \\ -\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{R}_1-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{R}_2 \end{array}$. Рассматриваемые ФЛ являются обязательными компонентами бактериальных клеточных мембран, а кардиолипин – компонентом в мембранах митохондрий и лоропластов. Их можно соотносить с фосфорсодержащими катионообменниками [186, 190].

Отличительной чертой функциональных групп, имеющих



группировки, является наличие трех активных центров: двух кислотных группировок $-\text{OH}$ и фосфорильного кислорода $=\text{O}$. Природа этих центров в определенной степени противоположна: фосфорильный кислород, обладающий неподеленными электронными парами, может вступать во взаимодействие с ионами (или молекулами), обладающими вакантными орбиталями (ионами переходных металлов или протоном), то есть выступает в роли основания по Бренстеду (протонирование) или Льюису (при взаимодействии с ионами металлов). Гидроксильные группы являются донорами протонов, то есть по Бренстеду обладают кислотной функцией [160, 165, 166], а наличие фосфорильного кислорода приводит к ионно-координационному или координационному взаимодействию с ионами металлов. В щелочных средах фосфатидные кислоты и кардиолипиды в отсутствие ионов-комплексообразователей вступают в реакцию протолиза с уходом двух протонов [174, 176]:



Кажущиеся константы протолиза каждой ступени (pK'_a и pK''_a), рассчитанные по уравнению Гендерсона-Хасельбаха:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \text{nlg}[\alpha/(1-\alpha)] \quad (6.1.2)$$

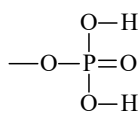
находятся в интервале 1,6-6,2 для фосфатных групп (табл. 2.1). Независимо от колебаний в значениях констант протолиза фосфатных групп ФК, ФГ, ФИ, КЛ можно характеризовать как среднекислотные катионообменники, способные к обмену в слабокислых средах (когда ионный обмен происходит в результате диссоциации фосфоновой группы по первой ступени) и в щелочных средах, где обмен осуществляется при протолизе фосфоновой группы по двум ступеням [244].

Избирательность сорбции ионов металлов не склонных к образованию координационной связи фосфатидными кислотами и

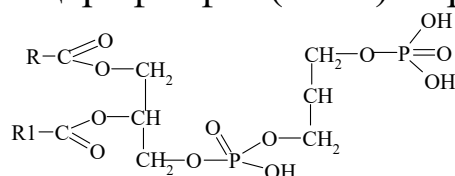
их аналогами обусловлена конкурентной сольватацией иона сорбированного металла между водной вазой и фосфоновыми группами фосфолипида. Сольватирующая способность фосфоновых групп и склонность к поляризации зависит от степени их ионизации (протолиза). Ионизация фосфоновых групп в ФЛ (как в обычных фосфорсодержащих ионообменниках) зависит от pH равновесного раствора, поэтому и избирательность поглощения ионов щелочных металлов определяется pH равновесного раствора [171, 176].

Избирательность сорбции ионов щелочных металлов ФЛ зависит в основном от конкурентной сольватации иона поглощаемого металла между фазой растворителя (воды) и фосфоновыми группами фосфолипида. Сольватирующая способность и склонность к поляризации фосфоновых групп ФЛ зависит от степени их протолиза (табл. 2.1). Как следствие, избирательность сорбции ионов щелочных металлов определяется рН равновесного раствора «ФЛ – вода».

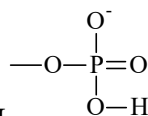
Следует отметить, что фосфатидные кислоты с группировкой



О-Н, фосфатидилглицерофосфат (ФГФ) с группировкой [259]:



фосфоинозитиды (ФИФ), кардиолипин и дифосфатидилгли-



церин (ДФГ) в силу структурной близости групп O^--H способны к протолизу по двум ступеням. Полностью депротонированные фосфоновые группы обладают ярко выраженными сольватационными и поляризационными свойствами по сравнению с сульфогруппами $-\text{SO}_3\text{H}$ и карбоксильными группами $-\text{COOH}$. При обмене ионов щелочных металлов на ион гидроксония H_3O^+ фосфоновыми группами порядок относительного сродства подчиняется ряду Хофмастера:



т.е. в соответствии с уменьшением связывания при увеличении радиуса гидратированного иона. Подобный ряд сохраняется и при взаимодействии этих ионов в кислой среде, что характерно для высокой ионности связи катионов S^1 -металлов с фосфоновыми группами и электростатической природы взаимодействия [160, 165, 166]. Однако в щелочных средах наблюдается обращение ряда взаимодействия:



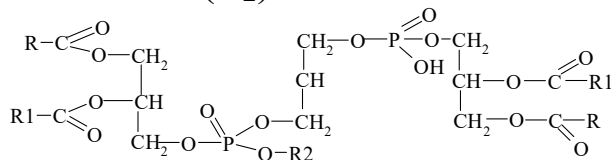
Это объясняется изменением поляризации фосфоновых групп при ступенчатом протолизе. Ведь фосфоновые группы, депротонированные по первой ступени

$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ | \\ -\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$, обладают менее выраженными свойствами по сравнению с полностью депротонированными фосфоновыми группами.

Введение в водный раствор менее полярных органических растворителей (спиртов) уменьшает протолиз фосфоновых групп, но не вызывает заметного обращения сродства к катионам S^1 — металлов.

Взаимодействие ионов щелочноземельных металлов (S^2) с фосфоновыми группами ФЛ проходит преимущественно по ионному механизму (аналогично ионам щелочных металлов). Исключение составляют ионы Be^{2+} . Однако, смещение энергии связи $E_{св}$ электронов P_{2p} фосфоновых групп, связанных с Ca^{2+} и Ba^{2+} отличается от энергии связи «фосфоновая группа — Na^+ » [260], что свидетельствует о некоторой доле ковалентности в образовании ионной связи S^2 металлов с фосфоновыми группами.

Полиолсодержащие ФЛ, такие как ФГ, ФИ и комплекс ДФГ с витамином А (R_2)



являются производными

фосфиновой кислоты $\begin{array}{c} \text{R}' \\ | \\ \text{R}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$ и в определенной степени могут на-

поминать соединения фосфонистой кислоты $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{O—H} \end{array}$ [137, 166]. В растворах они проявляют свойства одноосновных кислот. Фосфиновые и фосфонистые группировки в растворах с большой ионной силой ведут себя как более сильные кислоты по сравне-

нию с первой ступенью протолиза группы $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{O—H} \end{array}$ [172, 261]. В растворах с маленькой ионной силой имеет место обратная закономерность.

Определенное влияние на диссоциацию фосфиновых и фосфонистых остатков оказывает характер соседних групп. Присутствие спиртовых гидроксильных групп увеличивает способность к протолизу фосфорсодержащих группировок. Аналогичное действие на их способность к диссоциации оказывает присутствие $\text{—CH}_2\text{—}$ групп [174]. Поэтому наличие —C—OH и $\text{—CH}_2\text{—}$ остатков вблизи фосфиновых и фосфиновых группировок в ФГ, ФГФ, КЛ, ФК, ФИ,ДФГ обуславливает их повышенную кислотность (как и в случае с фосфатными полимерами на основе поливиниловых спиртов, а также сополимеров стирола с ДВБ [262, 263]) (табл. 2.1).

Заслуживает внимания закономерность, характерная для полиолсодержащих ФЛ, которая роднит их с полистиролфосфоновыми кислотами: чем ближе расположены функциональные фосфорсодержащие группы, тем больше их кооперативное влияние друг на друга [137, 76, 186], чем ближе расположены указанные группы, тем в наибольшей степени протолитическое влияние друг на друга. Для таких полиолсодержащих ФЛ как ФГФ, ФИФ, КЛ подобный эффект проявляется в наибольшей степени (табл. 2.1). С ростом степени нейтрализации фосфорсодержащих групп

этих ФЛ затруднен протолиз еще не ионизированных групп $\begin{array}{c} \text{O—R} \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{O—H} \end{array}$.

В определенной мере процессы протолиза и гидратации фосфатных и фосфинокислых групп могут быть подтверждены спектральными исследованиями ионообменников [137, 174]. В ИК-спектрах этих сорбентов при увеличении степени гидратации

проявляется полоса 3390 и 2550 см^{-1} . Наряду с этим, наблюдаются плечо около 3200 см^{-1} и широкая полоса при 1170 см^{-1} . Указанные полосы поглощения характеризуют валентные и деформационные колебания H_2O , ассоциированных между собой или с анионами. При этом поглощение при 3200 см^{-1} может быть обусловлено обертоном ножничных колебаний молекулы воды (рис. 6.1.1.-6.1.3) [137].

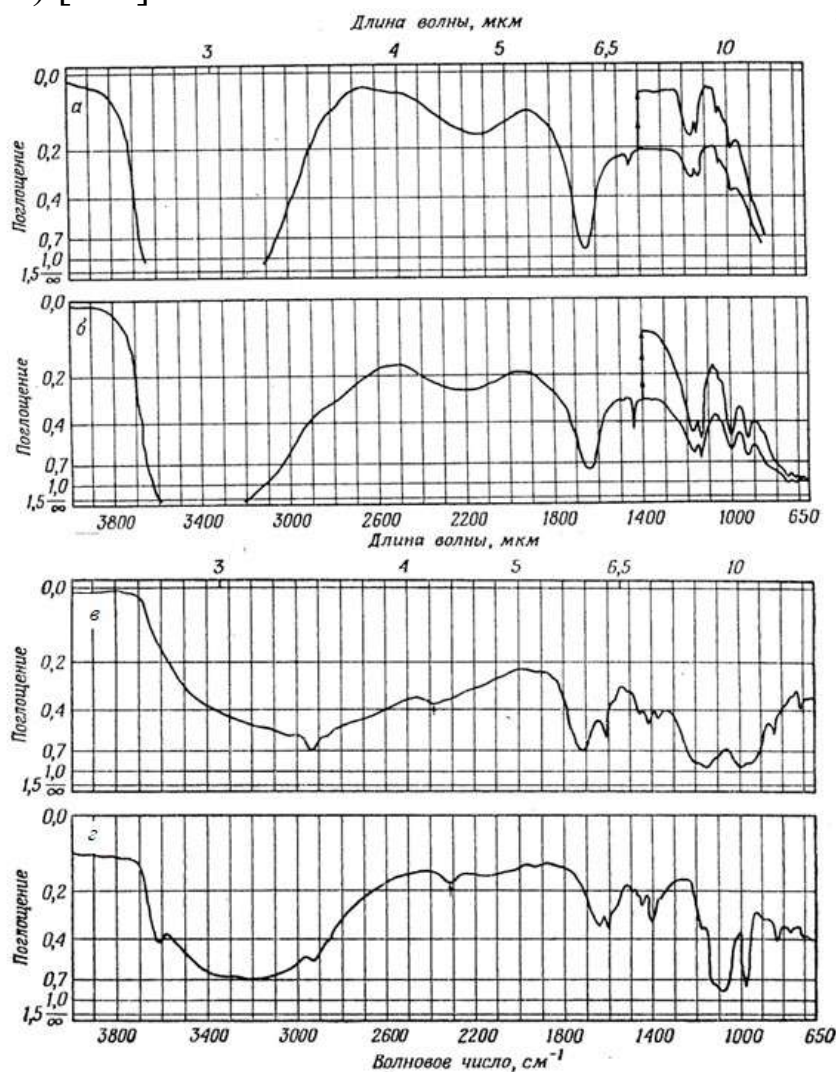


Рис. 6.1.1. ИК-спектры поглощения: а - *n*-бензолфосфиновая кислота, насыщенный водный раствор; б - *n*-бензолфосфоновая кислота, насыщенный водный раствор; в - полистиролфосфоновая кислота; з - натриевая соль полистиролфосфоновой кислоты [137, 264].

При гидратации полистиролфосфиновой и полистирол фосфоновой кислот обнаруживаются слабые полосы при 3640 и 3505 см^{-1} соответственно (рис. 6.1.3), которые можно отнести к кова-

лентным колебаниям групп $-\text{OH}$ с одной или двумя H -связями [77, 156-158]. Следовательно, в рассматриваемых анионитах может существовать ассоциация между кислотными группами и молекулами воды; между самыми кислотными группами и между, соответственно, молекулами воды. Но гидратная сетка с H -связями имеет значительное количество разрывов [137]. Результирующая схема гидратной сетки полистиролфосфиновой кислоты может быть представлена схемой. 6.2.

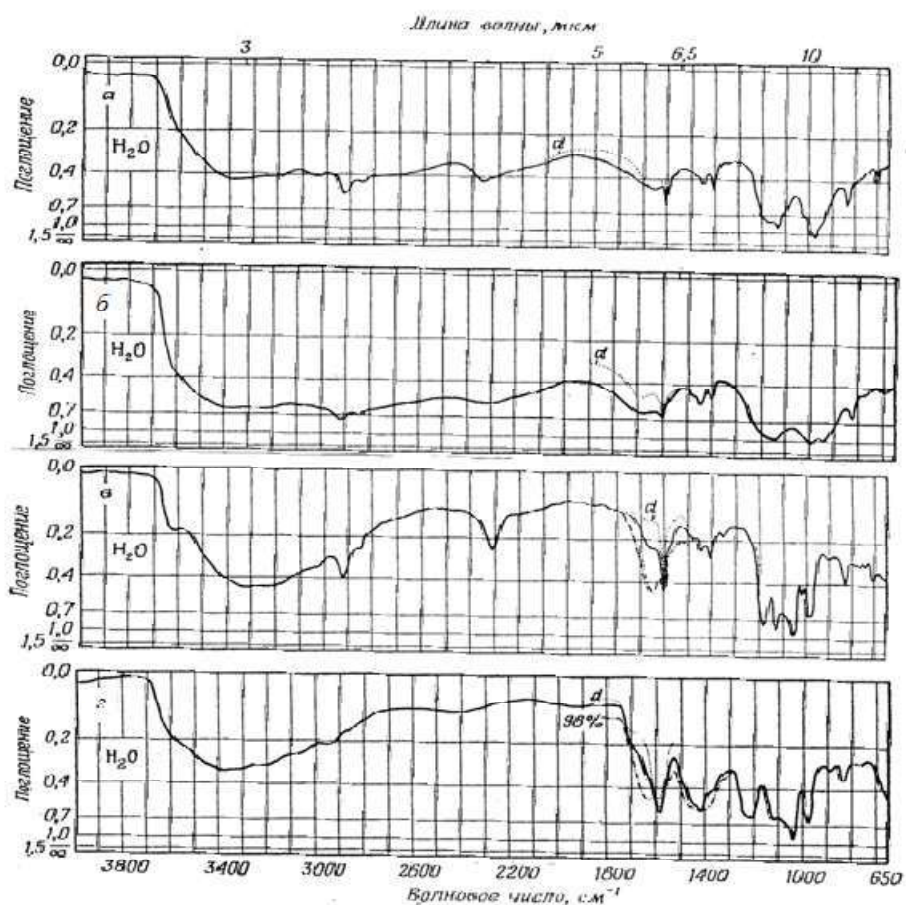


Рис. 6.1.2. ИК спектры поглощения:

a - полистиролфосфиновая кислота, гидратированная H_2O ; пленка при 98% относительной влажности; полностью высушенная пленка (*d*); *б* - полистиролтиофосфоновая кислота, гидратированная H_2O ; — при 98% относительной влажности; ··· полностью высушенная пленка (*d*); *в* - натриевая соль полистиролфосфиновой кислоты (степень сшивания 7%, 3 сут. фосфирования), гидратированная H_2O : - · - · - пленка при 98% относительной влажности; — при 11% относительной влажности; ··· полностью высушенная пленка (*d*); *г* - натриевая соль полистиролтиофосфоновой кислоты (степень сшивания 7%, 3 сут. тиофосфирования), гидратированная H_2O : - · - · - пленка при 98% относительной влажности; — при 11% относительной влажности; ··· полностью высушенная пленка (*d*) [137].

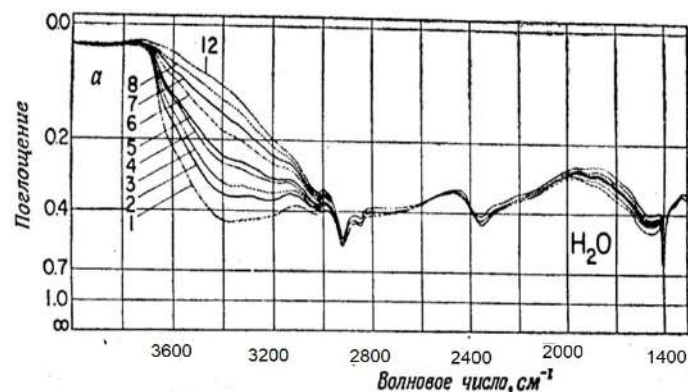


Рис. 6.1.3 а. Полистиролфосфиновая кислота (степень сшивания 7%, 3 сут. фосфирования), гидратация H_2O :
1 – 98%; 2 – 71%; 3 – 53%; 4 – 33%; 5 – 22%; 6 – 11%; 7 – 5%; 8 – 1% относительной влажности; 12 – полностью высушенная пленка.

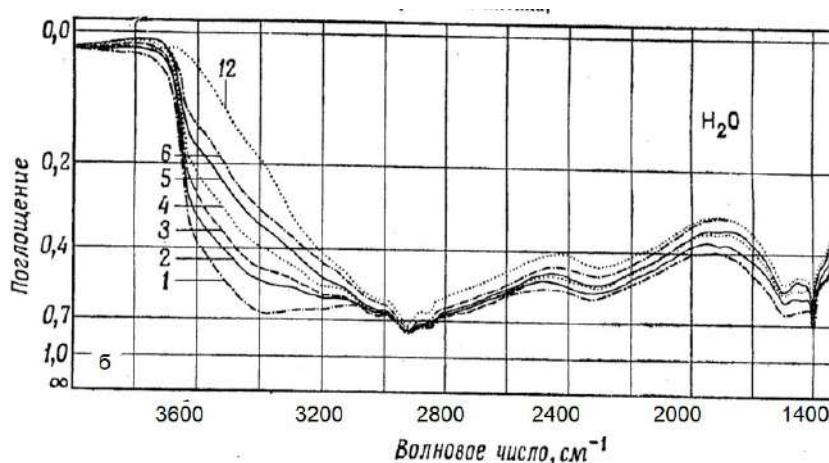


Рис. 6.1.3 б. Полистиролтиофосфоновая кислота (степень сшивания 7%, 3 сут. тиофосфирования), гидратация H_2O :
1 – 98%; 2 – 71%; 3 – 53%; 4 – 33%; 5 – 24%; 6 – 11% относительной влажности; 12 – полностью высушенная пленка [137].

Ассоциированные кислотные группы $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{O—H} \end{array}$ и сетка полимера стремятся разрушить гидратную структуру H_2O . Этому процессу способствует то, что одна из неподеленных электронных пар атома кислорода в анионе, которая могла бы участвовать (быть акцептором) в образовании Н-связи с молекулами воды, уже принимает участие в водородной связи между двумя кислотными

группами $\begin{array}{c} \text{O—R} \\ | \\ \text{—P=O} \cdots \text{H—O} \\ | \quad \quad | \\ \text{O—H} \cdots \text{O=P—} \\ | \\ \text{R—O} \end{array}$ [137]:

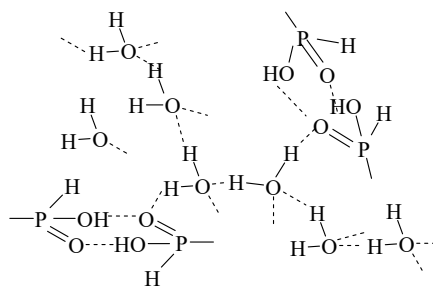
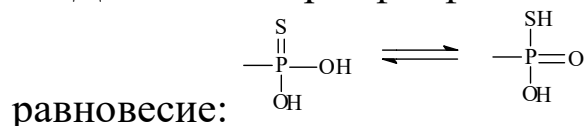


Схема 6.1. Гидратные структуры полистиролфосфиновой кислоты.

Для полистиролфосфиновой кислоты характерно таутомерное



При этом группы $\begin{array}{c} \text{SH} \\ | \\ -\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ ассоциированы прочными Н-связями

даже при максимальном увлажнении [137]:

$$\begin{array}{c} \text{SH} \\ | \\ -\text{P}=\text{O} \cdots \text{HO} \\ | \quad \quad | \\ \text{OH} \cdots \text{O}=\text{P}- \\ | \\ \text{SH} \end{array}$$

Наряду с этим, часть кислотных протонов при увеличении степени гидратации отрывается от анионов и может участвовать в туннельных переходах гидратных структур, давая слабое непрерывное поглощение (рис. 6.13 б). Можно полагать, что в этом процессе участвуют «внешние» молекулы гидратной воды (схема 6.2), окружающие туннельный протон, а также молекулы H_2O , образующие водородные связи друг с другом или с атомами кислорода кислотных групп [137].

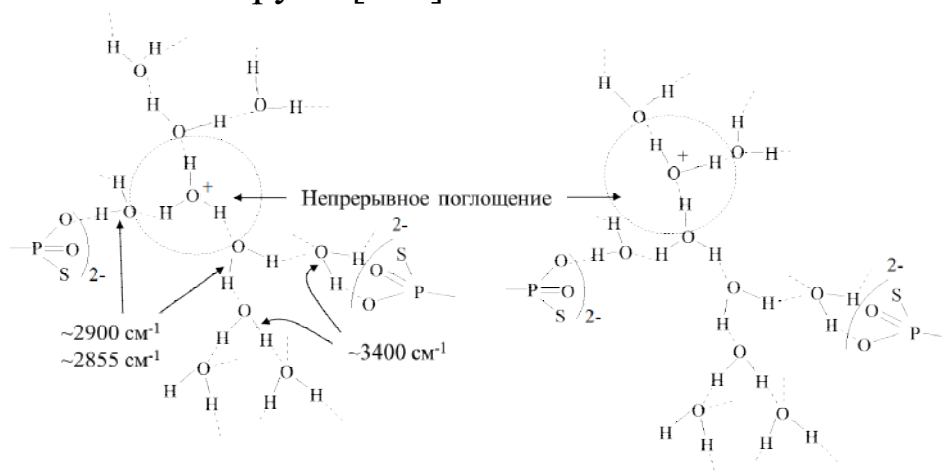
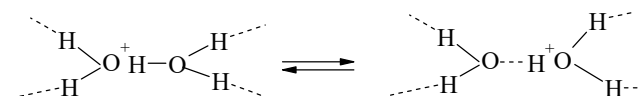


Схема 6.2. Группы H_9O_4^+ в сетке гидратной структуры полистиролтиофосфиновой кислоты (для простоты показан только один избыточный протон).

Выше указано, что в сетке гидратных структур имеется много свободных ОН-групп, то есть гидратная структура полистиролтиофосфоновой кислоты разупорядочена, как и в случае полистиролфосфиновой кислоты. Следует отметить, что определенный вклад в нарушение гидратной структуры вносит атом серы тиогруппы, который имеет значительно меньшую протонакцепторную способность по сравнению с атомами кислорода. Поэтому для полистиролфосфоновой кислоты (рис. 6.1.1) характерно явное непрерывное поглощение в области $3700-2600\text{ см}^{-1}$ за счет туннельных переходов протона в гидратных структурах [137]:



Следовательно, природа сетки гидратных структур полистиролфосфиновой, полистиролтиофосфоновой и полистиролфосфоновой кислот зависит от структуры анионов.

Гидратация солей натрия с этими катионообменниками дает новую информацию о влиянии анионов на образование сетки Н-связей в полимерах. В области $3700\text{ см}^{-1} - 3000\text{ см}^{-1}$ для Na-полистиролфосфината при высокой влажности наблюдается интенсивное поглощение (рис. 6.1.2 в). Аналогичное поглощение характерно и для Na-полистиролтиофосфаната, но в области $3700 - 2750\text{ см}^{-1}$ (рис. 6.1.3 б) и Na-полистиролфосфаната - $3700-2600\text{ см}^{-1}$ (рис. 6.1.1 г). При этом волновое число максимума широкой интенсивной полосы поглощения гидратной воды для натриевых солей соответствующих кислот (при наличии одной или двух мо-

лекул H_2O) имеет следующее значение: $\left(\begin{array}{c} \text{S}^{2-} \\ \diagup \\ \text{P} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right)^{2-} - 3395\text{ см}^{-1}; \left(\begin{array}{c} \text{H}^- \\ \diagup \\ \text{P} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right)^{-} - 3335\text{ см}^{-1} \left(\begin{array}{c} \text{O}^{2-} \\ \diagup \\ \text{P} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right)^{2-} - 3312\text{ см}^{-1}.$

В области антисимметричных валентных колебаний вместо одной полосы $\text{P}=\text{O}$, которая наблюдается для вышеназванных кислот, наблюдаются дублеты в их Na-солях, величина расщепления которых равна 6, 21 и 59 см^{-1} соответственно Na-полистиролфосфинату, Na-полистиролтиофосфанату и Na-полистиролфосфанату, т.е. растет в соответствии с акцепторной

активностью атомов кислорода аниона к образованию водородной связи (или с ростом поляризуемости анионов). Это указывает на то, что присутствие катиона снимает вырождение [137]. С одной стороны, это связано с участием массы катиона в колебании анионов фиксированных групп. С другой стороны, присутствие катиона и его влияние на электростатическое поле аниона, нарушает локальную симметрию и, соответственно, снимает вырождение, давая дублет.

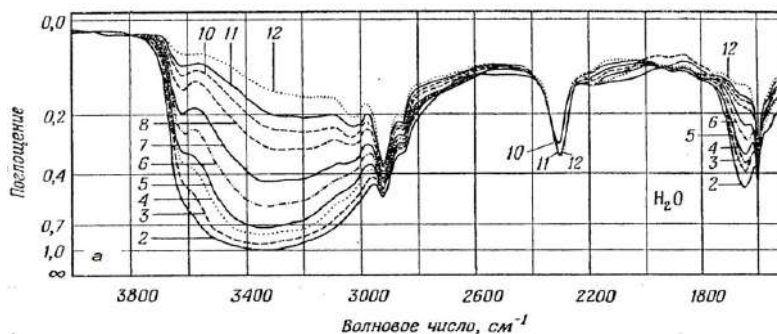


Рис. 6.1.4 а. Натриевая соль полистиролфосфиновой кислоты (степень сшивания 7%, 3 сут. фосфирования).

Гидратация H_2O : 2 - 71%; 3 - 53%; 4 - 33%, 5 - 22%; 6 - 11%, 7 - 5%, 8 - 1% относительной влажности; 10, 11 - образец после неполного высушивания; 12 - полностью высушенная пленка [137].

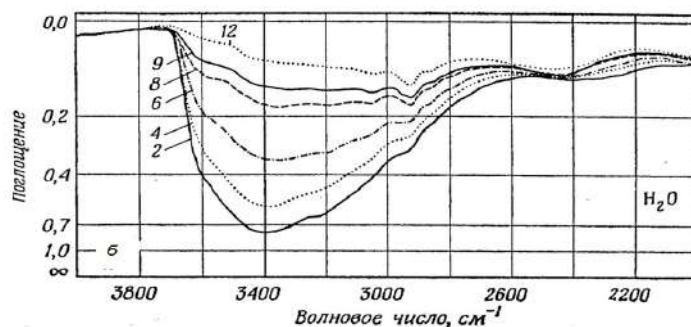


Рис. 6.1.4 б. Натриевая соль полистиролтиофосфоновой кислоты (степень сшивания 7%, 3 сут тиофосфирования, снятие спектра производилось через три месяца после получения пленки).

Гидратация H_2O : 2 - 71%, 4 - 33%, 6 - 11%, 8 - 1% относительной влажности; 9 - образец после неполного высушивания; 12 - полностью высушенная пленка [137].

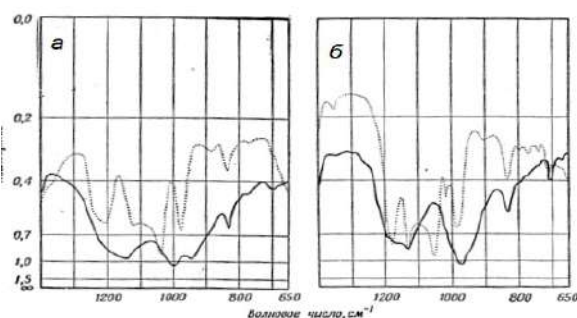


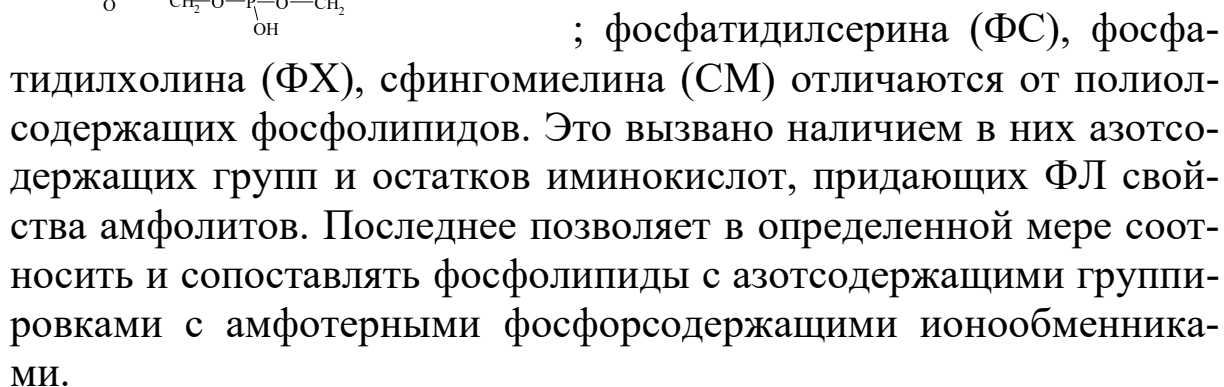
Рис. 6.1.5. ИК-спектры: *а* – полистиролтиофосфоновой; *б* - полистиролфосфиновой кислот (—) и их солей (·····)[137].

Таблица 6.1.1. Полосы кислотных групп и анионов фосфорсодержащих ионитов [97, 137].

Соединение	Кислоты		Натриевые соли
	Сильно гидратированные	Полностью высушенные	Полосы поглощения
Полистиролтиофосфоновая кислота и ее соль	1170 см ⁻¹ , валентное колебание РО-двойной связи группы $\begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \\ \text{—P=O} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$		1218, 1212 и 1037см ⁻¹ , антисимметричные и симметричное РО-колебание иона $\left(\begin{array}{c} \text{S} \\ \diagup \\ \text{—P=O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right)^{2-}$
Полистиролфосфоновая кислота и ее соль	1148 см ⁻¹ , валентное колебание РО-двойной связи несколько сдвигается при тщательном высушивании 1026, 938 см ⁻¹ , валентное колебание РО-одинарной связи группы $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—P—OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$		1155, 1096 см ⁻¹ , антисимметричные валентные колебания 970 см ⁻¹ симметричное валентное колебание иона $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—P=O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \right)^{2-}$
Полистиролфосфиновая кислота и ее соль	1170 см ⁻¹ , валентное колебание РО-двойной связи 956 см ⁻¹ , валентное колебание РО-одинарной связи группы $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{—P=O} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$		1183, 1162 и 1056 см ⁻¹ , антисимметричные и симметричное РО-колебание иона $\left(\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{—P=O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} \right)^{-}$

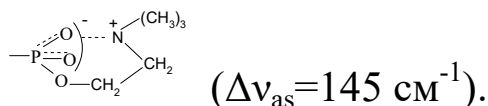
Таким образом, ФК, ФГФ, ФИФ с группами $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—P—OH} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ и КЛ с $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—P—OH} \\ | \\ \text{OR} \end{array}$, как и полимерные сорбенты с фосфатными группами, обладают подобными гидратными и протолитическими свойствами. ФГ, и комплекс ДФГ с витамином А, подобно фосфинокислым катионообменникам,

Кисотно-основные и гидратационные свойства фосфатидил-дилэтанолamina (ФЭ); фосфатидил-О-аминоглицерина с остатком лизина (ФААГ)

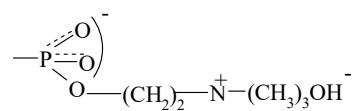


Ранее уже были затронуты вопросы о гидратации ФЛ, однако для азотсодержащих фосфолипидов имеется ряд особенностей по их взаимодействию с водой, анионами и катионами, которые требуют пояснений. В ИК-спектре фосфатидилхолина в виде биполярного иона (FX^{\pm}) и аниона (FX^-) в отличие от катионной формы наблюдается дублет, характерный для солевых форм фосфатов[77, 110, 137] (рис. 6.1.6). Для FX^{\pm} пики 1226 и 1081 см^{-1} со-

ответствуют антисимметричным валентным колебаниям $\text{P}=\text{O}$ иона $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{P}=\text{O} \end{array} \right)^-$ в шестичленном цикле, образованном третьим и четвертым диполями ФХ :



При взаимодействии с NaOH ФХ^\pm превращается в анион ФХ^- :



Для ФХ^- характерен дублет с пиками 1229 и 1085 см^{-1} (т.е. $\Delta\nu_{\text{ад}} = 144 \text{ см}^{-1}$). Подобное положение дублетов в ИК-спектрах ФХ^\pm и ФХ^- согласно Цунделю [137] свидетельствует о большой ста-

бильности $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{OR} \end{array} \right)^-$ солевых форм фосфатидилхолина. Необходимо отметить, что подобные процессы характерны и для фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина.

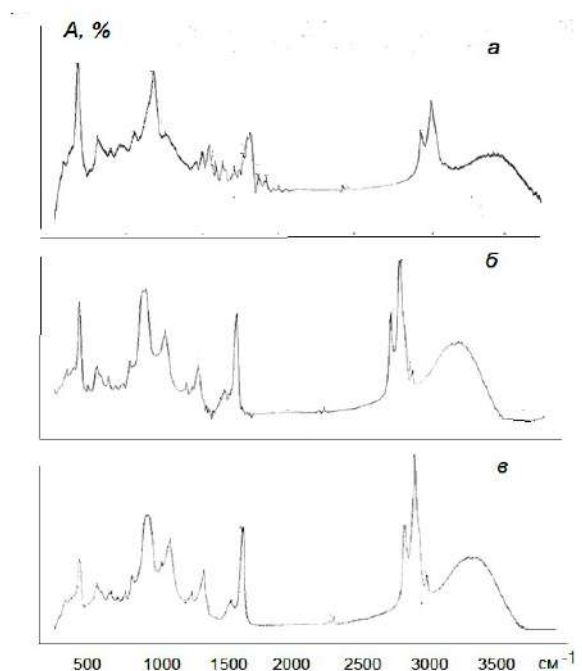


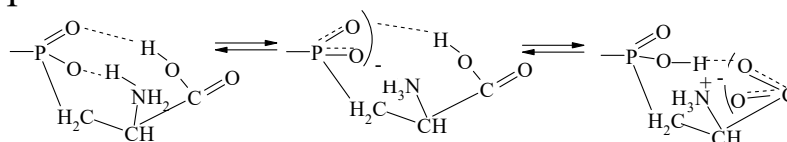
Рис. 6.1.6. ИК-спектры ФХ при pH=2 (а), pH=7 (б), pH=12 (в).

Более сложные процессы при образовании Н-связей имеют место для ФЛ, содержащих в гидрофильной части остатки аминокислот. В ИК-спектре однозарядного аниона фосфатидилсери-

на проявляется ярко выраженный дублет при 1221 и 1064 см⁻¹, который ранее был отнесен к антисимметричным валентным колебаниям P=O в $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---}(\text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O})\text{---} \\ \parallel \\ \text{OR} \end{array} \right)$ в биполярных ионах и анионах фосфолипидов с остатками азотистых оснований. Однако, в случае ФХ⁻ проявляется аномально большое значение расстояния между антисимметричными колебаниями в дублете $\Delta\nu_{\text{ад}}=157$ см⁻¹. Объяснение этому явлению можно найти, исходя из того, что в ФС наряду с фосфиновокислыми остатками содержатся группы -COOH, способные к донорству протона.

В рассматриваемом случае имеет место система с соотношением протонодонорных групп $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---P---OH} \\ \mid \\ \text{R} \end{array}$, $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---OH} \end{array}$ и протоноакцепторных групп $\text{---}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$ как 2:1. Предположение о существовании комплекса 2:1 находится в соответствии с работой [265], в которой установлено, что в системе с избытком кислот происходит больший перенос протона к основанию, чем в соотношении 1:1.

В спектре ФС наблюдается интенсивный максимум при 1706 см⁻¹, характерный колебаниям C=O в группах -COOH. Однако часть карбоксильных групп вступает во взаимодействие с аминогруппами $\text{---}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$, образуя биполярные структуры. В пользу этого говорит наличие максимумов 1619 и 1320 см⁻¹ (группы -COO⁻) и 1536 см⁻¹ группировки $\text{---}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$. В то же время, при 3102 см⁻¹ имеется полоса -OH валентных колебаний в связях (-OH...O). Образование новых активных центров в ФС можно представить следующим образом:



Необходимо отметить, что в отличие от системы, представленной в [265], где Н-связи носят межмолекулярный характер, в фосфатидилсерине из-за «избытка» кислотных групп образования водородных связей являются внутримолекулярными процессами.

Таким образом, при электрoвалентных взаимодействиях между фосфолипидами и ионами щелочных металлов значительную

роль играют водородные связи, как межмолекулярные, так и внутримолекулярные.

6.2. Взаимодействие фосфолипидов с поливалентными ионами металлов

6.2.1. Влияние центрального атома на устойчивость комплексов

В ФЛ растительных масел присутствует значительное количество ионов поливалентных металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} и др.). Их наличие и концентрация в ФЛ зависит от типа масличного растения, ареала произрастания, условий выращивания.

Таблица 6.2.1. Содержание (%) ионов металлов в гидратируемых ФЛ

Фосфолипиды	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cu^{2+}	Fe (общее)	Сумма
Подсолнечные	0,371	0,209	$0,3 \cdot 10^{-3}$	0,035	1,159
Соевые	0,012	0,021	$0,9 \cdot 10^{-3}$	0,015	1,011

Таблица 6.2.2. Содержание ионов щелочноземельных и переходных металлов в ФЛ подсолнечных и соевых масел (% к навеске ФЛ [3])

Группа ФЛ	Подсолнечные масла					Соевые масла			
	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cu^{2+}	Fe (общ)	Al^{3+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cu^{2+}	Fe (общ) *****
ФИ*	0,080 / 0,107	0,125 / 0,142	0,00 / следы	0,018 / 0,001	0,00 / 0,001	0,00 / 0,88	0,00 / 1,95	0,00 / 1,10	0,00 / 0,57
ФХ и ЛФХ**	0,00 /	0,00 /	0,00 /	0,00 /	0,00 /	0,00 /	0,00 /	0,00 /	0,00 /
ФЭА и ЛФЭА	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / следы	0,00 / 0,00
ФС и ЛФС	0,135 / 0,052	0,050 / 0,107	0,002 / 0,01	0,020 / 0,069	0,00 / следы	0,04 / 1,25	0,08 / 3,75	0,005 / 0,200	0,10 / 0,85
ФК и ЛФК	0,435 / 0,850	0,150 / 0,220	0,00 / следы	0,015 / 0,020	0,00 / 0,002	0,01 / 0,95	0,02 / 2,05	Следы / следы	Следы / 0,95
ПФК***	0,00 / 0,117	0,028 / 0,056	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,70	0,00 / 2,75	0,00 / 0,05	0,00 / следы
ДФГ****	0,012 / 0,005	0,059 / 0,087	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,00 / 0,00	0,03 / 0,30	0,05 / 2,11	Следы / следы	0,00 / 0,95

* В числителе приведены гидратируемые ФЛ; в знаменателе - негидратируемые ФЛ.

** Символ Л означает лизоформу ФЛ.

*** ПФК – полифосфатидные кислоты.

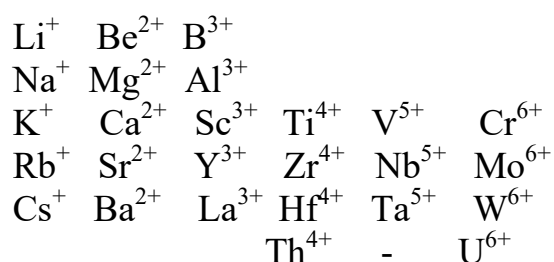
**** ДФГ – дифосфатидилглицерин.

***** Наряду с приведенными в табл. 6.2.2 ионами Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} в фосфолипидных комплексах могут содержаться ионы Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Cr^{3+} и др.

В табл. 6.2.1-6.2.2 приведены некоторые данные по содержанию ионов металлов в ФЛ подсолнечных и соевых масел [1, 196, 198, 199]. В данном случае следует говорить о необходимости рассмотрения роли центрального атома на устойчивость комплексов.

По способности к комплексообразованию катионы металлов можно разбить на определенные группы:

Группа 1а (А-Катионы) включает катионы с электронной оболочкой инертного газа



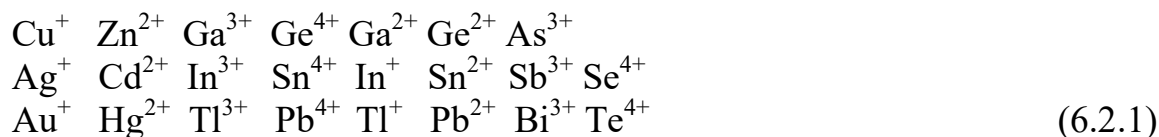
А-катионы (или жесткие кислоты) образуют в водных растворах устойчивые комплексы или труднорастворимые осадки, которые представляют собой полиядерные комплексы с F⁻; OH⁻; O²⁻; H₂O. При этом особое значение придается образованию хелатов, понятие о которых впервые в 1920 г ввели Морган и Дрю, имея в виду, что лиганд охватывает центральный атом двумя или несколькими «зубцами» (донорными атомами) как клешней (от греческого слова chele – коготь, крабовая клешня). Прочные хелатообразующие реагенты для А-катионов содержат по крайней мере

один атом кислорода (>C=O ; >C-OH ; -COOH; -O-P(=O)(OH)_2 ; >N-OH (и др.). А-катионы растворяются и сольватируются только в растворителях, содержащих кислород в качестве донорного атома (воде, низших спиртах, карбоновых кислотах, аминокислотах, амидах карбоновых кислот, диметилсульфоксиде). Комплексообразующие анионы по возрастанию устойчивости с А-катионами располагаются в ряд: F⁻ > О-хелат > OH⁻ > H₂O > N-хелат > Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ > NH₃ > S-хелат > S²⁻ [138].

Лантаноиды и актиноиды, которые имеют от 1 до 13 электронов выше оболочки ближайшего инертного газа, по поведению не отличаются от катионов группы А. Ряд катионов переходных металлов (группа 2Б) Cr³⁺, Co³⁺, Fe³⁺, Ir³⁺ также относятся к «жест-

ким кислотам», рассматриваемые в первом приближении как жесткие, недеформируемые шарики.

Б-катионы относят к «мягким» и легкодеформируемым (легко поляризуемым) кислотам; к ним относят катионы с 10 или (10+2) электронами на валентной оболочке, а также элементы с электронной оболочкой $Ni^{\pm 0}$; $Pd^{\pm 0}$; $Pt^{\pm 0}$; $Zn^{\pm 0}$; $Cd^{\pm 0}$; $Hg^{\pm 0}$:



Б-катионы группы 2Б (катионы переходных металлов трех переходных периодов) содержат от 1 до 9 электронов выше структуры ближайшего инертного газа (за исключением Hf^{4+}). Промежуточное положение между «мягкими» и «жесткими» кислотами занимают Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} и др. Ионы Co^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Ir^{3+} относят к «жестким» кислотам.

Б-катионы обладают сродством к сере и азоту. Устойчивость комплексов возрастает с уменьшением электроотрицательности донорных атомов: S-хелат > S^{2-} > N-хелат > I^- > Br^- > Cl^- > NH_3 > OH^- > H_2O > F^- [138].

Для хелатов, образованных двухзарядными катионами M^{2+} , установлен ряд устойчивости Ирвина-Вильямса: $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+}$. При отсутствии специфических стерических эффектов этот ряд соблюдается для комплексообразования со следующими хелатообразующими реагентами: O, O – реагенты (щавелевая кислота, салициловый альдегид, ацетилацетон); N, O – реагенты (8-оксихиноин; хинальдиновая кислота; пиридин-2-карбоновая кислота); N, N – реагенты (1,10-фенантролин, этилендиамин, дипиридил); N, O, O – реагент (метиламиноуксусная кислота); N,O,O,S – реагенты (метилтиоэтиленаминодиуксусная кислота); N,N,N,N – реагенты (триаминоэтиленамин).

Зависимость донорных составляющих на устойчивость комплексов оценивается по влиянию донорных атомов и природы функциональных групп с разным окружением. В качестве донорных атомов при образовании комплексов с катионами металлов (кислотами Льюиса) могут выступать только следующие основные атомы неметаллов*:

H				
2,1/1,5				
	C	N	O	F
	2,5/-	3,0/1,7	3,5/1,40	4,0/1,36
		P	S	Cl
		2,1/2,1	2,5/1,84	3,0/1,81
		As	Se	Br
		2,0/2,2	2,4/2,0	2,8/1,95
		Sb	Te	I
		1,9/2,4	2,1/2,2	2,5/2,16

*Возле каждого элемента слева указана электроотрицательность по Полингу; справа – радиус отрицательного иона в ангстремах по Шрегстриху [138].

В рассматриваемом случае различают также «жесткие» (F, O) и «мягкие» основания (по Пирсону). Жесткость оснований уменьшается параллельно с уменьшением электроотрицательности атомов сверху вниз и справа налево по периодической системе. Донорными атомами в хелатообразующих реагентах (по уменьшению жесткости) являются только O>N>S. В спиртовых группах в качестве донорных атомов выступает атом кислорода [138].

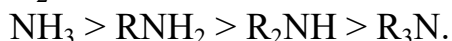
Хелатообразующие реагенты, донорные атомы которых являются «жесткими» основаниями, образуют устойчивые комплексы как с «жесткими» основаниями (ионное взаимодействие), так и с «мягкими» кислотами, т.е. как с А-катионами, так и с Б-катионами. В хелатах с «мягкими» основаниями донорные атомы образуют устойчивые комплексы только с «мягкими» кислотами, т.е. с Б-катионами (ковалентное взаимодействие). Комплексы, образованные «жесткими» основаниями и «жесткими» кислотами (А-катионы), более устойчивы, чем комплексы, образованные «мягкими» основаниями и «жесткими» кислотами.

По Сиджвику при образовании хелатов элементы по сродству к кислороду или азоту разделяются на три группы [138]:

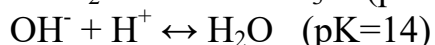
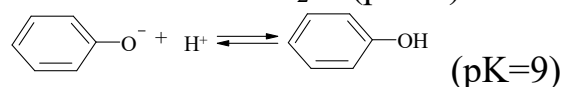
- I. O>N: Mg, Ca, Sr, Ba, Ga, In, Tl, Ti, Zr, Th, Si, Ge, Sr, V(V), V(VI), Nb(V), Ta(V), Mo(V), U(IV), Fe(III), Co.
- II. O=N: Be, Cr(III), Fe(II), платиновая группа.
- III. N>O: Cu(I), Ag(I), Au(I), Cu(II), Cd, Hg, V(III), Co(III), Ni(II).

Отсюда следует, что элементы первой группы идентичны А-катионам и включают также «жесткие кислоты из группы Б-катионов». Элементы третьей группы соответствуют «мягким» кислотам Б-катионов и переходным металлам.

Для более точного описания стабильности хелатов следует учитывать снижение координационной способности лигандов при введении заместителей:

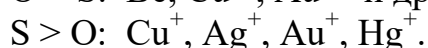
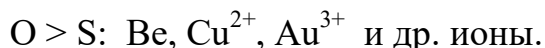


Кроме того, имеет значение сродство к протону:



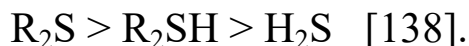
Нейтральный азот (в аммиаке) и отрицательно заряженный кислород (в фенолят-ионе) обладают приблизительно одинаковым сродством к протону. Поэтому при одном и том же pH образование хелата с дигидоксисоединениями (например, этиленгликолем) сопровождается замещением протона, а хелатообразование с диаминами проходят по реакции присоединения. Реакция гидратированного иона металла с лигандами, содержащими отрицательно заряженный кислород или нейтральный азот, может сопровождаться вытеснением аквалиганда (координированных молекул воды). Однако едва ли эти же молекулы воды могут быть вытеснены реагентами с нейтральными гидроксигруппами (ROH) [138].

Труднее сравнивать донорные атомы S и O. По Сиджвику предлагаются следующие эмпирические ряды сродства:



Следует учитывать, что в хелатных соединениях координационная способность серы при введении заместителей изменяется в

противоположном направлении по сравнению с кислородом и азотом:



6.2.2. Взаимодействие кардиолипина, фосфатидилглицерина и фосфатидилинозитола с ионами переходных металлов

Целесообразно, как и при рассмотрении взаимодействия ФЛ с ионами щелочных металлов, описывать реакции фосфолипидов с поливалентными ионами металлов, исходя из того, что ФЛ проявляют катионообменные свойства (ФК, ФГ, ФИ, КЛ, ФГФ, ФИФ), а другие являются амфолитами (ФХ, ФЭА, ФС, ФААГ, СМ).

Основным фактором, определяющим образование координационной связи между ионом металла и фосфолипидами, является наличие свободных или одноэлектронных орбиталей у ионов металла и его возможность дополнить свой электронный дефицит за счет электронных пар лигандных групп, входящих в состав ФЛ [138,186,203,204]. Образующихся координационных соединений

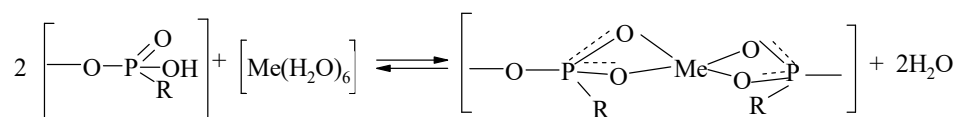
с участием $\text{—O—P} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \nearrow \\ \text{OH} \\ \searrow \\ \text{R} \end{smallmatrix}$ и $\text{—O—P} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \nearrow \\ \text{O} \\ \searrow \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ в полифосфатидных кислотах, фосфатидилглицерине, фосфатидилинозитоле, кардиолипине, фосфатидилглицерофосфате, дифосфоинзитиде (ФИФ) определяется:

- 1) Природой иона-комплексообразователя, его электронной структурой и электростатическими характеристиками;
- 2) Природой электродонорного атома, дентантностью, поляризуемостью и распределением лигандных групп [176] в цепи фосфолипидов;
- 3) Условиями комплексообразования (рН, концентраций реагентов, температурой, наличием побочных ионов-комплексообразователей).

Комплексообразующие свойства ФГ, ФИ и КЛ с группировками $\text{—O—P} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \nearrow \\ \text{OH} \\ \searrow \\ \text{R} \end{smallmatrix}$ могут быть связаны с образованием структур $\text{—O—P} \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \nearrow \\ \text{O} \rightarrow \text{Me} \\ \searrow \\ \text{R} \end{smallmatrix}$ и $\text{O—P} \begin{smallmatrix} \text{O} \rightarrow \text{Me} \\ \nearrow \\ \text{OH} \\ \searrow \\ \text{R} \end{smallmatrix}$. В первом случае химическая связь иона металла с фосфатной группой имеет ионно-координационный характер, а во втором – чисто координационный. Если учесть, что

ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , являющиеся «жесткими» кислотами, образуют прочные комплексы с «жесткими» основаниями (кислородом фосфатной группы), более вероятной является ионно-координационная структура комплекса [138], что объясняется наличием хелатной структуры. Подобные структуры будут определяющими и для ионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , которые занимают промежуточное положение между «жесткими» и «мягкими» [138].

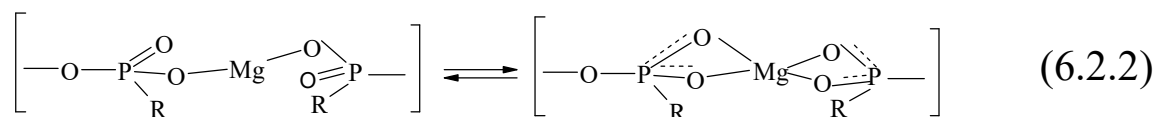
Учитывая тот факт, что координационное число ионов Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{3+} будет равняться шести, в состав образующихся комплексов могут входить два остатка фосфатных групп соседних молекул ФЛ, а два оставшихся координационных места занимают молекулы воды:



R – органические составляющие ФЛ, и для простоты записи заряды лигандов и ионов-комплексобразователей опущены.

Для ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} характерным может быть взаимодействие с ФГ, ФИ и КЛ как за счет электроновалентного процесса с

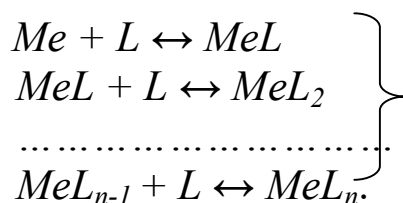
ионизированными группами $\left[\text{—O—P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O}^- \\ \text{R} \end{array} \right]$ [3, 165], так и за счет координационного с фосфорильным кислородом последних [244]. Это объясняется тем, что фосфорильный кислород обладает большой электронной плотностью, обусловленной значительной поляризуемостью атома фосфора, тригональной структурой с малыми углами между заместителями, обеспечивающими большую равнодействующую смещения электронной плотности в фосфорильной системе по сравнению с другими системами ($\equiv\text{N}$; $>\text{S}$; $\equiv\text{As}$; $>\text{C}=\text{O}$) [244]:



Реакция ионов Me^{n+} с фосфорильным остатком ФЛ сопровождается выделением ионов гидроксония и закислением среды. По-

этому представляется разумным рассмотреть влияние рН на изменение устойчивости образующихся комплексов ФЛ с ионами Me^{n+} . Известно, что устойчивость комплексных соединений характеризуется их константами устойчивости [94, 105, 138].

Рассматривая образование комплекса MeL_n из Me^{n+} и фосфолипида L, как ряд последовательных стадий (опустив знаки зарядов):



Каждую из этих стадий можно охарактеризовать ступенчатой константой равновесия:

$$\left. \begin{array}{l} K_1 = \alpha_{MeL} / \alpha_{Me} \alpha_L \\ K_2 = \alpha_{MeL_2} / \alpha_{MeL} \alpha_L \\ \dots\dots\dots \\ K_n = \alpha_{MeL_n} / \alpha_{MeL_{n-1}} \alpha_L \end{array} \right\}$$

Их называют также ступенчатыми константами устойчивости. Легко найти их связь с общей (полной) константой устойчивости комплекса рассматриваемого процесса:

$$\begin{aligned} Me + nL &\leftrightarrow MeL_n \\ \beta_n &= \alpha_{MeL_n} / \alpha_{Me} \cdot \alpha_L^n \\ \beta_n &= K_1 \cdot K_2 \dots K_n = \alpha_{MeL_n} / \alpha_{Me} \alpha_L^n \end{aligned}$$

Константы в указанных процессах, выраженные через активности соответствующих компонентов, являются термодинамическими.

Наряду с этими константами, используют и концентрационные константы устойчивости комплексов:

$$\beta_{n(C)} = [MeL_n] / [Me] [L]^n,$$

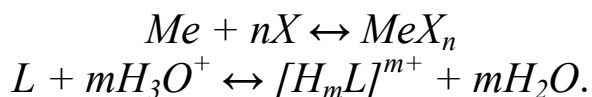
которые связаны с β_n следующим уравнением:

$$\beta_{n(C)} = \beta_n \gamma_{Me} \gamma_L^n / \gamma_{MeL}^n.$$

Отсюда можно сделать вывод, что $\beta_{n(C)}$ зависит от ионной силы I раствора, поэтому использовать величину $\beta_{n(C)}$ корректно можно только при точно выбранном значении ионной силы.

Следует заметить, что размерности констант устойчивости различны и зависят от единиц измерения активности (концентрации) [266, 267]. Для молярности M_i размерность K_n будет равна $[л \cdot моль^{-1}]$; $\beta_n - [л^n \cdot моль^{-n}]$; а коэффициент активности обозначается символом y_i . Концентрации в этом случае зависят от температуры и давления, поэтому константы, выраженные через молярность, зависят от этих параметров. Это неудобство можно ликвидировать, если концентрацию выразить в единицах моляльности m , то есть $[моль \cdot кг^{-1}]$. В этом случае размерность K_n будет $[кг \cdot моль^{-1}]$; $\beta_n - [кг^n \cdot моль^{-n}]$, а коэффициент активности обозначается буквой γ_i (в разбавленных растворах разница между величинами y_i и γ_i мала и ею можно пренебречь) [266]. Более подходящим является способ выражения концентрации через молярные доли. Полученные таким образом константы являются безразмерными и не зависят от давления и температуры. Коэффициент активности в этом случае обозначается буквой f_i .

В реальных системах очень редки случаи, когда компоненты Me^{n+} и L, образующие комплексы, взаимодействуют только между собой. В большинстве случаев в растворах присутствуют и другие вещества, способные взаимодействовать с Me^{n+} и с L:



Константы устойчивости β_n и $\beta_{n(C)}$ при этом не будут достоверными, так как не учитывают протекание побочных процессов. Влияние подобных побочных реакций на основной процесс между ионами Me^{n+} и ФЛ может быть учтено при введении условных констант устойчивости, которые берут во внимание конкретные условия комплексообразования [266]:

$$\beta'_{n(C)} = [MeL_n] / [Me'] [L']_n$$

Me' – концентрация не свободного комплексообразователя Me, а сумма всех форм Me в растворе, кроме тех, которые связаны с L, т.е.

$$[Me'] = [Me] + [MeX] + [MeX_2] + \dots + [MeX_n].$$

Аналогично, $[L']$ является суммой концентрацией всех форм L , кроме тех, которые связаны с Me , т.е.

$$[L'] = [L] + [HL] + [H_2L] + \dots + [H_m L]$$

Для удобства вычисления $\beta'_{n(C)}$ вводятся так называемые вспомогательные коэффициенты α_{Me} и α_L [105, 266]:

$$\alpha_{Me} = [Me'] / [Me]; \alpha_L = [L'] / [L].$$

В итоге получаем:

$$\beta'_{n(C)} = ([MeL_n] / [Me] [L]^n) \cdot (1 / \alpha_{Me} \alpha_L^n) = \beta_{n(C)} / \alpha_{Me} \alpha_L^n.$$

Для расчета α_L необходимо знать константы протолиза кислот, образующихся при взаимодействии лиганда L с H_3O^+ , и концентрацию каждой из ионных форм этих кислот. Если при контакте L с H_3O^+ образуются кислоты HL , H_2L и H_3L , то концентрация каждой из этих форм вычисляется по уравнениям для ступенчатых констант кислотности кислоты H_3L . В уравнениях ион H_3O^+ обозначим через H^+ , а знаки ионов H_2L^- ; HL^{2-} ; L^{3-} ; опустим, получим:

$$\begin{aligned} K_{a(3)} &= [H^+] [L] / [HL]; \quad [HL] = [H^+] [L] / K_{a(3)} \\ K_{a(2)} &= [H^+] [HL] / [H_2L]; \quad [H_2L] = [H^+] [HL] / K_{a(2)} = [H^+]^2 [L] / K_{a(2)} K_{a(3)} \\ K_{a(1)} &= [H^+] [H_2L] / [H_3L]; \quad [H_3L] = [H^+] [H_2L] / K_{a(1)} = [H^+]^3 [L] / K_{a(1)} K_{a(2)} K_{a(3)} \\ [L'] &= [L] (1 + [H^+] / K_{a(3)} + [H^+]^2 / K_{a(2)} K_{a(3)} + [H^+]^3 / K_{a(1)} K_{a(2)} K_{a(3)}) \end{aligned}$$

Отсюда α_L равно:

$$\alpha_L = [L'] / [L] = 1 + [H^+] / K_{a(3)} + [H^+]^2 / K_{a(2)} K_{a(3)} + [H^+]^3 / K_{a(1)} K_{a(2)} K_{a(3)}$$

Предлагаемые расчеты показывают, что при высокой кислотности часть ионов Me^{n+} , связанная в комплексах с фосфолипидом, уменьшается, так как все большее количество лиганда протонируется и не может участвовать в комплексообразовании с ионами металла.

Концентрации комплексов MeX , MeX_2 , ..., MeX_n могут определяться с помощью уравнений для полной концентрационной константы устойчивости соответствующего комплекса [266]:

$$\begin{aligned}\beta_1 &= [MeX] / [Me] [X]; [MeX] = \beta_1 [Me] [X] \\ \beta_2 &= [MeX_2] / [Me] [X]^2; [MeX_2] = \beta_2 [Me] [X]^2 \\ \beta_n &= [MeX_n] / [Me] [X]^n; [MeX_n] = \beta_n [Me] [X]^n\end{aligned}$$

Комбинируя приведенные уравнения, имеем:

$$\begin{aligned}[Me'] &= [Me] + \beta_1 [Me] [X] + \beta_2 [Me] [X]^2 + \dots + \beta_n [Me] [X]^n = \\ &= [Me] (1 + \beta_1 [X] + \beta_2 [X]^2 + \dots + \beta_n [X]^n)\end{aligned}$$

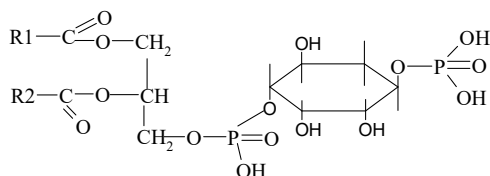
Получаем значение для α_{Me} :

$$\alpha_{Me} = 1 + \beta_1 [X] + \beta_2 [X]^2 + \dots + \beta_n [X]^n,$$

то есть при известных константах устойчивости MeX , MeX_2 , ..., MeX_n и известной концентрации лиганда $[X]$.

6.2.3. Взаимодействие фосфатидных кислот, фосфатидилглицерофосфата и дифосфоинозита с ионами переходных металлов

Известно, что ФК содержат фосфатные остатки ($-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2$), а ФГФ, наряду с фосфатным остатком, содержит фосфиновокислые группы. Для ФИФ (3-sn-фосфатидил-sn-1'-миоинозит-4-фосфата) [259]



Также характерно наличие и фосфатных, и фосфиновокислых групп. Поэтому ФК будут в реакциях протолиза вести себя как двухосновные кислоты ($pK_1=1,8$; $pK_2=6,2$), а ФГФ и ФИФ – как

трехосновные кислоты (табл. 2.1) (pK_1 для группы $-\text{P}(\text{OH})_2$ равны

1,9 и 2,1; pK_2 для группы $-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2$ равны 6,0 и 6,1; pK_3 для группы

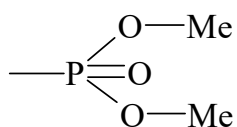
$-\text{P}(\text{OH})_2$ равны 6,8 и 7,1 соответственно). Последнее в определенной мере будет влиять на процесс связывания ионов переходных

металлов ФК, ФГФ и ФИФ. Следует отметить, что в растворах с малой ионной силой первоначально в реакцию протолиза вступа-

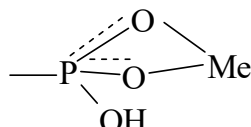
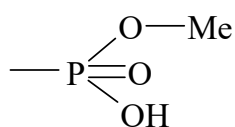
ют группы $\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ с образованием иона $\begin{array}{c} \text{O}^- \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$; в дальнейшем происходит депротоионизация фосфиновокислых остатков $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{R—P—O—R} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ ($pK_2=6,0-6,1$) и фосфатного остатка $\begin{array}{c} \text{O}^- \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ с образованием

$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$ - ионов [174]. Величины ступенчатых констант протолиза ФК, ФГФ и ФИФ близки по значению к подобным константам фосфорнокислых катионитов на основе поливинилового спирта [176].

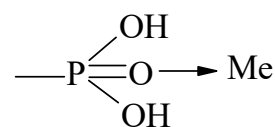
Стереохимия фосфорнокислых ($\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{—P=O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$) и фосфатных групп ($\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{—O—P=O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$), в которых присутствуют группировки —OH , способные к координации, и фосфорильного кислорода —P=O , позволяет сделать предположение о возможности образования прочных хелатных структур ФК, ФГФ и ФИФ с ионами Me^{n+} переходных металлов. Известно, что фосфатионы имеют форму тетраэдра (искаженного), имеющего ось симметрии третьего порядка. Вышеуказанные особенности строения обуславливают возможность образования как ионных, так и координационных связей между рассматриваемыми ФЛ и ионами Me^{n+} , как в слабокислых, так и в сильно закисленных средах (когда кислотные группы ФЛ практически полностью протонированы [186, 268]. При этом для двухзарядных ионов Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} возможна координация по трем типам:



Ионный тип (1)



Хелатный тип (2)

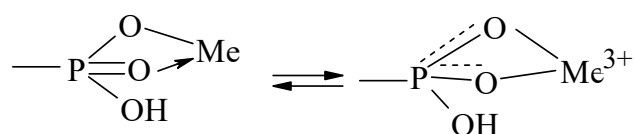


Координационный тип (3)

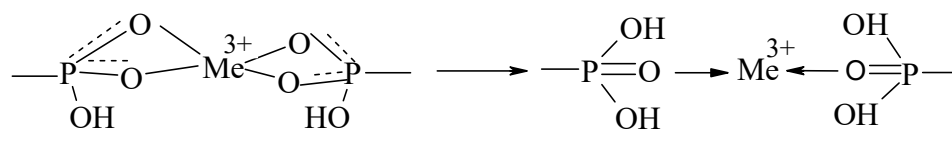
При pH 3,0-5,0 взаимодействие этих ионов с фосфоновыми группами происходит в основном по хелатному типу, однако не исключена возможность и чисто ионных процессов.

Значительно большую способность к образованию координационной связи (по сравнению с ионами Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) с фосфонокислыми и фосфатными группами проявляют ионы трехвалентных металлов [138, 186]. Для ионов Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} в относительно кислых средах (при pH=1-3) наиболее вероятно образование хелатных центров с участием атома кислорода фосфориль-

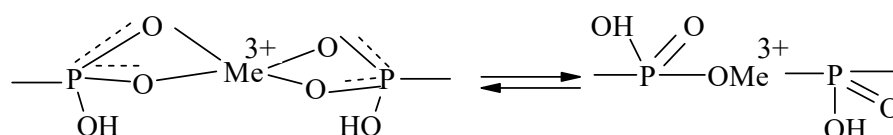
ных $\text{P}=\text{O}$ и кислотных $\text{P}(\text{OH})_2$ групп [110, 137]:



С увеличением кислотности из хелатного центра формируется группировка с координационными связями следующего типа:

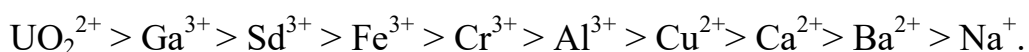


Это ведет к снижению устойчивости комплекса. При повышении pH возможно существование координационно-хелатной и ионной форм комплекса:



При хелатном процессе в очень кислых средах заряд ионов Me^{3+} лишь частично компенсируется зарядом фосфоновых групп ФЛ. Нейтрализация ионов Me^{3+} в этом случае будет компенсироваться анионом той кислоты, которая в избытке присутствует в растворе.

Авторы [174, 269] предлагают степень ковалентности связей О-Ме с фосфоновыми группами рассматривать в соответствии со следующим рядом:



Можно считать, что при контакте молекул воды с катионами будет изменяться донорная способность ОН-групп молекул растворителя, склонная к образованию водородной связи. Катионы друг от друга различаются своей массой, электронной структурой и электростатическим полем. В образовании этого поля решающую роль играют ионный радиус катиона и его валентность. Представляет интерес рассмотрение изменения полос поглощения в ИК-спектрах ФЛ с фосфатными группировками (ФК) при их взаимодействии с ионами переходных металлов. Можно выделить для таких систем область валентных колебаний и оценить донорную способность ОН-групп к образованию водородной связи ($3300-3400\text{ см}^{-1}$), а также области для деформационных ножничных (-1640 см^{-1}) и крутильных ($800-650\text{ см}^{-1}$) колебаний. Могут в этом плане нести определенную информацию и максимумы в области $2560-2320\text{ см}^{-1}$, характерные для связей ОН в воде, ассоциированной с фосфоновыми группами, а также полосы в области $3630-3500\text{ см}^{-1}$ (колебания свободных ОН-групп молекул воды).

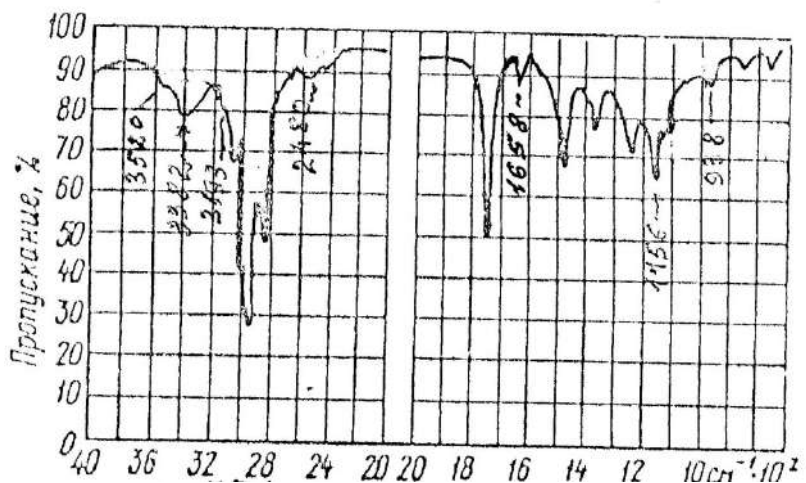


Рис. 6.2.1. ИК-спектры протонированных фосфатидных кислот ($\text{pH}=1,0$).

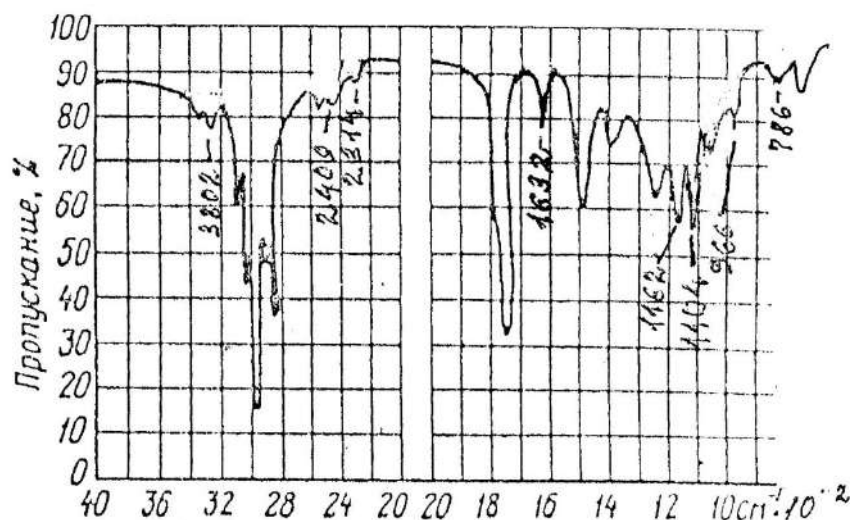


Рис. 6.2.2. ИК-спектры комплекса фосфатидных кислот с Cu^{2+}

Под действием диполей молекул воды d-электроны катионов переходных металлов перестраиваются (эффект кристаллического поля). Связующие орбитали этих катионов, начинают взаимодействовать с неподеленной парой электронов молекул воды. Следствием такого взаимодействия является возникновение связи, близкой по характеру к ковалентной [137, 203]. Это увеличивает донорные свойства молекул гидратной воды, связь ОН-групп

растворителя с анионами —O—P(=O)(OH)_2 в фосфолипидах становятся сильнее, наблюдается сдвиг полосы валентных колебаний -ОН ($3300\text{--}3400\text{ см}^{-1}$) в сторону меньших волновых чисел. Представляет интерес, что устойчивость ряда комплексов с участием катионов (по Ирвингу и Уильямсу) антибатна максимуму смещения ОН-валентных колебаний гидратной воды, т.е. возрастает в сторону меньших волновых чисел от Mn^{2+} к Cu^{2+} (а затем слегка убывает для Zn^{2+}).

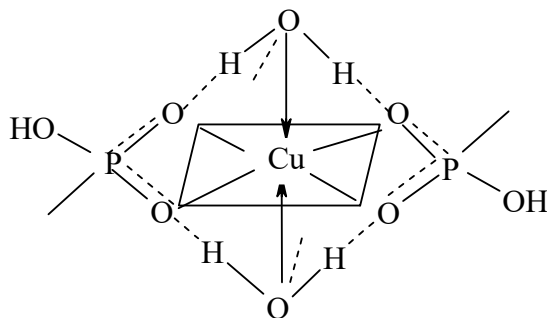
$$\text{Mn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$$

$$3412 > 3391 > 3369 > 3302 < 3323\text{ см}^{-1}$$

Следовательно, наблюдаемый сдвиг полосы $\nu_{\text{ОН}}$ позволяет говорить о величине ковалентной составляющей связи $\text{Me}^{n+} - \text{H}_2\text{O}$ [138].

Для иона Cu^{2+} вследствие эффекта Яна-Теллер [270, 271] образуются сильные связи с двумя группами фосфатными (ортогонально в виде квадрата) и две более слабые связи с ОН-группами

воды аксиально (по обе стороны от плоскости этого квадрата). Таким образом, комплекс Cu^{2+} с ФК представляет собой октаэдр с сильно искаженной конформацией:



Таким образом, наблюдаемая полоса поглощения 3302 см^{-1} относится к валентным колебаниям ОН молекул гидратной воды, в наибольшей степени, связанной с ионами Cu^{2+} . При низких степенях гидратации ион меди взаимодействует не только с молекулами H_2O , но и с кислородом ионов $-\text{PO}_3\text{H}^-$, вследствие чего четыре вершины, расположенные в плоскости квадрата, оказываются ориентированными в направлении атомов кислорода фосфатных групп.

Максимум валентных колебаний $-\text{OH}$ гидратной воды для ионов Zn^{2+} сдвинут в направлении меньших волновых чисел, чем для ионов Co^{2+} и Ni^{2+} , что свидетельствует о более сильном вкладе ковалентности между молекулами воды с ионами цинка [271]. Отмечено, что при низкой относительной влажности в одинаковых условиях гидратации с ионом Zn^{2+} связывается меньшее количество молекул воды, чем при октаэдрическом построении. Причину сильного ковалентного взаимодействия иона Zn^{2+} с молекулами воды следует искать в том, что они в негидратированном состоянии имеют 10 d-электронов. Для перевода одного из них на более высокий энергетический уровень требуется энергия всего $15,5 \cdot 10^{-19}$ Дж (9,7 эВ). В связи с этим, между d-орбиталями и орбиталями четвертого уровня могут образоваться гибридные орбитали с тетраэдрической структурой [137, 138, 203], которые взаимодействуют с неподеленной электронной парой молекул воды.

Ион Zn^{2+} при низких степенях влажности (как и ион Cu^{2+}) будет взаимодействовать не только с молекулами воды, но и с ио-

нами $-\text{PO}_3\text{H}^-$. Поэтому вершины тетраэдра (не занятые молекулами воды) ориентируются в направлении атомов кислорода этих анионов.

При увеличении важности Zn^{2+} координационное число его растет, и тетраэдрическая структура преобразуется в октаэдрическую $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Вышеуказанное объясняет особое положение Zn^{2+} в ряду Ирвинга-Уильямса [138].

В случае ножничных колебаний гидратной воды под воздействием катионов Me^{2+} также наблюдается сдвиг полосы в ИК-спектрах по сравнению со свободной H_2O ($\delta=1595 \text{ см}^{-1}$). Однако этот сдвиг составляет величину не более $\Delta\delta=53 \text{ см}^{-1}$, а в ряду щелочноземельных металлов не превышает 18 см^{-1} ; и в ряду Ирвинга-Уильямса всего 6 см^{-1} . Важным здесь является также то, что указанное смещение в каждой группе катионов идет в сторону больших волновых чисел (до $\approx 1650 \text{ см}^{-1}$), что свидетельствует об усилении Н-связи молекул гидратной воды с атомами кислорода

анионов $\begin{array}{c} \text{O}^- \\ | \\ -\text{P}=\text{O} \\ | \\ \text{OH} \end{array}$ или $\left(\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \vdots \\ -\text{P} \cdots \text{O} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right)^-$.

В ИК-спектрах комплекса Cu^{2+} с ФК (рис. 6.2.2) наблюдается полоса 786 см^{-1} , характерная крутильным колебаниям молекул гидратной воды. Эта полоса смещения в сторону меньших волновых чисел по сравнению с колебаниями свободной H_2O (830 см^{-1}).

В качестве вывода можно сказать, что поведение широких полос поглощения в области валентных колебаний ОН-групп, участвующих в Н-связях ($3300\text{--}3400 \text{ см}^{-1}$; $2560\text{--}2320 \text{ см}^{-1}$), их ножничных ($1630\text{--}1650 \text{ см}^{-1}$) и крутильных колебаниях ($800\text{--}650 \text{ см}^{-1}$), является источником информации о взаимодействии между катионами и анионами. Наличие полос поглощения в области колебаний свободной ОН-группы H_2O ($3630\text{--}3500 \text{ см}^{-1}$) указывает именно на присутствие гидратных структур в комплексах Me^{2+} с фосфатидными кислотами [137].

Таким образом, взаимодействие воды с катионами меняет структуру молекулы растворителя, вызывая при этом сдвиг полосы ν_{OH} молекул гидратной воды. Катионы Me^{3+} отличаются своей массой, электростатическим полем $E_{\text{кн}}$ и электронной структурой

от двухзарядных катионов Me^{2+} . В общем случае полоса ОН-валентных колебаний смещается в сторону меньших волновых чисел при переходе от Me^{2+} переходных металлов к Fe^{3+} и Al^{3+} , то есть под влиянием электростатического поля катиона (определяемого валентностью и ионным радиусом) на молекулу воды (рис. 6.2.2).

Вызвано это следующими причинами. Связи ОН-молекул воды поляризуются в поле катиона [272], растягиваются и ослабляются с одной стороны за счет отталкивания протона молекул воды катионом, с другой стороны, за счет уменьшения электронной плотности ОН-связи под воздействием поля катиона. В результате протоны ОН-групп воды становятся все более положительно заряженными с увеличением поля катиона. Таким образом, донорная способность к образованию Н-связи групп -ОН возрастает. Наряду с этим акцепторная способность к образованию водородной связи атомов кислорода соседних анионов также возрастает за счет усиливающегося поляризующего действия поля катионов. В результате поляризации электроны анионов перестраиваются таким образом, что атомы кислорода становятся сильными акцепторами. Эти два эффекта усиливают водородную связь между атомами кислорода аниона и молекулами гидратной воды. Это, в свою очередь, приводит к сдвигу полосы ОН-валентных колебаний гидратной воды в сторону меньших волновых чисел и этот сдвиг тем больше, чем сильнее поле катиона [137].

Сопоставление спектров (рис. 6.2.2 и 6.2.3) комплексов фосфатидных кислот с Cu^{2+} , Fe^{3+} и Al^{3+} и величин $E_{кн}$ (ед. СГСЭ заряда, умноженного на cm^{-2} и 10^6 , где 1 ед. СГСЭ заряда = $3,33566 \cdot 10^{-10}$ Кл в единицах СИ), которые равны для ионов меди 2,87; для ионов железа 4,71; для ионов алюминия 5,53; показывает, что воздействие электростатического поля на протон молекулы H_2O наибольшее для Al^{3+} . Это означает, что водородные связи для Al^{3+} и Fe^{3+} сильнее, чем для Cu^{2+} ($\nu_{ОН}$ 3173; 3253 и 3302 cm^{-1} соответственно). Для Al^{3+} в комплексе с ФК наибольший сдвиг в сторону меньших волновых чисел объясняется тем, что катионы Al^{3+} могут весьма близко подходить к неподеленной паре электронов молекул воды и притягивать их своим сильным электростатическим полем. Вероятно, неподеленная пара электронов мо-

лекул воды взаимодействует с незанятыми 3s-, 3p- и 3d-орбиталями [137, 203], что увеличивает донорную способность к образованию водородной связи ОН-групп молекул гидратной воды по сравнению с ионами Fe^{3+} и Cu^{2+} .

Таким образом, смещение полосы ОН-валентных колебаний свидетельствует об усилении Н-связи молекул гидратной воды с фосфовыми анионами фосфатных кислот под влиянием поляризующего действия поля катиона (с одной стороны), и ковалентного взаимодействия катиона и воды (с другой стороны) [137].

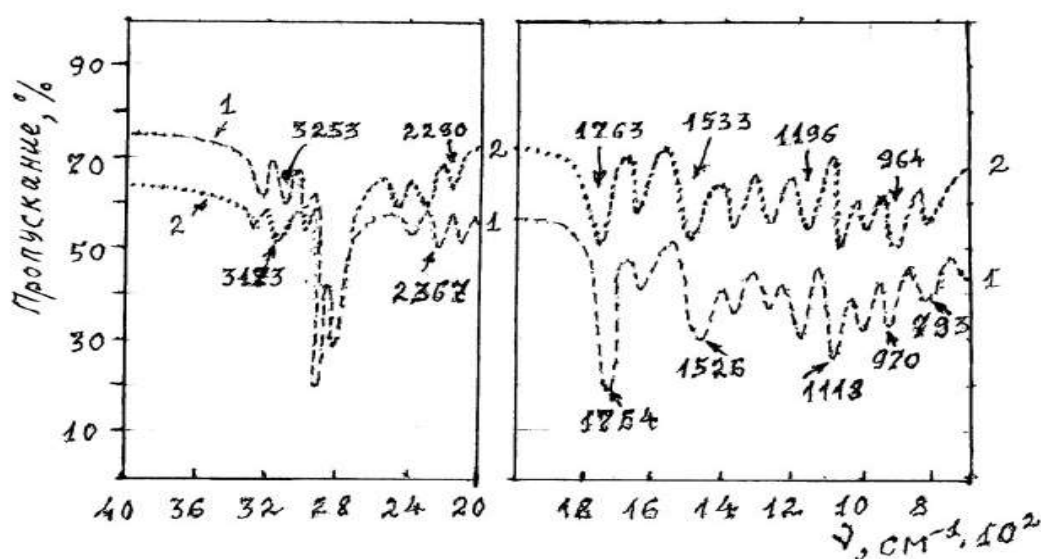


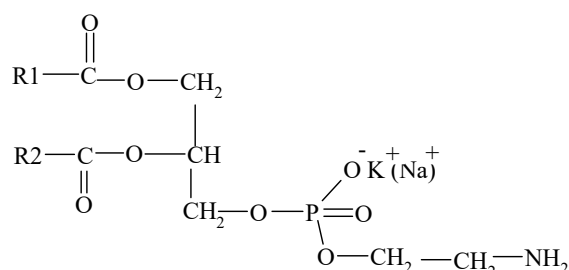
Рис. 6.2.3. ИК-спектры комплекса фосфатидных кислот с ионами Fe^{3+} (1) и Al^{3+} (2).

6.2.4. Взаимодействие фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилхолина с ионами переходных металлов

ФХ, ФЭ и ФС в отличие от полиолсодержащих фосфолипидов содержат аминогруппы. Поэтому эти ФЛ способны существовать в виде катионов (при $\text{pH} < \text{pI}$), биполярных ионов (при $\text{pH} = \text{pI}$) и анионов (при $\text{pH} > \text{pI}$), где pI – изоэлектрическая точка. В связи с этим продуктами реакций с ФЭ, ФС и ФХ неорганических ионов могут быть простые соли, внутрисферные и внешнесферные комплексы. При рассмотрении взаимодействий ФЭ, ФС и ФХ

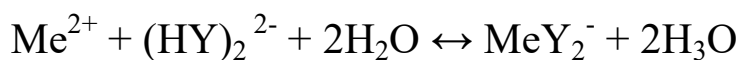
(имеющие две и три функциональные группы) необходимо учитывать тот факт, что при подходящем пространственном расположении эти лиганды могут быть би- и полидентатными. Комплексы с полидентатными лигандами (как отмечено в предыдущих главах) содержат циклы, включающие центральный атом. Такие комплексы, называемые хелатными, образуют наиболее устойчивые соединения, когда в состав цикла входят пять или шесть атомов.

Необходимо отметить, что в монографии [3] авторы утверждают, что для ФЭ характерно исключительно взаимодействие с одновалентными ионами Na^+ и K^+ :



где R_1 и R_2 – стеариновый и олеиновый остатки соответственно.

Фактически авторы [3] рассматривают только частный случай образования соли с участием аниона ФЭ, т.е. реакции в щелочной среде ($\text{pH} < \text{pI}$). Между тем анион ФЭ с ионами переходных металлов может образовывать стабильные комплексы с хелатными группировками. При этом в реакцию анион ФЭ вступает с ионами – комплексообразователями преимущественно в виде димеров. Примем как наиболее вероятным факт полного заполнения координационной сферы ионов металлов с координационными числами 4 и 6. Для ионов с координационным числом ($\text{КЧ}=4$) характерна плоская квадратная структура (Hg^{2+} Zn^{2+} Cd^{2+} Cu^{2+} Cu^+ Ni^{2+}). Эти катионы по сродству к кислороду и азоту относятся к III группе и образуют прочные комплексы с димерами аниона ФЭ⁻.



Более устойчивые комплексы с координационным числом, равным 6, образуют катионы металлов I группы (с $\text{O} > \text{N}$) схемы (6.2.4): Mg^{2+} Ca^{2+} Sr^{2+} Ga^{2+} In^+ Sn^{4+} Fe^{3+} .

Устойчивость комплексов с $\text{КЧ}=6$ в ряде случаев определяется наличием в лигандах полярных групп $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{C}=\text{O}$, $=\text{NH}$,

$-\text{COOH}$, $\text{P}(\text{OH})_2$. Эти гидрофильные группы обладают свободной парой электронов, которые могут ориентировать возле иона комплексообразователя протоны и молекулы воды. Большинство таких групп ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $\text{P}(\text{OH})_2$) в щелочных средах диссоциирует, а в кислых могут присоединять протон (последнее особенно характерно для аминов).

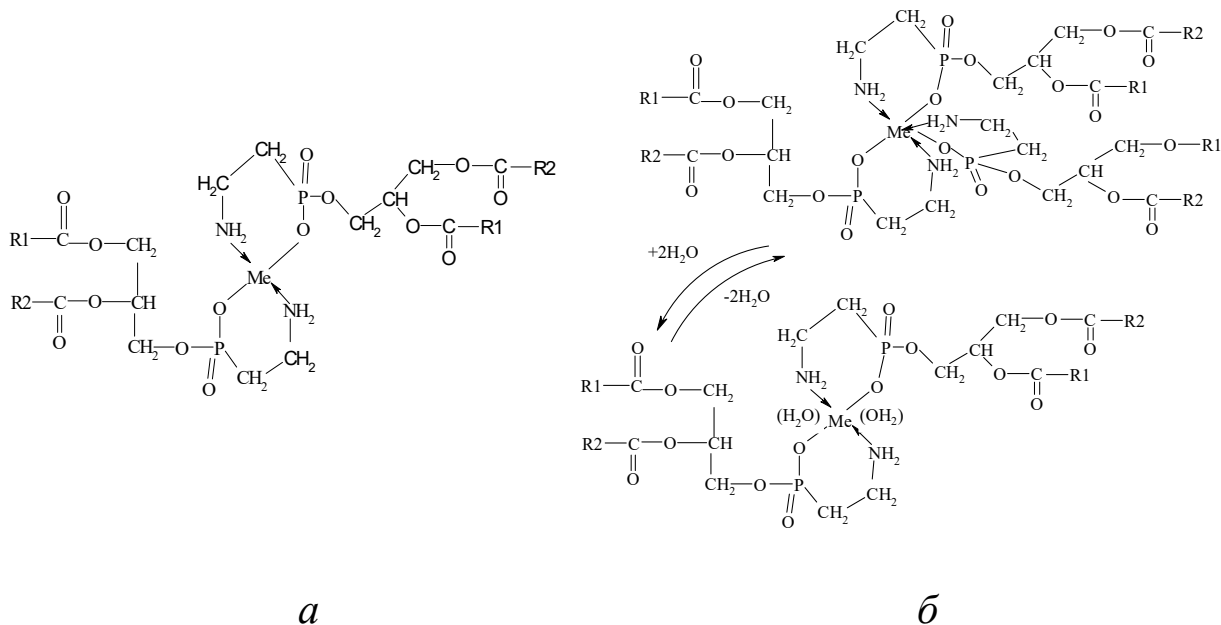
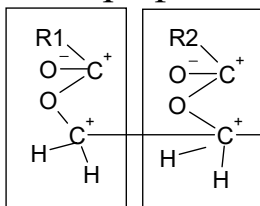


Рис. 6.2.4. Реакция димера аниона ФЭ с ионами Me ($\text{KЧ}=4$) (а) и ионами Me ($\text{KЧ}=6$) (б).

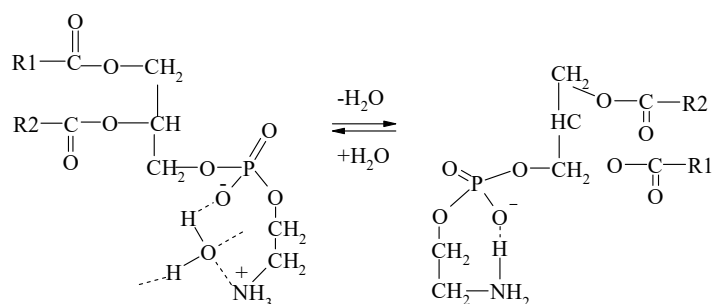
В обоих случаях растворимость в воде повышается из-за появления отрицательного или положительного заряда [8, 20, 138]. Гидрофильные группы в ФЭ являются хелатообразующими. При образовании хелатов эти группировки (благодаря образованию связей с металлами) насыщаются. Если у ФЭ не остается больше заряженных и гидрофильных групп, то следует ожидать, что образующийся при этом хелат будет хуже растворим в воде по сравнению с хелатным лигандом. Будет ли образующийся хелат действительно плохо растворим в воде, зависит от того, будет ли внешняя органическая часть хелата достаточно велика и гидрофобна, чтобы предотвратить сольватацию молекулами воды. Имеет ли это место в случае образования комплекса ФЭ⁻ с ионами Me^{n+} I группы? В рассматриваемом случае органическая гид-

рофобная часть лиганда (ФЭ) достаточно велика. Но, наряду с этим, анионы ФЭ⁻ имеют два гидрофильных центра



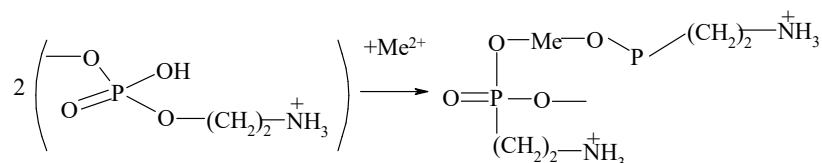
Что позволяет сохранить способность к гидратации, находясь в комплексе с анионом ФЭ. Поэтому вероятность существования комплексов с H₂O в качестве лиганда и без него будет одинакова.

Наличие в молекуле ФЭ одновременно кислотной >P-OH и основной $-\text{NH}_2$ группировок приводит к тому, что в присутствии воды фосфолипид полностью переходит в ионную форму, имеющую одновременно и положительный, и отрицательный заряд, то есть образует биполярный ион (цвиттер-ион). Подобная структура превращает этаноламинсодержащие ФЛ в хорошо растворимую в воде форму и малорастворимую (или совсем нерастворимую) в неполярных (и малополярных) растворителях – триацилглицеринах растительных масел. Для ФЭ[±] хотя и возможно образование внутримолекулярных Н-связей, но не является исключением полная трансформация протона от группы Р-ОН к сильной основной группе $-\text{NH}_3^+$. В результате этого освобождается молекула воды и депротонируется фосфатная группировка:

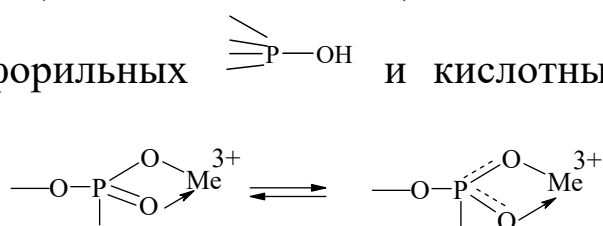


В связи с процессами, приведенными выше, возможность образования комплексов с ионами Me^{n+} по сравнению с анионами ФЭ⁻ снижена, так как требует предварительного разрушения биполярного иона ФЭ[±].

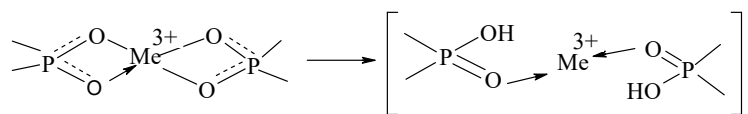
В слабокислых и сильно закисленных средах, когда кислотные группы >P-OH полностью протонированы, взаимодействие катионов ФЭ с двухзарядными ионами ограничивается образованием соединений ионного типа:



Способность к образованию координационной связи с трехзарядными ионами (Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , In^{3+}) связана с реакцией атома кислорода фосфорильных >P-OH и кислотных >P(=O)-OH групп [110, 137, 138]:

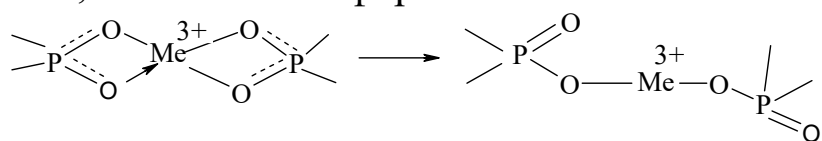


Увеличение кислотности среды приводит к формированию хелатного центра группировок:



Это приводит к снижению устойчивости комплекса.

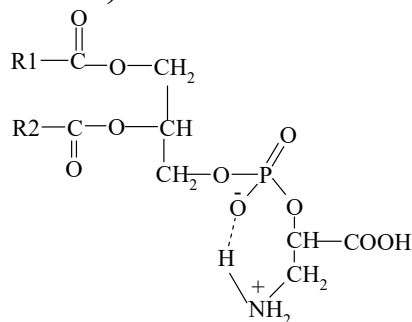
При повышении pH возможно образование как координационно-хелатной, так и ионной формы комплекса:



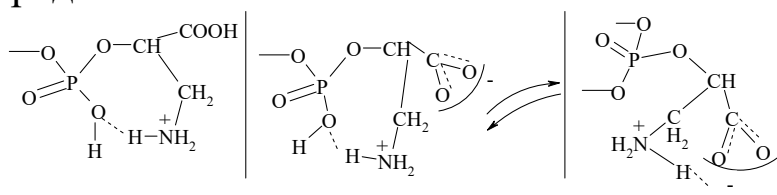
Таким образом, ионное состояние, структура и свойства фосфатидилэтаноламинов, а также заряд иона-комплексобразователя определяют тип образующегося комплекса $[\text{MeФЭ}]$.

В отличие от ФЭ в молекуле ФС имеются две кислотные группы >P-OH ($\text{pK}_1=1,5$) и -COOH ($\text{pK}_2=3,0$), способные вступить в реакцию протолиза (табл.2.1; рис.2.1). Поэтому (при наличии только одной основной группы NH_2 в ФС) существование его

в виде биполярного иона возможно лишь в узкой области рН с максимумом рН=2,1 (рис.2.1).

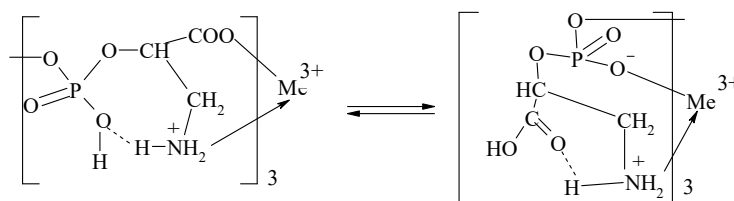
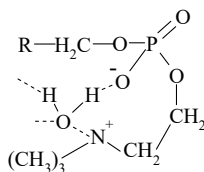


Наряду с этим, при данном значении рН присутствуют катион ФС^+ и однозарядный анион ФС^- :



Следовательно, при рН=2,1 взаимодействие ионов ФС с одним и тем же комплексообразователем приведет к образованию комплексов различного состава и свойств. Различие в устойчивости комплексов, представленных на рис. 6.2.5, определяется структурой хелатов и зарядом иона-комплексообразователя.

Особенности взаимодействия ФХ с ионами переходных металлов связаны с наличием в его молекуле остатков бетаиновой группировки, обладающей свойствами основания [32, 136]. В отличие от бетаина (триметилгликоколя), имеющего $-\text{COOH}$ -кислотную группу, ФХ содержит остаток фосфорной кислоты:



a

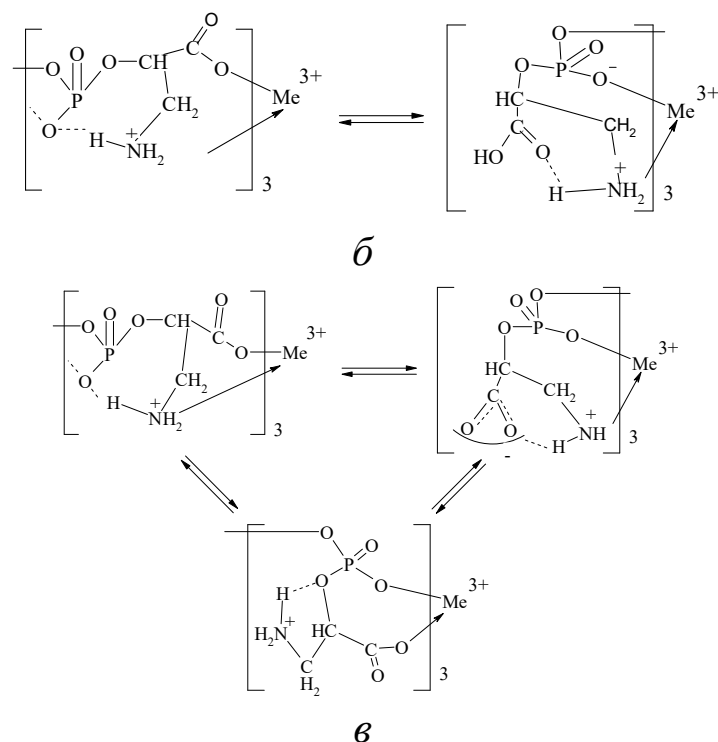


Рис. 6.2.5. Взаимодействие Me^{3+} с катионом (а), биполярным ионом (б) и однозарядным анионом (в) фосфатидилсерина

Эта биполярная форма ФХ возможна только в присутствии воды. Наряду с гидратацией биполярных ионов ФХ^\pm происходит образование «мостиковых» структур с участием воды между соседними фрагментами фосфорной кислот. Указанные процессы обеспечивают высокую гидратируемость как в биполярной форме, так и в форме катионов ФХ^+ и в форме анионов ФХ^- . На рис.6.2.6 представлен один из возможных вариантов образования координационного центра с участием ФХ и воды.

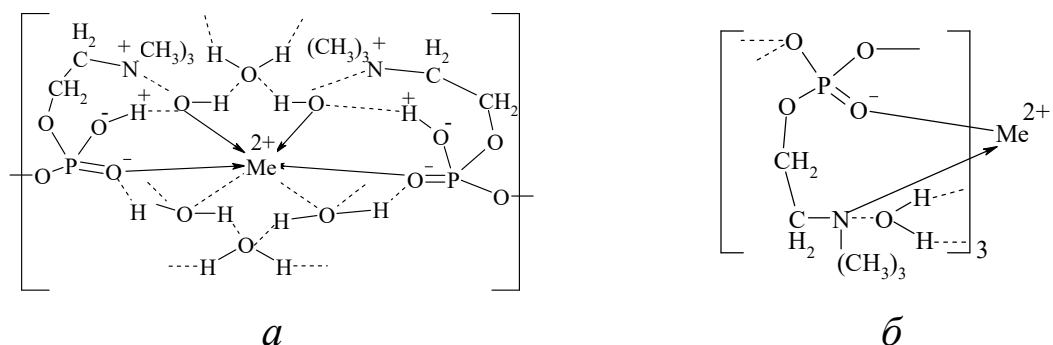


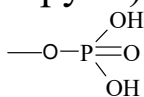
Рис.6.2.6. Возможные варианты образования координационного центра с участием ФХ и воды

Из рисунка следует, что только при наличии достаточного количества воды координационный центр Me^{2+} -иона (с координационным числом $KЧ=6$) является стабильным.

Таким образом, молекулы и ионы ФЛ имеют четыре диполя, способных в водных растворах к образованию не только ионных, но и межмолекулярных водородных связей, а также к Ван-дер-Ваальсовским взаимодействиям. Последнее позволяет взаимодействовать молекулам ФЛ друг с другом, образуя димеры без образования новых химических связей. Это позволяет отнести процесс димеризации ФЛ к супрамолекулярным структурам за счет самоорганизации молекул (ионов) липидов. Впервые предложено отнести димеры ФЛ к псевдосорбентам, где роль полимерной составляющей выполняют длинноцепочечные «хвосты» жирных кислот, между которыми возникают гидрофобные (дисперсионные) связи.

Рассмотрен вопрос формирования нерастворимых фосфолипидных мембранных слоев на границе раздела вода-воздух. Для описания вариативности взаимодействия фосфолипидов в моно- и бимолекулярных слоях использована величина ΔpK , определяемая значениями pK_i фосфатной группы и pK_i для аминогруппы. Подобный подход приемлем для ФХ, ФЭ, ФС, сфингомиелина и фосфатидил-О-аминоацетилглицерина с остатком лизина (ФААГ). Чем больше величина ΔpK_i , тем более значительные затраты энергии требуются для ослабления взаимодействия полярных «головок» в парных образованиях (димерах) и вступления в силу гидрофобных (дисперсионных) сил углеводородных «хвостов» между двумя молекулами (ионами) фосфолипида. Подобные «качели» в образовании ассоциатов из двух молекул ФЛ оказывают важнейшее влияние на формирование в дальнейшем моно- и бимолекулярных мембран, обладающими свойствами истинного сорбента.

В фосфатидных кислотах, фосфатидилинозитол-4-фосфате (ФИФ) и кардиолипине роль pK_2 (вместо аминогрупп) выполняет

вторая константа протолиза в группировке  полярных групп фосфолипидов.

Фосфатидилглицерин и фосфатидилинозитол, содержащие не ионные, а полярные группы, участвуют в ион-дипольных взаимодействиях между двумя соседними молекулами фосфолипида. В связи с тем, что индукционные силы слабее ориентационных (характерных для группы ФХ и группы ФК), способность к гидрофобным (дисперсионным) взаимодействиям у фосфатидилглицерина и фосфатидилинозитола менее выражена по сравнению с остальными фосфолипидами.

Формирование мембранных слоев (о чем сказано выше) является многостадийным процессом: 1) состояние двумерного газа; 2) образование растянутой жидкой пленки; 3) переход в твердоконденсированное состояние (которому может в ряде случаев предшествовать образование конденсированной жидкой пленки); 4) состояние коллапса. Остальную функциональную активность клеточных мембран проявляют жидкокристаллические структуры. Из всего разнообразия мезофаз (с биологической точки зрения) наибольший интерес представляют цилиндрическая (двухпространственная), ламеллярная (однопространственная) гексагональная. Последняя из названных структур относится к мицеллярным и обладает способностью формировать сквозные поры в мембранных слоях.

Глава 7. Химические и физиологические функции фосфолипидов в биологических мембранах

Химические взаимодействия фосфолипидов в растворах и биологических мембранах объясняются особенностью их состава и строения. Фосфолипидные компоненты имеют одну общую особенность: все они принадлежат к классу амфипатических соединений, содержащих полярную и неполярную части.

В предыдущих главах отмечены:

- 1) особенности реакций фосфолипидов друг с другом (образование димеров, способных к процессам самоорганизации за счет супрамолекулярных процессов);
- 2) способность фосфолипидов существовать (в соответствии с теорией Бренстеда) в водных растворах в виде биполярных ионов;
- 3) участие фосфолипидов в образовании хелатов с поливалентными ионами металлов.

Однако, в вышеперечисленных главах не нашли должного отражения особенности механизма гидрофильных и гидрофобных взаимодействий фосфолипидов в растворах и биологических мембранах; способность ФЛ участвовать в образовании внутри- и межмолекулярных водородных связей; «туннельные переходы протона» в воде и между однотипными группами фосфолипидов. Это требует знания равновесных характеристик; корректных расчетов коэффициентов активности ионов в процессах, когда ионы при контакте с биомембранными слоями имеют большую концентрацию. Поэтому в главе 7 представлены отдельные химические законы и подходы к объяснению химических процессов с участием фосфолипидов.

Реакционная способность молекул ФЛ связана с их составом и строением. При этом необходимо отметить, что ковалентная и ионная связи в ФЛ не могут объяснить их свойства и химические взаимодействия с другими компонентами растительных масел и друг с другом. Поэтому представляется целесообразным рассмотреть некоторые химические свойства ФЛ с учетом нековалентных (несвязанных) взаимодействий [160, 161, 203]. Бифильный характер ФЛ (как показано в предыдущих разделах) обу-

словлен наличием в них двух неполярных углеводородных «хвостов» и полярной «головы», условно состоящей из четырех диполей (остатка фосфорной кислоты, остатка аммониевых оснований или остатка сахара и двух идентичных диполей с кетонными группами) (схемы 5.6-5.8). Легко видеть, что ФЛ отличаются друг от друга главным образом по размерам, форме, полярности и заряду X-группы в полярной «голове» молекулы. Каждый тип ФЛ может быть представлен большим числом различных соединений, различающихся природой остатков двух алифатических «хвостов». Обычно ФЛ содержат один остаток насыщенной жирной кислоты, причем последняя стоит в положении 2 глицерина. К возникновению нековалентных взаимодействий (приводящих к образованию внутри- и межмолекулярных ассоциатов) способны R-OH, R=O, $^+NH_3$, NH_2 , COOH, OH, C=O группировки фосфатидиллипидов. Амфипатические (полярные) липиды могут вступать в диполь-дипольные взаимодействия, лондоновское притяжение и Ван-дер-Ваальсово отталкивание, образовывать водородные связи.

Настало время определиться с терминами «гидрофобный» (боящийся воды) и «гидрофильный» (любящий воду), часто встречающийся в химической и биохимической литературе [1, 4, 8-10, 20, 39, 55, 99, 133, 137, 139, 159-161]. Эти понятия весьма важны, но их происхождение и описание довольно запутаны [160]. Всегда имеет место конкуренция двух веществ (например, воды и гексана) и взаимодействие молекул одного вещества. Молекулы воды гидрофильны в том смысле, что проявляются сильные взаимодействия между ними как в чистой воде, так и в водных растворах [160]. Гексан и другие неполярные вещества также содержат взаимодействующие друг с другом молекулы (силы Ван-дер-Ваальсовского типа). Было бы ошибкой описывать такие взаимодействия как гидрофобные, поскольку они осуществляются полностью при отсутствии молекул воды.

Если образцы воды и гексана привести в контакт, они не смешиваются. В действительности, очень малые количества каждого компонента при равновесии растворимы в толще фазы другого компонента. И две жидкости образуют границу раздела. Они не смешиваются друг с другом, так как взаимодействия молекул во-

ды между собой более благоприятны (ниже ΔG , объединяющая вклады ΔH и $-T\Delta S$), чем взаимодействие молекул воды и гексана. Аналогичная ситуация проявляется и для молекул углеводорода. С другой стороны, перенос дополнительных молекул воды из жидкой водной фазы в жидкий гексан должен сопровождаться возрастанием химического потенциала μ [159, 160]. Поскольку все эти факторы характеризуют неблагоприятный процесс, он не осуществляется самопроизвольно.

Очень важно сохранить критический взгляд на взаимодействие концепций гидрофильности и гидрофобности. Трудно представить себе воду, полностью лишенную гидрофобного окружения. Растворимость воды в жидких углеводородах вполне достаточна, чтобы происходил быстрый обмен через поверхность раздела между малым количеством растворенной воды и водной толщей.

Высказанные соображения особенно важны при рассмотрении ФЛ, входящих в состав типичных клеточных мембран. Последние состоят из двойного липидного слоя, в который внедрены другие амфифильные молекулы, такие как холестерин, сфинголипиды (в мозговых тканях), белки и гликолипиды [1, 55]. Можно полагать, что двойной липидный слой похож на двумерный растворитель. Двойной слой устроен как сэндвич с гидрофобной частью липида, обращенной внутрь, и гидрофильными частями на других поверхностях в контакте с водными фазами (рис. 1.2; 7.1). Следовательно, двойной слой служит границей между двумя водными фазами, которые в типичных биологических клетках отличаются друг от друга по ионной силе, pH, концентрации растворенных веществ (рис. 7.1). Разнообразие состава гидрофильных групп и углеводородных «хвостов» ФЛ весьма важно для определения свойств поверхности (особенно в мембранах, рис. 7.1 в, и в пузырьках, рис. 7.1 г). Они определяют «текучесть» и кривизну мембран, термическую стабильность, их взаимодействие с белками и другими молекулами, связанными с мембраной или внедренными в нее.

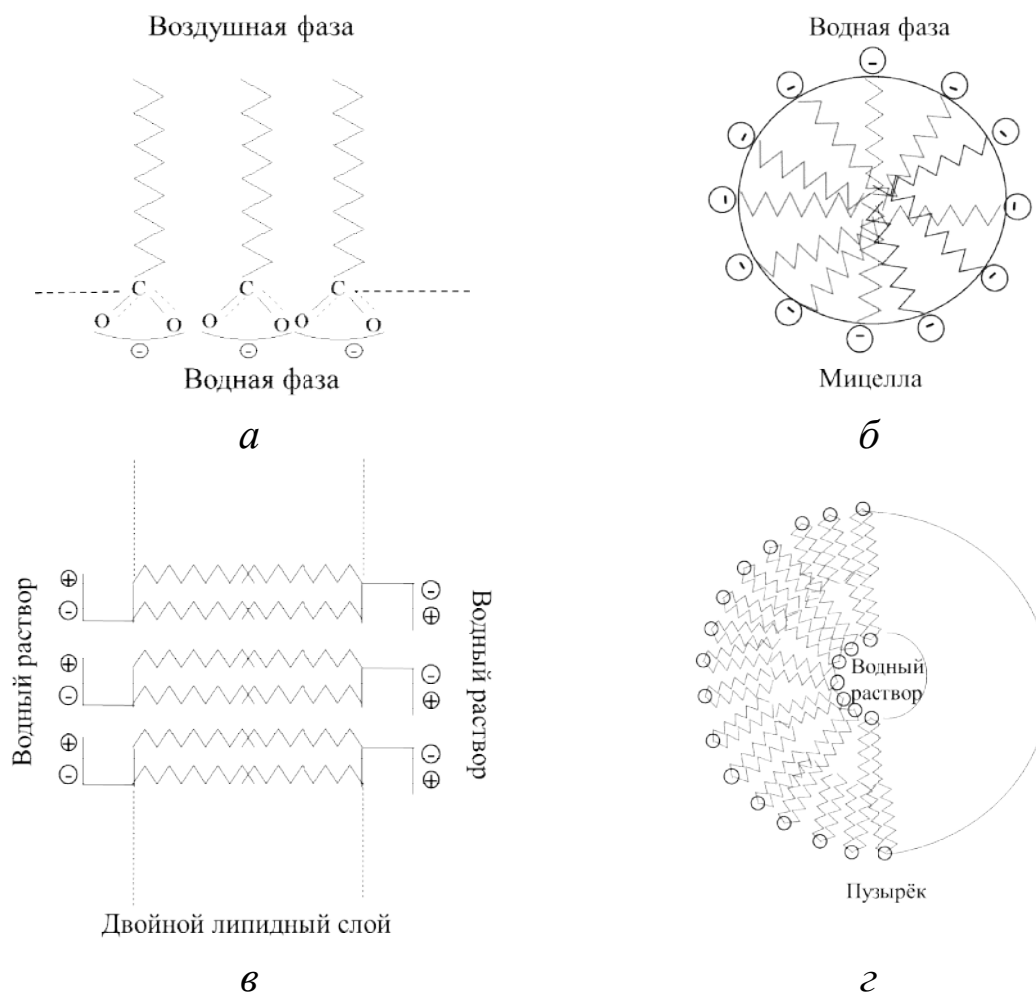


Рис. 7.1. Схематическое изображение некоторых типичных фаз фосфолипидов [1, 60]:

а - монослой липидов на границе «воздух-вода»; *б* - мицелла липида в воде; *в* - двухслойная липидная мембрана, разделяющая водные фазы; *г* - пузырёк с двойным слоем, отделяющим внутреннюю водную фазу от внешней водной фазы.

Мембранные белки, сфинголипиды, гликолипиды в двойном липидном слое выполняют такие важные функции, как избирательно пропускание при транспорте молекул через двойной слой из одной фазы другую водную фазу; получение и передачу сигналов, определение электрических свойств клетки, окрашивание поверхности для идентификации типа клетки [164]. Хотя липидный двойной слой эффективно служит для блокировки пассивного транспорта ионов, а также больших гидрофильных молекул и метаболитов, состоящих из малых молекул, тем не менее, вода легко движется через гидрофобную поверхность двойного слоя. Механизм подобного транспорта воды пока не изучен, но он ил-

люстрирует динамический характер фосфолипидных молекул в двойном слое. Быстрое движение воды через мембраны – важный аспект гомеостаза, с помощью которого индивидуальные клетки и биологические организмы дают ответ на биохимические и химические стрессы. Этот механизм не приводит к серьезным и разрушительным для организма процессам [1,55,160]. После рассмотрения сущности терминов «гидрофильность» и «гидрофобность» представляется возможным рассмотреть внутримолекулярных и межмолекулярных (нековалентных) взаимодействий для фосфолипидов.

7.1. Взаимодействия Лондона-Ван-дер-Ваальса в фосфолипидах

В образовании комплексов ФЛ друг с другом и с белками, немомыляемыми липидами существенное значение приобретают силы Ван-дер-Ваальса. Несмотря на то, что они обладают малой энергией, с помощью этих сил возможно активное взаимодействие благодаря большому количеству точечных взаимодействий (явление кооперативности) [1, 3, 160].

В 1930 году Ф. Лондон на основе квантово-механических представлений (исходя из волново-корпускулярного дуализма микрочастиц), разработал теорию дисперсионного взаимодействия [55, 159, 160]. Подобные взаимодействия обусловлены возникновением мгновенного и индуцированного (на мгновение) моментов диполей у неполярных молекул или атомов:

$$E_{\text{дисп}} = -\frac{3}{4} \cdot \frac{\alpha^2 h \nu_0}{r^6} \quad (7.1.1)$$

где α – средняя поляризуемость, h – постоянная Планка, ν_0 – частота колебаний электрического осциллятора, отвечающая нулевой энергии E_0 , присущей каждому атому или молекуле, r – расстояние между центрами атомов.

Произведение $h\nu_0$ приблизительно равно энергии ионизации I атома. Отсюда:

$$E_{\text{дисп}} = -\frac{3}{4} \cdot \frac{\alpha^2 I}{r^6} \quad (7.1.2)$$

Возникновение дисперсионных сил можно наглядно проиллюстрировать следующим образом (рис. 7.1.1):

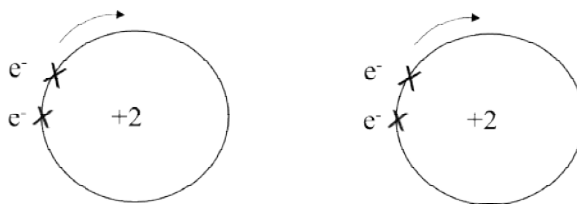


Рис. 7.1.1. Схема синхронного взаимодействия между мгновенными наведенными диполями атомов гелия

Пусть взаимодействуют атомы, имеющие сферическую симметрию, и, казалось бы, не имеющие дипольного момента. Однако, при мгновенной экспозиции можно увидеть, что электронная плотность несимметрично распределена в данный момент вокруг ядра, т.е. в процессе движения электронов в атомах возникают мгновенные диполи. При сближении атомов мгновенные диполи ориентируются друг относительно друга, синхронно возникая и исчезая во всей системе. Таким образом, возникновение мгновенных диполей при сближении атомов или неполярных молекул перестает быть независимым, что и вызывает их взаимное притяжение. Направление диполей меняется примерно с частотой $\nu = 10^{15}$ циклов в секунду, вследствие чего атом, молекула не обладают дипольным моментом постоянного направления [159].

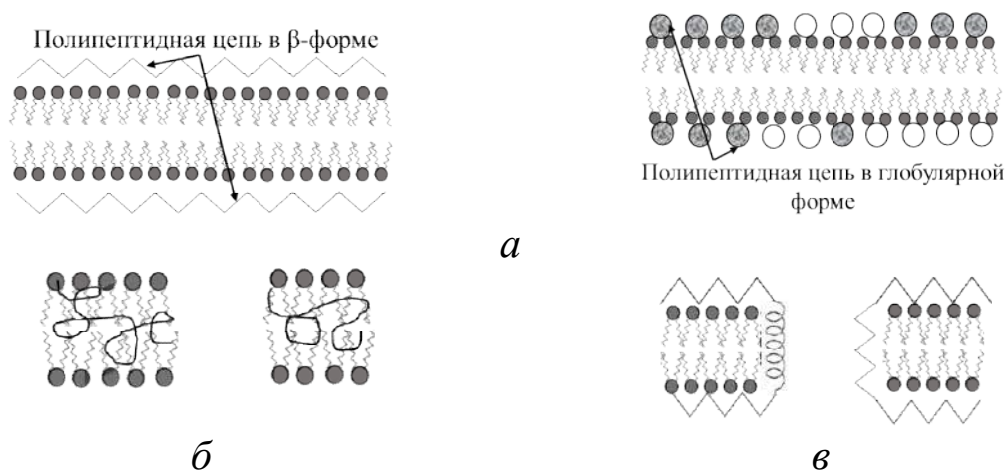


Рис. 7.1.2. Модели структуры мембран: *а* – два варианта модели биомембраны; *б* – модель двойного слоя с полипептидной цепью в ламеллярном бислое углеводородной фазе; *в* – модель двойного слоя с полипептидной цепью, проходящей сквозь слои липида.

Для неполярных частиц дисперсионные силы – практически главный и единственный источник, образующийся между ними Ван-дер-Ваальсовской связи. При этом необходимо отметить, что дисперсионные силы являются самыми слабыми из всех сил межмолекулярного притяжения.

Можно полагать, что при взаимодействии ФЛ с белками (как отмечено выше) образуется множество дисперсионных (гидрофобных) связей между жирнокислотными остатками ФЛ и белковыми гидрофобными участками (рис. 7.1.2).

Согласно модели (рис. 7.1.2а) структурные белки мембраны находятся внутри двойного слоя, а углеводородные хвосты липидов проникают в свободные пространства между ввернутыми полипептидными фрагментами. Согласно модели (рис. 7.1.2б) молекулы структурного белка проходят в определенных точках [1, 55] (повторяющихся через равные промежутки) сквозь двойной слой ФЛ. Можно полагать, что аминокислотные последовательности участков полипептидной цепи, находящихся внутри углеводородной фазы ФЛ, составлены преимущественно из гидрофобных аминокислот. Эти две модели заимствуют у гипотезы элементарной мембраны (рис. 7.1) представление о существовании непрерывного гидрофобного слоя, то есть белковые и фосфолипидные компоненты удерживаются вместе главным образом гидрофобными взаимодействиями [1, 55].

7.2. Закон действующих масс и выбор стандартного состояния веществ

Большая часть химических реакций протекает не до конца, что является характерным и при взаимодействии ФЛ с неорганическими и органическими ионами в водных растворах. О подобных системах говорят, что они находятся в состоянии химического равновесия, а реакцию, в которых протекают как прямое, так и обратное взаимодействие, называют обратимой. Для характеристики процесса химического равновесия применяют закон действия масс (ЗДМ). Если рассмотреть обратимую реакцию



то для нее справедливо равенство:

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = K_c \quad (7.2.2)$$

Если уравнение обратимой реакции представить, как:



то при равновесии

$$K_c = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}. \quad (7.2.4)$$

Константу K_c называют концентрационной константой равновесия реакции. Предполагать, что концентрация реагирующих веществ и ЗДМ соблюдаются при различных температурах и давлениях всегда, не представляется реальным. Поэтому в 1923 году Льюис предложил для описания процессов равновесия ввести новое понятия – активность, определяемую выражением:

$$A = f \cdot C, \quad (7.2.5)$$

где f – коэффициент активности, который является отражением влияния электростатических взаимодействий не только между ионами, но и ион-дипольных и диполь-дипольных (последние особенно значимы в присутствии в растворах органических компонентов). Фактически коэффициент активности является мерой отличия реальных систем от идеальных. Константа равновесия, выраженная через активности, сохраняют постоянство при любой концентрации реагентов, так как ЗДМ, выраженный через активности, выполняется точно. Выраженную таким образом константу называют термодинамической константой равновесия и обозначают через K :

$$K = \frac{a_C^c \cdot a_D^d}{a_A^a \cdot a_B^b} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \cdot \frac{f_C^c f_D^d}{f_A^a f_B^b} = K_c \cdot \frac{f_C^c f_D^d}{f_A^a f_B^b} \quad (7.2.6).$$

Коэффициент активности – безразмерная величина, а из уравнения (7.2.5) следует, что активность имеет размерность концентрации.

В случае, если в уравнении (7.2.6) невозможно определить коэффициент активности (например, f_B^b и f_D^d) отдельных ионов, то вводится понятие условной константы:

$$K' = \frac{a_C^c \cdot [D_D^d]}{a_A^a \cdot [B_B^b]} = \frac{[C]^c \cdot f_C^c \cdot [D_D^d]}{[A]^a \cdot f_A^a \cdot [B_B^b]} \quad (7.2.7).$$

Следует обратить внимание на обозначения коэффициента активности в зависимости от способа выражения концентрации. Когда концентрация выражается в виде моляльности m , то коэффициент активности обозначается буквой γ_i ; буквой y_i – когда концентрация выражена в виде молярности M_i ; буквой f_i – когда концентрация выражена в виде мольной доли. В разбавленных водных растворах разница между величинами молярности M (моль/л раствора) и моляльности m (моль/кг растворителя) очень мала и ею можно пренебречь. Соответственно, разница между коэффициентами активности M и m (y_i и γ_i) в разбавленных растворах пренебрежимо мала.

Чтобы получить сравнимые числовые значения активностей компонентов, участвующих в реакции, введено понятие стандартного состояния вещества при заданных условиях температуры и давления, когда веществу приписывается активность, равная единице. Выбор стандартного состояния вещества ограничивают одним и двух основных типов (рис. 7.2.1). Первый тип поведения определяется предельными характеристиками вещества по мере приближения его к нулевой мольной доле (в случае конденсированной фазы) или к нулевому парциальному давлению (в случае газовой фазы). Этот тип называют поведением по Генри. Другой тип – предельное поведение вещества по мере приближения его к мольной доле, равной единице. Такой тип называется поведением по Раулю. Следовательно, предполагается, что активность приближается к предельной концентрации в первом случае – по мере приближения концентрации к нулю (по Генри), во втором случае – по мере приближения мольной доли к единице (по Раулю).

Газы близки к стандартному состоянию при давлениях, достаточно низких для того, чтобы не происходило взаимодействие между их молекулами. Это позволяет говорить об «идеальном»

газе, имеющего активность (летучесть), равную единице при парциальном давлении 1 атм. Реальные газы обычно имеют активность меньше единицы при парциальном давлении, равном единице.

Для чистых твердых веществ активность принимается равной единице в их наиболее устойчивой кристаллической форме. Например, при наличии белого и красного фосфор в качестве стандартного состояния выбирается красный фосфор, как более устойчивый к внешним воздействиям.

Для чистых жидкостей концентрацию выражают в мольных долях, а их стандартное состояние характеризуется активностью, равной единице, при определенных температуре и давлении. Для воды как растворителя эти параметры равны 298 °С и 760 мм ртутного столба (одна атмосфера). Очевидно, что из уравнения (7.2.5) можно определить коэффициент активности f_i (или γ_i и y_i). Если система близка к идеальной и частицы не вступают в химическое взаимодействие, то

$$f \rightarrow 1 \text{ и } a = C,$$

то есть в идеальной системе активность и концентрация совпадают.

Следует заметить, что для растворителей (в том числе и для воды) можно представить несколько различных стандартных состояний: одно – когда определяется давление пара растворителя; другое – когда он выполняет роль непосредственно растворителя; третье – когда он является растворенным веществом. Концентрация воды в этих трех случаях, по-видимому, может быть выражена как парциальное давление, мольная доля и молярность. Поэтому при использовании выражений для констант равновесия необходимо указывать их стандартные состояния специально, или считать их известными.

В водных растворах коэффициенты активности определяемых ионов зависят от всех присутствующих в растворе ионов, поскольку не представляется возможным приготовить раствор, содержащий только катионы или анионы. Поэтому, несмотря на то, что теоретически можно рассматривать коэффициенты активности отдельных катионов (f_+) и анионов (f_-), экспериментально оп-

ределить эти величины невозможно. Поэтому для получения экспериментальных данных была введена величина, называемая среднеионным коэффициентом активности f_{\pm} . В общем случае для вещества состава A_xB_y среднеионный коэффициент активности соответствует уравнению:

$$f_{\pm} = \sqrt{x+y} \sqrt{f_A^x \cdot f_B^y} \quad \text{или} \quad (x+y) \lg f_{\pm} = x \lg f_A + y \lg f_B \quad (7.2.8)$$

Для раствора, содержащего однозарядного ионы, выражение для f_{\pm} примет вид:

$$f_{\pm} = \sqrt{f_A \cdot f_B} \quad (7.2.9)$$

В связи с тем, что в качестве исходного состояния рассматривается бесконечно разбавленный раствор электролита, у которого $f_{\pm} \rightarrow 1$, то увеличение концентрации электролита обычно сопровождается изменением f_{\pm} в соответствии с рис. 7.2.2. Из рисунка следует, что в разбавленном растворе f_{\pm} уменьшается при увеличении концентрации (достигая некоторого минимального значения), а затем начинает быстро расти, то есть существует два типа отклонений от идеального состояния:

отрицательные отклонения $f_{\pm} < 1$; $a < C$;

положительные отклонения $f_{\pm} > 1$; $a > C$.

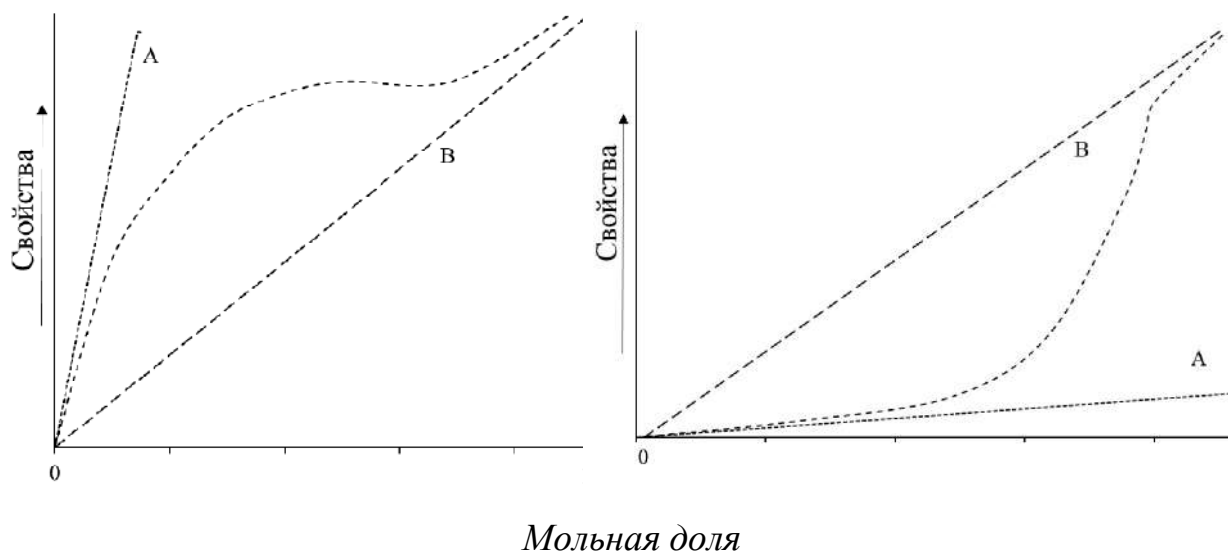


Рис. 7.2.1. Зависимость изменения свойств от мольной доли, иллюстрирующая относительное поведение по Генри (А) и Раулю (В)

Интересным фактом является то, что среднеионный коэффициент активности HCl равен единице при $\approx 2,0$ М растворе. Получается, что раствор себя как идеальный. На самом деле коэффициент активности равен единице, потому что идут два сопряженных процесса, противоположные эффекты которых компенсируют друг друга. Первый процесс связан с ион-ионными взаимодействиями между хлорид-ионами и водорода, в результате которых активность должна быть меньше, чем концентрация соляной кислоты, и соответственно коэффициент активности f_{\pm} принимает значения меньше единицы. Второй процесс обусловлен сольватацией (гидратацией) ионов водорода с образованием ионов гидроксония H_3O^+ , а также гидратацией хлорид-ионов Cl^- . Указанные взаимодействия приводят к образованию аквакомплексов и уменьшению количества свободной (несвязанной) воды, что приводит к росту активности, а среднеионный коэффициент активности f_{\pm} принимает значения больше единицы.

Первый и второй процесс в 2 М растворе HCl компенсируют друг друга и приводят к значению $f_{\pm}=1$. В растворах кислоты с концентрацией меньше 2 М преобладает первый эффект. Вторым эффектом является определяющим при концентрации HCl, больше 2 М.

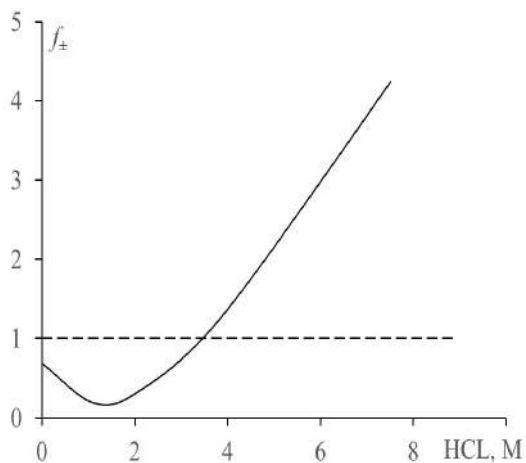


Рис. 7.2.2. Зависимость f от [HCl].

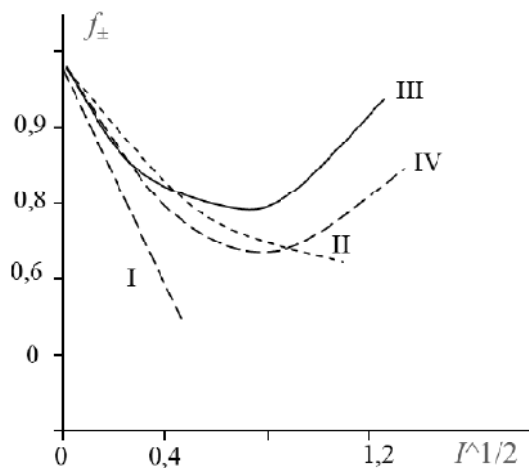


Рис. 7.2.3. Область применимости граничного (I) и расширенного (II) уравнения Дебая-Хюккеля; III – наблюдаемая зависимость; IV – расчет по уравнению Дэвиса.

Необходимо отметить, что зависимость f_{\pm} от концентрации хлористоводородной кислоты, представленная на рис. 7.2.2, является типичной для всех ионных растворов; изображается она кривой, которая качественно похожа на соответствующую кривую для растворов HCl. Естественно, абсолютные значения коэффициентов активности f_{\pm} , также как и концентрации, при которых коэффициенты активности минимален, а затем становится больше единицы, зависят от состава растворенного вещества.

Для химиков, связанных с проведением анализов, особый интерес на кривой рис. 7.2.2 представляет та область, в которой коэффициент активности f_{\pm} уменьшается с увеличением концентрации раствора и принимает значения $f_{\pm} < 1$. Эта область включает относительно разбавленные растворы, наиболее часто применяемые в аналитической практике.

Известно, что отклонения от идеального состояния любой системы обусловлены взаимодействием частиц, когда они находятся достаточно близко, то есть при достаточно высокой концентрации. В растворах электролитов, где межйонные взаимодействия главным образом электростатический характер, значительное влияние на отклонение от идеального состояния оказывает не только концентрация ионов, но и их заряд. Влияние указанных факторов нашло свое отражение в величине, названной ионной силой раствора I :

$$I = 1/2 \sum_i c_i z_i^2 ; \quad (7.2.10)$$

где C_i и Z_i – концентрация и заряд i -го иона.

В 1923 году Дебай и Хюккель предложили уравнение, связывающее логарифм коэффициента i -го иона с его зарядом и ионной силой раствора:

$$\lg f_i = A z_i^2 \sqrt{I} \quad (7.2.11)$$

В этом уравнении (7.2.11) A есть функция диэлектрической постоянной D растворителя и абсолютной температуры системы. В разбавленных водных растворах при 25°C величина D соответствует таковой чистой воды: $D=78,5$; а величина A будет равна

0,512. В этом случае для бинарного электролита уравнение принимает вид:

$$\lg f_{\pm} = -0,512 Z_A \cdot Z_B \sqrt{I} \quad (7.2.12)$$

где Z_A и Z_B – заряды ионов А и В.

Уравнение (7.2.11) имеет характер только предельного закона, который соблюдается при сравнительно низких значениях I (рис. 7.2.3). Для электролитов типа АВ (А и В – одновалентные ионы) уравнение соблюдается до ионной силы $I=0,05$. Если ионы А и В двухвалентные, то это уравнение применимо при $I<0,01$, а для трехвалентных ионов – при $I<0,05$. Вызвано это тем, что в уравнении (7.2.11) помимо электростатического взаимодействия (характерного для точечных зарядов) не учитываются силы отталкивания, возникающие даже между разноименными ионами и образование ионных пар при высоких значениях I . Кроме того, с ростом концентрации и заряда ионов в растворе увеличивается число молекул воды, входящих в состав гидратных оболочек ионов, что ведет к разрыву Н-связей между молекулами воды и изменению диэлектрической постоянной D среды в непосредственной близости от ионов (на расстоянии в несколько ионных радиусов D воды из-за разрыва водородных связей уменьшается в 4-10 раз). Поэтому для более точного описания экспериментальных данных было предложено новое уравнение, учитывающее влияние конечных размеров иона на коэффициенты активности f_{\pm} . Это уравнение получило название расширенного уравнения Дебая-Хюккеля. Для 25°С оно имеет вид:

$$\lg f_{\pm} = -0.512 z_A z_B \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (7.2.13)$$

где B – некоторая новая функция от D и T , равная для водных растворов при 25°С, $B=0,328$; a – эмпирический параметр, в первом приближении равный размеру сольватированного иона.

Как видно из рис. 7.2.3, уравнение (7.2.13) позволяет устанавливать значения f_{\pm} в очень широком интервале I . Так для электролитов с одновалентными ионами А и В, уравнение корректно до $I=0,1$.

Расширенное уравнение Дебая-Хюккеля позволяет вычислять коэффициенты активности только в области, где f_{\pm} уменьшается с увеличением ионной силы. Однако возникает вопрос о физическом смысле f_{\pm} при больших значениях I , когда ионная сила раствора будет больше единицы. Рост коэффициента активности до значений, больших единицы, можно объяснить изменениями, происходящими в растворителе при высоких значениях I . Одно наглядное представление о причинах этих отклонений, заключается в том, что при высоких концентрациях ионов электролита значительная часть молекул воды находится в составе аквакомплексов и H_2O нельзя рассматривать как свободный растворитель. В результате этого получается кажущееся повышение концентрации электролита, что вызывает рост коэффициента активности f_{\pm} . Поэтому были предложены модификации основных уравнений Дебая-Хюккеля, которые заключались в подборе эмпирических поправочных членов, чтобы улучшить соотношение между экспериментальными и вычисленными коэффициентами активности. Одним из таких модифицированных уравнений является выражение Дэвиса:

$$\lg f_{\pm} = -0.512 z_A z_B \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.2I \right); \quad (7.2.14)$$

В котором второй член внутри скобок введен для учета влияния на среднеионный коэффициент активности непостоянства диэлектрической проницаемости D , поляризуемости ионов, образования ионных пар. Из рис. 7.2.2-7.2.3 следует, что хотя уравнение Дэвиса не полностью соответствует экспериментальным данным, дает похожий минимум на кривой зависимости f_{\pm} от \sqrt{I} .

Наиболее корректные результаты при определении коэффициентов активности f_{\pm} для неорганических ионов при высоких значениях ионной силы I были получены Робинсоном и Стоксом:

$$\lg f_{\pm} = \frac{-0.512 z_A z_B \sqrt{I}}{1 + 0.328 \cdot 10^8 a \sqrt{I}} - \frac{n}{\nu} \lg a_w - \lg [1 - 0.018(n - \nu)m], \quad (7.2.15)$$

где n — число молекул воды, связанных с одной «молекулой» растворенного вещества; ν — число ионов на «молекулу» растворен-

ного вещества; a_w – активность воды; m – моляльность; a – размер иона (Å).

Первый член правой части уравнения – величина, введенная Дебаем-Хюккелем («Дебай-Хюккелевский член») всегда отрицателен. Второй член (или «член растворителя») вносит поправку на пониженную активность воды в солевом растворе, этот член всегда положителен, так как величина a_w меньше единицы. Третий член («масштабный член») учитывает гидратацию ионов, то есть связывание v ионов с n молекулами воды, которые при этом перестают действовать как молекулы растворителя. Этот третий член (как и второй) всегда положителен, так как величина «масштабного члена» меньше единицы.

В связи с тем, что взаимодействия органических веществ с водой и другими растворителями имеют ряд особенностей по сравнению с неорганическими компонентами, были предложены способы расчета f_{\pm} с участием органических ионов и молекул. Одним из тех, кто попытался это сделать, был Киланд, который предложил эмпирические значения параметра a для каждого иона и использования уравнения (7.2.13) при расчете коэффициентов активности ионов:

$$\begin{aligned} \lg f_{\pm} &= -0,512 Z_i^2 \sqrt{I} / (1 + Z_i^{1/2}) - \text{для неорганических ионов;} \\ \lg f_{\pm H_3O^+} &= -0,512 \sqrt{I} / (1 + 2,97\sqrt{I}) - \text{для ионов гидроксония;} \\ \lg f_{\pm} &= -0,512 Z_i^2 \sqrt{I} / (1 + 2\sqrt{I}) - \text{для органических ионов.} \end{aligned} \quad (7.2.16)$$

Наиболее полное представление о влиянии сольватации и ассоциации органических ионов на коэффициенты активности f_{\pm} привели Н.А. Измайлов и Е.Ф. Иванова. Ими выведено уравнение (аналогичное уравнению Р.А. Робинсона – Р.Г. Стокса), но с учетом наличия диссоциированной и недиссоциированной части органического вещества:

$$\lg f_{\pm} = \frac{-0.512 z_A z_B \sqrt{m\alpha}}{1 + 0.328 \cdot 10^8 a \sqrt{m\alpha}} + \lg \alpha - \frac{n}{v} \lg a_w - \lg \left[1 + \frac{MB}{1000} (n - v\varepsilon)m \right] \quad (7.2.17)$$

В первом члене m_{α} – ионная концентрация, равная общей концентрации, умноженной на степень диссоциации.

Химикам приходится иметь дело не только с проведением анализа, когда работа проводится с разбавленными растворами, где коэффициент активности f_{\pm} принимает значения меньше единицы. Многие процессы выделения, разделения, концентрирования, происходящие с участием ФЛ, требуют знания особенностей взаимодействия липидов и сопутствующих компонентов в концентрированных растворах, когда коэффициент активности f_{\pm} превышает значения единицы.

Необходимо заметить, что если концентрация любого раствора внутри или на поверхности биологической мембраны, в состав которой входят фосфолипиды, вещества и растворителя, то его активность – нескольких других параметров – $I, Z, D, T, a, \alpha, a_w$. Поэтому и существуют растворы с одинаковой концентрацией растворенного вещества, но с различной активностью в зависимости от конкретных этих параметров в фосфолипидной мембране. Уравнение Измайлова-Ивановой позволяет рассчитать зависимость ионного значения коэффициента активности f_n (представляющего собой обычный коэффициент активности f_i , наблюдаемого экспериментально в случае неполной диссоциации или ассоциации: $\ln f_i = \alpha \ln f_n$), полностью совпадающую с экспериментальными данными (рис. 7.2.4).

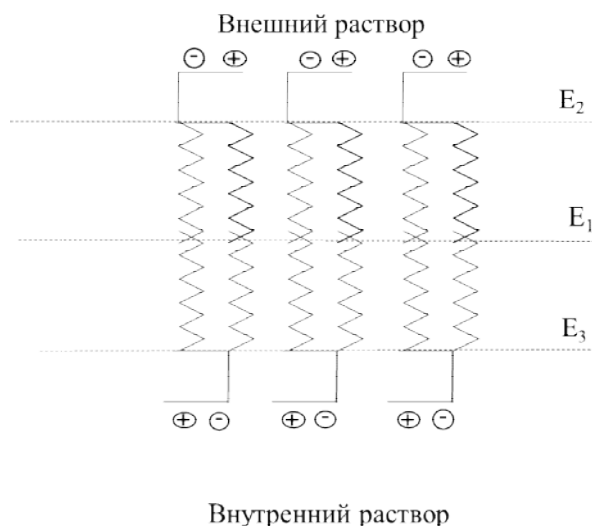


Рис. 7.2.4. Схематическое изображение типичной двухслойной фосфолипидной мембраны, разделяющей внешний и внутренний растворы.

Штриховыми линиями показаны границы раздела фаз, на которых возникает разность потенциалов.

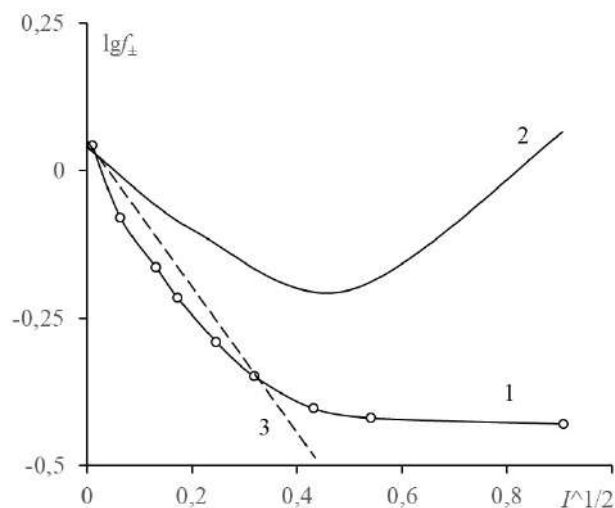


Рис. 7.2.5. Зависимость обычных коэффициентов активности $\lg \pm$ (1), ионных коэффициентов $\lg n$ (2) и рассчитанных по уравнению Дэвиса (3).

7.3. Диполь-дипольные взаимодействия в фосфолипидах

Возникновение дельнедействующих сил Ван-дер-Ваальса, помимо дисперсионных, связано с наличием у взаимодействующих молекул постоянных диполей μ_1 и μ_2 . В этом случае в силу электростатического притяжения молекулы ориентируются по отношению друг к другу противоположными полюсами [160, 165, 166, 203] так, чтобы их потенциальная энергия была минимальна:

$$E_{орз} = -\frac{2}{3} \cdot \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{kTr^6} \quad (7.3.1)$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, r – расстояние между центрами диполей, μ_1 и μ_2 – дипольные моменты первой и второй молекул. Знак (-) означает, что при сближении молекул энергия понижается (молекулы взаимно притягиваются). Подобное взаимодействие называют ориентационным или диполь-дипольным. Чем полярней молекулы, тем выше энергия ориентационного взаимодействия $E_{ор}$. $E_{ор}$ зависит также от угла между двумя диполями и от угла между каждым диполем и линией, соединяющей оба диполя. В зависимости от этого, при фиксированном расстоянии два диполя могут притягиваться или иметь нулевую энергию взаимодействия (рис. 7.3.1):

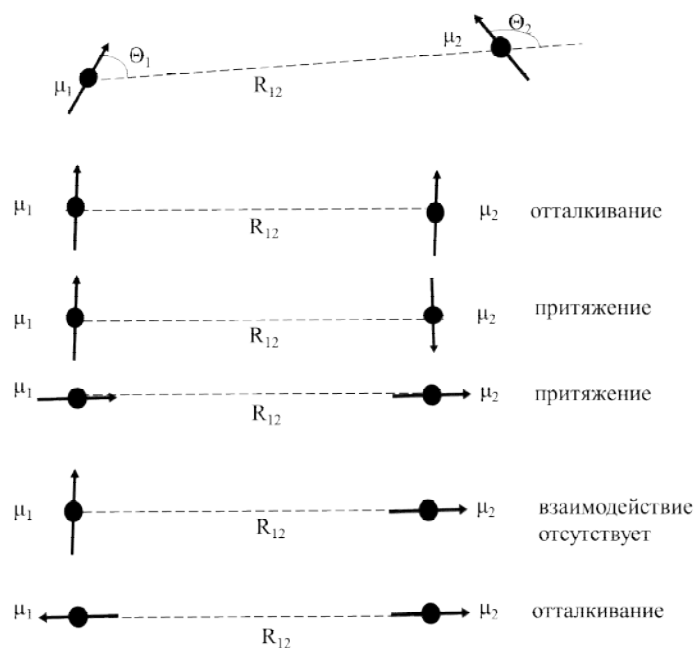


Рис. 7.3.1. Взаимное расположение двух точечных дипольных моментов μ_1 и μ_2 , находящихся на расстоянии R_{12} . Энергия взаимодействия зависит от обратной величины куба расстояния между диполями и их взаимной ориентации.

Диполь-дипольное притяжение имеет место лишь тогда, когда энергия притяжения превышает тепловую энергию молекул ($RT=2.5$ кДж/моль) при комнатной температуре, что обычно проявляется в жидких и твердых фазах. При высоких температурах увеличивается энергия теплового движения молекул, и диполь-дипольное взаимодействие отсутствует.

Ориентационное взаимодействие можно распространить на ион-дипольное притяжение, когда диполь ориентируется относительно иона разноименными полюсами (рис. 7.3.2). Такое взаимодействие проявляется в процессе растворения веществ, когда происходит диссоциация полярных молекул, а также ионных кристаллов в полярных растворителях с образованием гидратов (сольватов), например, $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_n$; $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_m$ и т.п.

Еще одной причиной возникновения сил Ван-дер-Ваальса является индукционное взаимодействие (или эффект Дебая). Суть подобного эффекта заключается в том, что полярная молекула наводит (индуцирует) своим полем дипольный момент на неполярной молекуле, что способствует их взаимному притяжению (рис. 7.3.3).

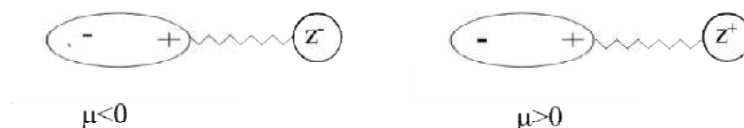


Рис. 7.3.2. Ион-дипольное взаимодействие (Z -заряд иона).

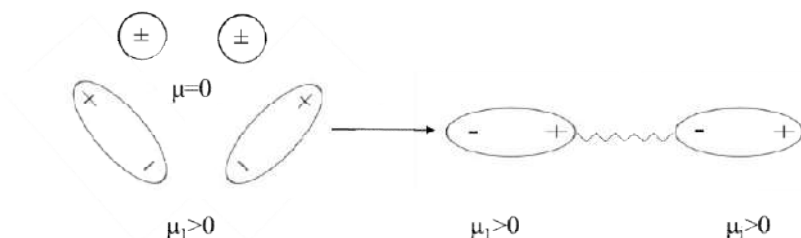


Рис. 7.3.3. Индукционный эффект: μ , μ_1 и μ_i – дипольные моменты неполярной молекулы, полярной молекулы и индуцированного диполя соответственно.

Энергия индукционного эффекта равна:

$$E_{\text{инд}} = -2 \alpha \mu_1^2 / r^6 \quad (7.3.2)$$

где α – средняя поляризуемость.

В отличие от энергии ориентационного взаимодействия, энергия индукционного взаимодействия (как и дисперсионного) не зависит от температуры, поскольку ориентация наведенного диполя не является произвольной и определяется расположением постоянного диполя. Из уравнения (7.3.2) следует, что энергия индукционного взаимодействия тем больше, чем больше поляризуемость α второй молекулы, и убывает обратно пропорционально шестой степени расстояния r между центрами диполей. Этот вид взаимодействия более слаб, чем ориентационный эффект. Главным образом он проявляется в растворах полярных соединений в неполярных растворителях [203].

Требуется пояснения факт так называемого эффективного взаимодействия Лондона-Ван-дер-Ваальса, основанного на значениях энергии притяжения (Лондона) и отталкивания (Ван-дер-Ваальса) [160]. Энергия Лондоновского притяжения обратно пропорциональна шестой степени расстояния между двумя атомами (уравнение 7.3.3):

$$E(r) = -A_{ij} / r_{ij}^6 \quad (A_{ij} \text{ положительна}). \quad (7.3.3)$$

(Константа A_{ij} зависит как от атома i , так и от j ; она имеет размерность энергии, умноженной на шестую степень расстояния).

Наилучшим приближением для описания отталкивания Ван-дер-Ваальса является обратная зависимость от расстояния в двенадцатой степени:

$$E(r) = - B_{ij} / r_{ij}^{12} \quad (B_{ij} \text{ положительна}), \quad (7.3.4)$$

где r_{ij} – расстояние между атомами i и j ; B_{ij} – константа положительна и зависит от обоих атомов, ее размерность – энергия, умноженная на расстояние в 12 степени. Величины A_{ij} и B_{ij} приведены в табл. 7.3.1.

Таблица 7.3.1. Параметры A_{ij} и B_{ij} , входящие в выражение энергии меж-атомных взаимодействий Лондона- Ван-дер-Ваальса (рассчитаны по уравнениям 7.3.3 и 7.3.4)*

	H...H	O...O	C...C	O...H	C...H	C...O
A_{ij} (кДж/моль·Å ⁶)	222	1048	1796	440	613	1348
B_{ij} (кДж/моль·Å ¹²)	21300	413500	1387000	89200	182300	751400
ΣВан-дер-Ваальсовских радиусов (Å)	2,40	3,04	3,40	2,72	2,90	3,22

*Энергия называется потенциалом 6-2 [160].

Ван-дер-Ваальсовский радиус определяется как расстояние между двумя атомами, при котором энергия их отталкивания начинает быстро возрастать. Энергия отталкивания двух атомов кислорода (табл. 7.3.1) начинает быстро расти при расстоянии около 3 Å. Следовательно, Ван-дер-Ваальсов радиус атома кислорода равен примерно 1,5 Å. (Предваряя рассмотрение природы водородных связей, необходимо отметить, что одним из способов присутствия Н-связей между двумя атомами заключается в нахождении суммы их Ван-дер-Ваальсовых радиусов. Сближение атомов а меньшее расстояние будет обусловлено водородной связью. Если два атома О, или N, или один N, или один О находятся на расстоянии 2,8 Å друг от друга, то они почти всегда водородно связаны).

Кривая на рис. 7.3.4 соответствует потенциалу 6-12. Минимум энергии между двумя атомами кислорода в двух молекулах воды

соответствует расстоянию 3 Å. Если не будут действовать никакие другие силы, то равновесное расстояние между двумя взаимодействующими атомами кислорода равно 3 Å. Увеличение этого расстояния свидетельствует о доминировании сил притяжения; если расстояние уменьшается – доминируют силы отталкивания. Самым устойчивым состоянием является состояние с минимумом энергии.

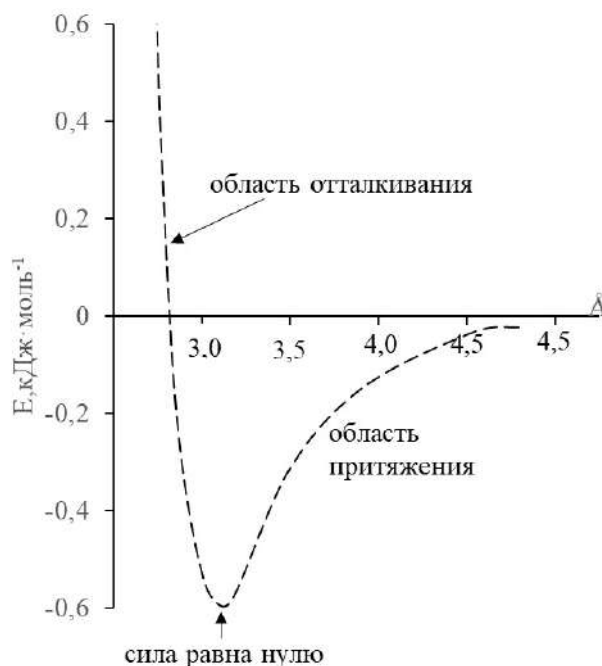


Рис. 7.3.4. Энергия взаимодействия Лондона – Ван-дер-Ваальса двух атомов кислорода в двух молекулах воды.

Лондоновское притяжение осуществляется только тогда, когда две химические группы сближаются на расстояние, равное сумме их Ван-дер-Ваальсовых радиусов, то есть когда две химические группы «контактируют» друг с другом. Выше отмечено, что Лондоновское притяжение возрастает для химических групп с высокой поляризуемостью или с делокализованными электронами. В частности, в ароматических основаниях нуклеиновых кислот стильное Лондоновское притяжение происходит благодаря высокой делокализации электронов, обуславливающих большую поляризуемость гуаниновых и цитозиновых, а также адениновых и тимининовых фрагментов [167]. Это притяжение проявляется наиболее ярко, когда близко контактируют два ароматических кольца. Подобные взаимодействия часто именуют «пакетными»

(или стекинг) взаимодействиями, поскольку ароматические кольца, «упакованные» подобно монетным стопкам в пакете нуклеиновой кислоты (рис. 7.3.5).

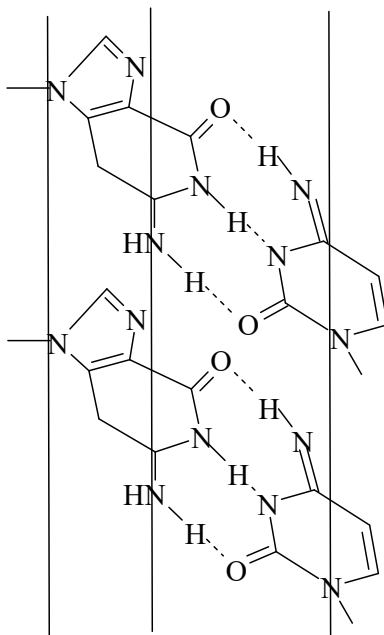


Рис. 7.3.5. Одна из возможных схем стекинг-взаимодействий азотистых оснований гуанин-цитозин, обуславливающих вторичную структуру нуклеиновых кислот и их стабильность.

Стекинг-упаковка ароматических колец представлена штриховыми линиями. Точками обозначены Н-связи.

Учитывая тесную связь между вторичной структурой и биологической активностью нуклеиновых кислот можно полагать, что природа и специфичность стекинг-взаимодействия оказывает влияние на механизм многих биохимических и генетических процессов [1, 55].

Является правомочным предположение, что холестерол, стигмастерол и другие стероидные структурные фрагменты биологических мембран (на долю которых приходится до 30% от общего содержания липидов) стабилизируются за счет стекинг-взаимодействий. Весьма интересным является то обстоятельство, что целостность молекулярной организации мембран, их тонкая структура поддерживается исключительно за счет гидрофобных (дисперсионных) и полярных (ориентационный, индукционный эффекты, водородные связи) взаимодействий. Никаких данных, которые свидетельствовали бы о наличии ковалентных связей

между последовательно расположенными в биологических мембрана молекулами липидов и между прилегающими друг к другу липидными и белковыми молекулами, не существует. В некоторых случаях фосфолипиды и другие липиды можно почти полностью экстрагировать из мембран смесями спирта и хлороформа [1, 3, 20]. Если затем добавить эти липиды обратно к мембранам, подвергшимся экстрагированию, то будет происходить реассоциация, т.е. липиды снова включатся в мембранные биослои. Отсюда можно полагать, что мембраны – это системы, соответствующие минимуму свободной энергии и поэтому способны к самоорганизации (самосборке) [1, 160].

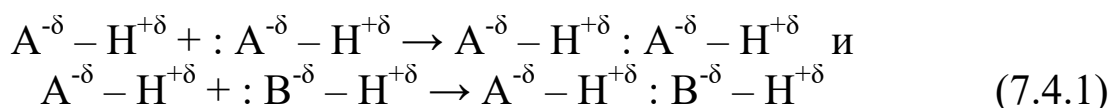
Поскольку каждой биологической мембране соответствует определенное, характерное только для нее соотношение липидов, представляется возможным, что двумерно распределение в мембране имеет строго специфический характер. У гликолипидов, фосфоглицеридов, сфинголипидов их полярные «головы» сильно отличаются по размерам, полярности, электрическому заряду, по геометрии, что дает возможность для самого разнообразного сочетания вышеназванных липидов в различных мембранах [1, 55, 161].

Взаимодействие полярных групп корректно не может быть охарактеризовано без учета еще одного типа связей в фосфолипидах – водородных связей (Н-связей). Поэтому в следующем разделе представляет интерес рассмотреть возможность образования Н-связей (а они в фосфолипидах осуществляются между парами атомов О и N за счет неподеленной электронной пары [47, 139, 169, 203]) полярными «головами» липидов.

Небольшое отступление (но весьма необходимое) перед разделом 7.4. Конкретное сочетание липидов в той или иной мембране определяется структурой мембранных белков, которая закодирована в соответствующих генах. Это позволяет предположить, что характер взаиморасположения различных полярных «голов» молекул сложных мембранных липидов несет информацию о структуре и свойствах мембраны (подобно тому, как порядок чередования различных R-групп аминокислотных фрагментов, содержит информацию о структуре и свойствах белка) [1, 55, 161].

7.4. Водородные связи в фосфолипидах

Существование водородных связей впервые установлено в 80-х годах XIX века М.А. Ильинским и Н.Н. Бекетовым. Известно, что атом водорода, несмотря на наличие одной 1S орбитали, может быть связан одновременно с двумя одинаковыми (или разными) томами, входящими в состав одной и той же молекулы или разных молекул [160, 203]. Таким образом, атом водорода имеет координационное число 2 в соответствии со схемой:



Одна из связей, называемая водородной, изображается точками.

Установлено, что межмолекулярная водородная связь возникает между атомами водорода одной молекулы и атомами небольшого размера наиболее электроотрицательных элементов: фтора, кислорода, азота, хлора, серы и др., входящих в состав другой молекул. Существует и внутримолекулярная водородная связь, о которой будет сказано ниже.

Ранее наличие водородной связи объясняли исходя только из электростатической природы (используя для ее характеристики Ван-дер-Ваальсовские взаимодействия, в первую очередь диполь-дипольные составляющие) [139, 160, 203]. Однако, в дальнейшем было показано, что в ряде случаев полярные молекулы $A^{-\delta} - H^{+\delta}$, имеющие малые величины дипольных моментов, образуют более прочные ассоциаты $B^{-\delta} - H^{+\delta}$ с Н-связью, чем молекулы с большим дипольным моментом (ур-е 7.4.1). Квантовомеханические расчеты показывают, что диполь-дипольные взаимодействия играют определяющую роль при образовании Н-связей при начальном сближении молекул (за счет их взаимной поляризации). Затем наблюдается перенос электронной плотности от донора А (имеющего неподеленную электронную пару) к атому водорода, выступающего в качестве акцептора. При этом происходит понижение энергии системы.

Можно в данном случае говорить о поляризации связи $A^{-\delta} - H^{+\delta}$, т.е. в молекуле происходит значительное смещение

электронной плотности от атома водорода к атому более электроотрицательного элемента В. Это приводит к значительному осwoбoждению S-орбитали атома водорода и практически «голый» протон оказывает сильное поляризующее действие на электронные оболочки атома А, оттягивая их на себя. Подобное взаимодействие относится к донорно-акцепторному типу и проявляется на заключительных этапах.

По всей видимости, водородная связь имеет слабый ковалентный компонент, на что указывают сравнительно малые длины связей и достаточно высока энергия связи, достигающая 200-250 кДж/моль (как в двухатомных молекулах). Кроме того, поскольку своих электронов у протона нет, отталкивание молекулы, связанной с ним водородной связью, ослабевает значительно. Все вышеописанное ведет к росту энергии Н-связи, а, следовательно, к ее упрочнению.

Таким образом, энергия водородной связи складывается из энергии электростатического притяжения (диполь-дипольные эффекты); из энергии поляризации и переноса заряд; из энергии отталкивания. В понижение энергии системы особый вклад вносит первый эффект. Существуют слабые и сильные Н-связи (до 8-40 и 120-250 кДж/моль) соответственно.

Несмотря на то, что со времени открытия этого типа связи прошло более 100 лет, единой ее теории пока не существует. Слабые водородные связи с малой энергией и асимметричным расположением атома водорода (ближе к атому В) описываются с позиции использования донорно-акцепторного, электростатического, Ван-дер-Ваальсовского взаимодействий с учетом их совместного влияния. Кривые потенциальной энергии для протона в водородном мостике имеют вид несимметричной ямы (рис. 7.4.1). Сильные водородные связи, характеризующиеся относительно короткой длиной Н-связи, большей энергией и симметричным расположением атома водорода, рассматриваются как системы с делокализованной электронной плотностью (сходные с трехцентровой связью в молекуле диборана B_2H_6) [160,203]. Кривые потенциальной энергии для протона в водородном мостике для сильной связи имеют вид симметричной ямы (рис. 7.4.1).

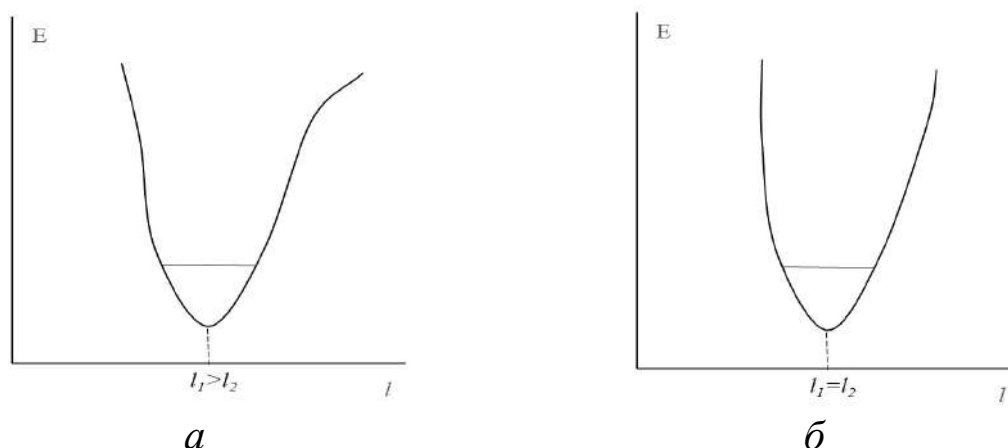


Рис. 7.4.1. Потенциальные кривые для протона в водородном мостике: *a* – слабая связь; *б* – сильная связь.

Рассмотрим образование сильной водородной связи на примере водородного мостика $B - H \cdots A$ с его четырьмя электронами (два, отвечающие за ковалентную связь, принадлежат молекуле $B - H$, два – атому A) с позиций метода молекулярных орбиталей. Молекулу $B - H$ можно рассматривать как двухатомную молекулу (наподобие H_2) с двумя орбиталями: Ψ_{BH} – связывающей и Ψ^* – разрыхляющей, оба электрона которой располагаются на связывающей орбитали. Неподеленная электронная пара атома A занимает атомную орбиталь Ψ_A (рис. 7.4.2).

Волновая функция Ψ электрона в водородной связи берется как линейная комбинация этих трех орбиталей:

$$\Psi = \Psi_{BH} \pm \Psi_{BH}^* \pm \Psi_A \quad (7.4.2)$$

При этом образуются три трехцентровые молекулярные орбитали водородного мостика $B - H \cdots A$: разрыхляющая Ψ_3 ; связывающая Ψ_2 , локализованная в основном у донора A ; несвязывающая Ψ_1 , тяготеющая главным образом к группе $B - H$.

Согласно принципу наименьшей энергии и принципу Паули электроны попарно заполняют связывающую и несвязывающую молекулярные орбитали Ψ_2 и Ψ_1 . Разрыхляющая молекулярная орбиталь Ψ_3^* остается свободной. Это свидетельствует об образовании водородной связи, а значит, об устойчивости водородного мостика с близкими по энергии и длине связями $B - H$ и $H \cdots A$.

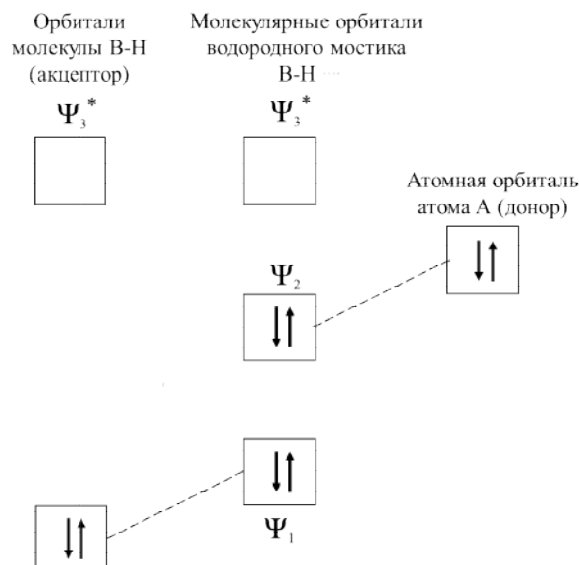


Рис. 7.4.2. Ψ_1 – несвязывающая, Ψ_2 – связывающая и Ψ_3^* – разрыхляющие молекулярные орбитали водородного мостика.

Следует отметить, что при образовании обычной химической связи между атомами, ядрами комплексов и лигандами энергетические уровни молекулярных орбиталей понижаются для всех участников системы.

В отличие от обычных химических связей при образовании водородной связи между молекулами энергетические уровни связывающих молекулярных орбиталей Ψ_2 (локализованные в основном на доноре «электронной пары :A»), всегда понижаются, а уровни, локализованные на акцепторе В, повышаются по сравнению с энергетическими уровнями свободных молекул.

По своим свойствам водородная связь насыщена и направлена. Насыщенность объясняется способностью атома водорода образовывать с атомом электроотрицательного элемента лишь одну водородную связь. Второе свойство (направленность) – объясняется следующим. Несмотря на то, что водородная связь носит преимущественно электростатический характер, она отличается от ионной (ненаправленной) связи тем, что обязательно направлена к атому водорода. Следовательно, водородная связь обладает свойствами как ионных (будучи преимущественно электростатической), так и ковалентных связей (направленность в пространстве) (рис. 7.4.3). Вследствие этого второе свойство водородной связи оказывает сильное влияние на структуру много численных

веществ в различных агрегатных состояниях [137, 139, 160, 203]. Ассоциация молекул за счет направленных и насыщенных водородных связей может служить причиной образования ими димеров и полимеров. Последние могут иметь линейное, слоистое, спиралевидное, зигзагообразное, каркасное, разветвленное строение, т.е. представляет собой одномерные, двумерные и трехмерные структуры.



Рис. 7.4.3. Направленность водородной связи.

a - наиболее прочная водородная связь образуется в случае, если атом акцептор расположен на линии О – Н; *б* - атом кислорода (являющийся акцептором) не находится на линии О – Н, возникающая водородная связь менее прочна.

Превалирующую роль водородные связи играют в структуре жидкой воды и льда. Каждая молекула воды способна дать для образования водородной связи два атома водорода, а каждый атом кислорода в состоянии принять две водородные связи. Для образования максимального числа водородных связей во льду каждый атом кислорода должен быть окружен четырьмя другими атомами О, расположенными тетраэдрически по отношению к центральному атому [203] (рис. 7.4.4). При этом два атома водорода связаны с атомом кислорода ковалентными связями ($r = 75$ пм), оставаясь связанными с другими атомами кислорода.



В жидкой воде при 0°C каждая молекула воды в любой данный момент связаны водородной связью в среднем с 3,4 других молекул воды. Среднее расстояние кислород – кислород несколько превышает соответствующее расстояние для льда, составляя около $2,90 \text{ \AA}$ при 15°C и около $3,05 \text{ \AA}$ при 83°C . Исходя из теплоты плавления льда, был сделан расчет, согласно которому в про-

цессе образовании жидкой воды при таянии льда (0°C) разрывается всего около 15% водородных связей льда. При 100°C между молекулами воды еще существует достаточно сильное взаимодействие, на что указывает высокая теплота испарения воды. Практически полностью водородные связи между молекулами воды разрушаются только при нагревании водяного пара при 600°C [1, 55, 159, 160, 166].

Из-за образования рыхлой каркасной кристаллической структуры (рис. 7.4.4) при помощи водородных связей лед имеет меньшую плотность, чем жидкая вода при температуре плавления. Примерно на 10% мольный объем льда больше по сравнению с жидкой водой в точке замерзания.

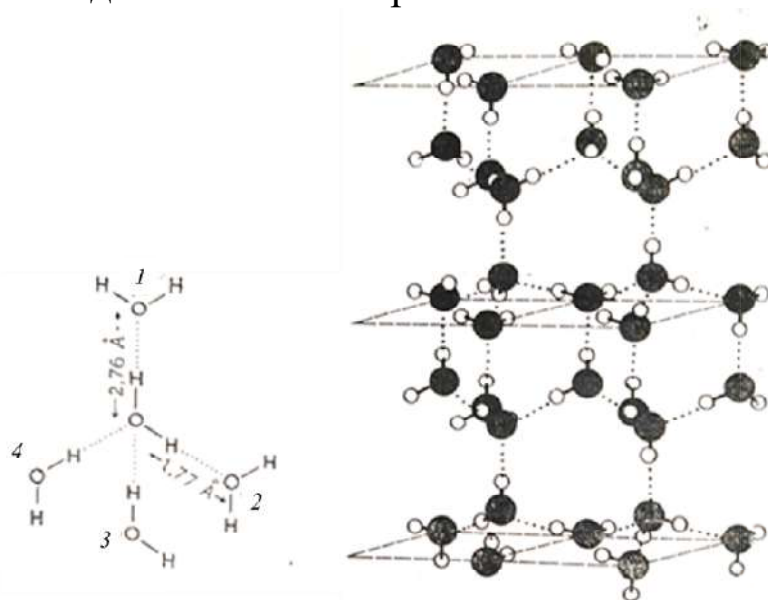


Рис. 7.4.4. Расположение водородных связей между молекулами воды во льду и пространственная решетка льда.

Внизу – тетраэдрическое расположение водородных связей вокруг молекулы воды во льду. Молекулы 1 и 2 и центральная молекула расположены в плоскости бумаги; молекула 3 находится впереди и молекула 4 – позади этой плоскости. Справа – изображение пространственной решетки льда, образованной молекулами воды [1].

При плавлении льда его каркасная структура частично разрушается, что приводит к сближению молекул воды и повышению ее плотности. В жидкой воде частично сохраняется структура водородных связей кристаллического льда. Она состоит как бы из кластеров молекул, связанных водородными связями. При дальнейшем повышении температуры кластеры воды разрушаются, и объем жидкой фазы продолжает уменьшаться (плотность растет).

Это продолжается до температуры 4°C, при которой вода имеет минимальный объем и максимальную плотность. Выше этой температуры усиливается эффект теплового расширения воды.

Вода – прекрасный растворитель и огромное количество реакций (в том числе и с фосфолипидами) происходит именно в водных растворах. Присутствие полярных растворенных веществ, например, NaCl, вызывает изменения в структуре жидкой воды. Часть водородных связей между молекулами воды разрушается, а взамен происходит ион-дипольное взаимодействие (ионы Na^+ и Cl^- окружают себя оболочкой водных диполей) с образованием гидратированных катионов и анионов (рис. 7.4.5). Геометрия таких гидратированных ионов отличается от геометрии «мерцающих скоплений» (кластеров), образованных за счет водородных связей. Они более упорядочены и имеют более регулярную структуру:

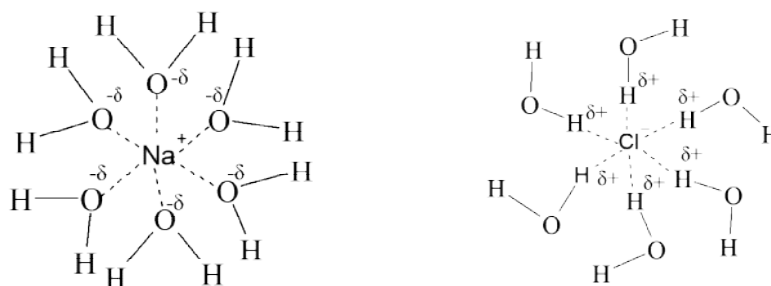


Рис. 7.4.5. При растворении твердого NaCl в воде образуются гидратированные ионы. Ион-дипольные взаимодействия приводят к образованию гидратных оболочек вокруг каждого иона.

В глубине растворителя (воды) водородные связи между молекулами воды сохраняются. Поскольку каждый гидратированный Na^+ и Cl^- в 0,15М растворе отстоят друг от друга на расстоянии 19Å (табл. 7.4.1), а размеры гидратированного катиона Na^+ и аниона Cl^- составляют от 5 до 7 Å, ясно, что в трехмерной структуре и свойствах жидкой воды происходят значительные изменения. Вышеназванная концентрация NaCl приблизительно соответствует в плазме крови и в цитоплазме клеток, что свидетельствует о значительных изменениях в трехмерной структуре воды в биологических жидкостях.

Таблица 7.4.1. Среднее расстояние между ионами Na^+ и Cl^- в растворе NaCl.

Концентрация, М	Расстояние, Å
0,001	94
0,010	44
0,100	20
0,150	19
1,000	9,4

Необходимо повторно подчеркнуть, что неполярные молекулы практически не взаимодействуют с водой. Тем не менее, неполярные группы, входящие в состав фосфолипидов, подвергаются воздействию воды, хотя при этом жесткая сетчатая структура из молекул воды не образуется. Тем не менее, затрачивается определенная энергия на формирование небольших промежуточных водных кластеров, стабилизированных взаимными поверхностными водородными связями воды с неполярными «хвостами» фосфолипидов. Это дает существенный вклад в гидрофобные взаимодействия.

Ионы водорода в воде, как известно, не существуют в виде «голых» протонов. Даже гидратированные ионы H_3O^+ подвергаются дополнительной сольватации за счет водородных связей, так что реально существующими являются ионы H_9O_4^+ (рис. 7.4.6).

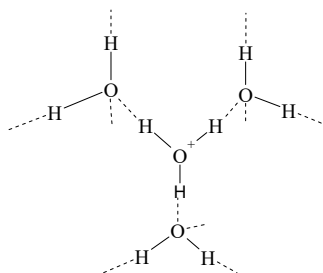


Рис. 7.4.6. Гидратированная форма иона гидроксония (H_9O_4^+). Гидратная оболочка стабильна при температуре до 100°C [137, 139].

Скорость миграции H^+ ионов в электрическом поле во много раз превышает скорость миграции Na^+ и K^+ . Высокая электростатическая подвижность иона H_3O^+ обусловлена способностью протона легко «перескакивать» из иона гидроксония в соседнюю молекулу воды, причем скорость такого «перескока» необычайно

высока. Механизм «перескоков» протона (рис. 7.4.7) обеспечивает его скорость переноса в воде значительно превосходящую скорость диффузионного перемещения самих ионов H_3O^+ . «Протонные» перескоки, получившие название «туннельных» переходов протона, обуславливают также исключительно высокую электропроводность льда [137, 139]. Способность протонов легко проходить сквозь массу связанных водородными связями молекул воды имеет большое значение для функционирования биологических систем.

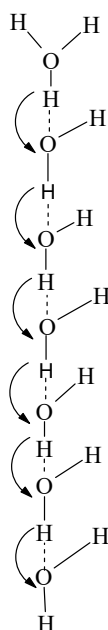


Рис. 7.4.7. «Перескоки» протонов. В результате «туннельного» эффекта самая нижняя молекула воды превращается в ион гидроксония [1, 77, 160].

Высокая аномальная подвижность характерна и для ионов гидроксила OH^- в воде, которую объясняют также их переносом по «туннельному» механизму (рис. 7.4.8):

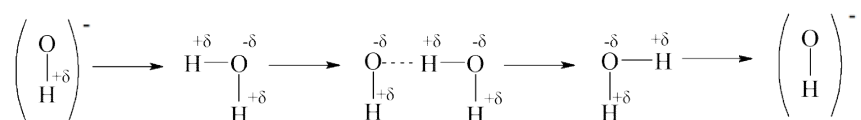


Рис. 7.4.8. Перенос OH^- -ионов в воде по водородным связям («туннельный» эффект).

Ассоциация молекул за счет направленных и насыщенных водородных связей характерна не только для воды, но и многих биологических компонентов (в том числе и для фосфолипидов).

При этом фосфолипиды могут образовывать как межмолекулярные ассоциаты, так и участвовать в образовании внутримолекулярных водородных связей. В фосфолипидах (как и в других биологических системах) большинство водородных связей осуществляется неподеленной электронной парой атомов О и N. Углерод и элементы следующего периода Периодической системы Д.И.Менделеева (например, S и Cl) образуют очень слабые водородные связи. С этой точки зрения разные диполи фосфолипидов способны образовывать водородные связи не только с водой, но и с друг с другом. Так, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидил-О-аминоацетилглицерин (с остатком лизина – ФААГ) (табл. 2.1) способны к образованию биполярных ионов. Гидратация этих группировок будет минимальна по сравнению с катионными и анионными формами ФС, ФЭА, ФХ, ФААГ, которые образуют прочные ассоциаты с диполями воды (ориентируя последние вокруг диполей $\geq \text{P-O}^-$; аминогрупп или COO^- -групп [3, 8, 77, 97]). Требуется особое пояснение поведение амидных группировок в водных растворах (входящих в состав сфингомиелина, сфингозина, галактоцереброзида и близких по структуре к фосфолипидам). Величина изменения энтальпии ΔH° водородной связи амидов, измеренная в воде, равно нулю, что означает с одной стороны отсутствие стабилизации амидных групп посредством межмолекулярной водородной связи с растворителем. С другой стороны можно говорить о возможности разупорядочивания структуры воды амидными группировками (в отличие от групп - COO^- ; $-\text{NH}_3^+$; $\geq \text{P-O}^-$; упрочняющих сетку Н-связей в диполях воды) [77, 107, 160].

Представляет интерес наличие непрерывного поглощения в ИК-спектрах (в области $3700\text{--}2600\text{ см}^{-1}$) фосфатидных кислот и кардиолипина при $\text{pH}=1,8\text{--}2,2$ (рис. 7.4.9-7.4.10). Этот эффект может быть связан с туннельными переходами протона между одноименными группами в фосфолипидах [77, 168, 169]. Такими группами в рассматриваемом случае выступают фосфоно-
 вые группы —O—P(=O)(OH)_2 в фосфатидных кислотах и —O—P(=O)(OH)_2 в кардиолипине:

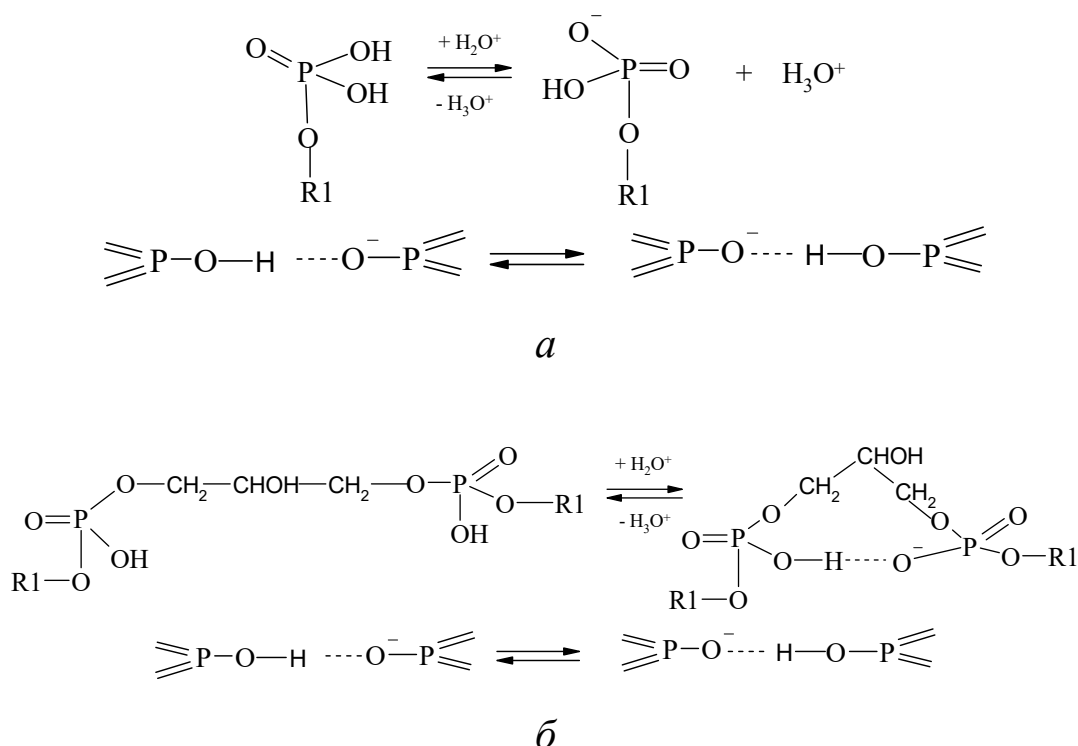


Рис. 7.4.9. Возможные туннельные переходы протона между остатками фосфорной кислоты в фосфолипидах.

R1 – глицериновые остатки, этирифицированные жирными кислотами.

Отличие процессов в 7.4.9 (а) и в 7.4.9 (б) является то, что в фосфатидных кислотах туннельные переходы протона происходят между разными молекулами, а в кардиолипине этот процесс внутримолекулярен. Это вызвано тем, что остов молекулы кардиолипина включает три остатка глицерина, соединенных друг с другом двумя фосфодиэфирными мостиками через 1- и 3-положения, гидроксильные группы двух внешних остатков глицерина этирифицированы жирными кислотами, два остатка фосфорной кислоты расположены близко друг к другу и между ними возможны туннельные переходы протона (рис. 7.4.10), приводящие к непрерывному поглощению. Следует подчеркнуть, что фосфатидные кислоты содержатся в клетках в очень малых количествах, однако они являются важным промежуточным продуктом в биосинтезе других фосфоглицеридов. Кардиолипин является обязательным компонентом бактериальных клеточных мембран, а также мембран митохондрий и хлоропластов. Следовательно, можно полагать, что в этих мембранах быстрая миграция

протонов возможна не только по Н-связям в молекулах воды, но и по водородным связям в остатках фосфорных кислот в фосфолипидах.

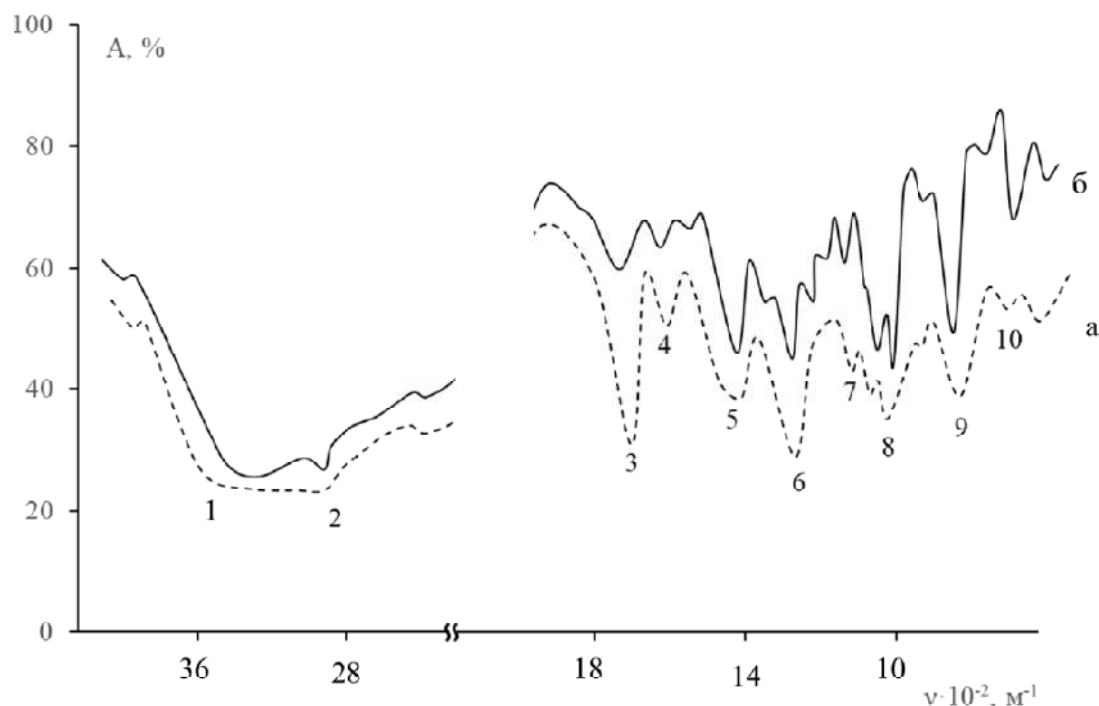


Рис. 7.4.10. ИК-спектры: *a* – фосфатидной кислоты; *б* – и кардиолипина при pH = 2.1:

1 – 3412; 2 – 2767; 3 – 1748; 4 – 1670; 5 – 1489; 6 – 1360; 7 – 1186; 8 – 1042; 9 – 936; 10 – 822 cm^{-1} . А – поглощение, %; ν – волновое число, cm^{-1} .

На основании данных ИК-спектров (рис. 7.4.10) фосфатидной кислоты и кардиолипина (помимо непрерывного поглощения в области $3700\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ за счет туннельных переходов протона в фосфоновых группах (рис. 7.4.9)) представляет интерес наличие максимумов 1186 и 1042 cm^{-1} , характерных для недиссоциированных $\text{P}(\text{OH})_2$ и депротонированных $\text{P}(\text{O})_2^-$ групп [8, 137, 169] соответственно. Пики $1650\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$ соответствуют $\text{P}=\text{O}$ группировкам, а 1110 cm^{-1} $\text{P}(\text{O})_2^-$ [8, 137], что подтверждает одновременное присутствие $\text{P}(\text{OH})_2$ и $\text{P}(\text{O})_2^-$ в этих фосфоглицеридах при pH = 2,0.

Максимумы 1748 cm^{-1} характерны C=O в первом или во втором диполях (рис. 5.6-5.8); $2767\text{--}2317$, 1469 cm^{-1} проявляются для –OH групп (ν_{OH} и δ_{OH}) в фосфоновых группировках; 1360 и 822 cm^{-1} – колебания метильных и метиленовых групп; 936 cm^{-1} –

обусловлены валентными колебаниями одинарных Р-О(Н) связей в группе $\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{P} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$.

7.5. Ионы фосфолипидов в водных растворах и биомембранах

Электрические силовые поля противоположно заряженных сферичных ионов равномерно распределены по всем направлениям [159, 160] в пространстве. Это ведет к тому, что каждый ион будет притягивать к себе ионы другого знака в любом направлении. В этом проявляется ненаправленность ионной связи, отличающей ее от пространственно направленной ковалентной связи.

С другой стороны, взаимодействие друг с другом противоположно заряженных ионов не приводит к полной взаимной компенсации их силовых электрических полей. У каждого из них сохраняется способность притягивать ионы противоположного знака и по другим направлениям. В этом проявляется свойство, называемое ненасыщенностью ионной связи [203], и в этом ионная связь отличается от насыщаемой ковалентной связи.

В предыдущих разделах отмечено, что фосфолипиды обладают наиболее выраженными полярными свойствами. При $\text{pH}=7,0$ их фосфатные группы всегда несут отрицательный заряд, т.к. величина pK' этой группы лежит в пределах 1-2. X-группы фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, сфингомиелина при $\text{pH}=7,0$ несут положительный заряд, поскольку pK' для их аминогрупп равны соответственно 13,0; 10,0; 12,8. Следовательно, при $\text{pH}=7,0$ эти три фосфолипида представляют собой биполярные цвиттерионы, а их суммарный заряд равен нулю (табл. 2.1; рис. 2.1). X (R_3) –группа фосфатидилсерина содержит α -аминокислоту ($\text{pK}'=10,0$) и карбоксильную группу ($\text{pK}'=3,0$), следовательно, при $\text{pH}=7,0$ молекула ФС имеет две отрицательные и одну положительную группу, т.е. несет суммарный отрицательный заряд. ФААГ с остатком лизина, относящийся к О-аминоацилфосфатидилглицеринам (липоаминокислотам), содержит одну фосфатную группу ($\text{pK}'=1,5$) и две положительные группы: α -аминогруппу ($\text{pK}'=8,95$) и δ -аминогруппу ($\text{pK}'=10,5$), т.е. несет при $\text{pH}=7,0$ суммарный положительный заряд (табл. 2.1;

рис. 2.1). X-группы фосфатидилглицерина, фосфатидилинозитола хотя и не несут электрического заряда, но сильно полярны.

X-группами в кардиолипине и фосфатидилинозитол-4-фосфате выступают фосфатные группы, а фосфатидные кислоты способны к депротоионизации с образованием двухзарядных отрицательных ионов. Поэтому при $pH \leq 7,0$ ФК, КЛ, ФИФ способны существовать в виде двухзарядных анионов ($pK_2' = 6,2$; $pK_2' = 6,0$; $pK_2' = 6,0$ соответственно). Соответственно, эти фосфолипиды могут связывать по два иона одновалентных щелочных металлов.

Все эти вариации в полярности, заряде полярных групп голов молекул (наряду с их размерами, формой, стерическими факторами) оказывают очень важное влияние на структуру моно- и бимолекулярных липидных слоев, а также на структуру липидных мицелл, природных липопротеидов и мембранных систем [1, 55]. В табл. 7.5.1 приведена количественная оценка содержания ионов калия и натрия в отдельных группах гидратируемых и негидратируемых фосфолипидов подсолнечных и соевых масел. Из данных табл. 7.5.1 можно отметить избирательность фосфатидилинозитолов, фосфатидилэтаноламинов как к ионам K^+ , так и Na^+ .

Таблица 7.5.1 Содержание ионов щелочных металлов в фосфолипидах подсолнечных и соевых масел (в % к навеске фосфолипидов [3]).

Группа ФЛ	Подсолнечные масла		Соевые масла	
	K^+	Na^+	K^+	Na^+
ФИ*	0,495/следы	0,150/0,253	0,950/2,970	0,050/2,500
ФХ и ЛФХ**	0,530/-	0,250/-	1,500/-	0,020/-
ФЭА и ЛФЭА	1,050/0,061	0,050/0,052	1,780/5,820	0,020/2,650
ФС и ЛФС	0/0	0/следы	0/0	0/0
ФК и ЛФК	0,328/0,063	0/следы	Следы/0,950	0/0,280
ПФК***	0,480/0	Следы/следы	0,450/1,680	0/0
ДФГ****	0/0	0/0	0/0	0/0

*В числителе – гидратируемые ФЛ, в знаменателе – негидратируемые ФЛ.

** Символ Л означает лизоформу ФЛ.

*** ПФК – полифосфатидные кислоты.

****ДФГ – дифосфатидилглицерины.

Кроме того, гидратируемые фосфатидилхолины и их лизоформы взаимодействуют существенно с ионами калия и натрия. Представляет интерес повышенное содержание ионов калия (по

сравнению с Na^+) в фосфатидных и полифосфатидных кислотах. Содержание Na^+ и K^+ в фосфолипидах соевых масел в целом выше, чем в подсолнечных.

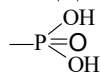
Если представить, что фосфолипиды являются амфипатическими молекулами, то их полярные (гидрофильные) головки выступают как ионогенные фиксированные группы, способные к реакциям ионного обмена. Неполярные (идрофобные) хвосты в ФЛ можно рассматривать как фрагменты матрицы (каркаса). Правомочность такого подхода к фосфолипидам возрастает, если обратиться к структурным основам биологических мембран. С химической точки зрения биомембраны представляют собой комплексы липидных и белковых молекул [1, 55, 160, 166]. Обычно в состав мембран входит около 40% липидов, 50-60% (по массе) белков, а также до 10% углеводов (в качестве компонентов гликолипидов и гликопротеинов). Конечно, состав биологических мембран не одинаков как для разных видов, так и для различных клеток многоклеточных организмов. Соотношение белков и липидов различных мембранах варьируется от 1/5 белка + 4/5 липидов до 3/4 белка + 1/4 липидов. Углеводы в форме гликопротеинов и гликолипидов могут составлять 0,5-10% всех веществ мембраны. Типичная мембрана содержит фосфолипиды, гликосфинголипиды и (в некоторых эукариотах) холестерол.



Рис. 7.5.1. Схематическое изображение «среза» липосомы. Бислой состоит из двух пластов. В каждом пласте полярные головки амфипатических липидов обращены в сторону водной среды, а неполярные углеводородные хвосты — вовнутрь и контактируют друг с другом с помощью Ван-дер-Ваасльсовых сил.

In vivo фосфолипиды и гликофинголипиды имеют тенденцию образовывать липидные биослои (рис. 7.5.1-7.5.2), в которых углеводородные «хвосты» прекрасно подогнаны друг к другу. Липидный слой обычно имеет толщину около 5-7 нм. Молекулы липидов внутри биослоя ориентированы их гидрофобными «хвостами» во внутреннюю часть, а гидрофильные головки контактируют с водной средой. В результате заряженные головки липидных молекул формируют по его границам ионизированную поверхность, прочно связанный с каркасом (матрицей) внутреннего непрерывного углеводородного двойного слоя.

Фактически в этом случае мы имеем истинный ионообменник, который в отдельных случаях можно моделировать и сравнивать с синтетическими ионитами известной структуры [137, 168, 169, 177]. По механизму взаимодействий фосфатидные кислоты, фосфатидил глицерин, кардиолипин, фосфатидилинозитол, фосфатидилинозитол-4-фосфат, имеющие только в составе в качестве ионогенных групп остатки фосфорной кислоты, будут соответствовать фосфорсодержащим катионитам СФ-2, ФЦ, КФ-1, КРФ-2П (производство СССР), КР-1 (Чехословакия), Duolite-61 (аналог КРФ-2П) (США) [174]. Отличительной особенностью функциональных групп фосфоновокислых катионитов является наличие трех активных группировок: фосфорильного кислорода и двух кислотных группировок. Природа этих центров в определенной степени противоположна [138, 160, 174, 186]: фосфорильный кислород имеет неподеленные электронные пары и может взаимодействовать с ионами и молекулами, обладающими вакантными орбиталями [203] (протоном, ионами переходных металлов), то есть выступает в роли основания Бренстеда (при протонировании) или Льюиса (при взаимодействии с ионами металлов) [138]. Гидроксильные группы в остатках фосфорной кислоты являются донорами протонов, то есть выполняют функцию кислот Бренстеда. Следствием такой особенности фиксированных групп



является диссоциация по кислотному типу, а наличие фосфорильного кислорода с неподеленными электронными парами обуславливает поглощение компонентов из раствора по ионно-координационному или координационному типу.

Фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин, фосфатидилсерин, фосфатидил-О-аминоацетилглицерин (с остатком лизина) можно соотносить с синтетическими полиамфолитами АНКФ-20; ПА-13-10Т; ПА-С-90; которые помимо остатков фосфорной кислоты содержат группы различных азотсодержащих оснований (или остатков аминокислот) [174-176, 186-188]. Кисотно-основные и сорбционные свойства азотфосфорсодержащих амфолитов зависят во многом от взаимного расположения групп кислотного ($\text{—P}(\text{OH})_2$) и основного >N^+ ; >NH ; >NH_2 характера в цепях полимер или мицеллах. Из всего многообразия азотфосфорсодержащих фосфолипидов необходимо выделить однозвенные, в которых группы кислотные и основные находятся в одном звене (ФХ, ФЭА, СМ), и разнотзвенные (ФС, ФААГ с остатком лизина). У фосфолипидов, отнесенных к однозвенным, взаимодействие разнополярных групп проявляется в большей степени, так как в широкой области рН реализуется структура, подобная бетаиновой, за счет атомов водорода фосфоновых групп и атомов азота аминогрупп:

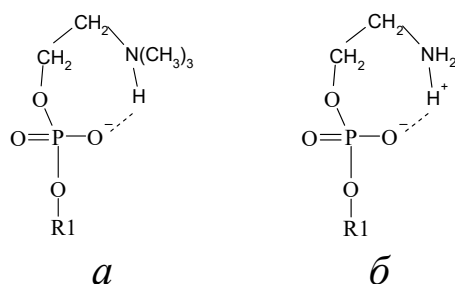


Рис. 7.5.2. Внутрисолевые (биполярные) ионы *a* - в ФХ и СМ; *б* - в ФЭА. R1 – неполярные (гидрофобные) хвосты. Семичленные циклы в биполярных ионах достаточно стабильны [138, 139].

В ФААГ расположение разнополярных групп в разных звеньях фосфолипида также оказывает влияние на кислотно-основные свойства, но в меньшей степени, чем в ФХ, СМ и ФЭА в связи со стерическими затруднениями. В фосфатидилсерине наблюдается конкурирующее влияние —P—OH и —COOH групп при переносе протона к —NH_2 серинового радикала, что приводит к лабильности внутрисолевой связи между фосфоновыми и аминогруппировками.

Кислотно-основное равновесие между различными формами азот-фосфорсодержащих амфолитов (в нашем случае однозвенных ФЛ с амино-этилен-фосфоновыми группами) можно представить следующим образом:

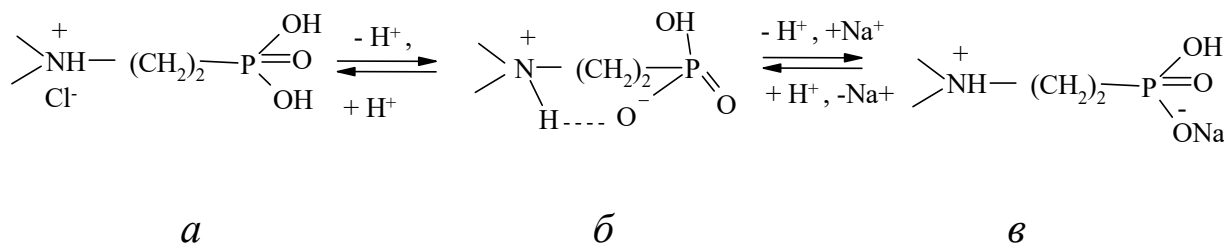


Рис. 7.5.3. *а* - протонированная (H^+ - форма); *б* - внутрисолевая (биполярная) форма и депротонированная по первой ступени (солевая форма); *в* - фосфолипидов с амино-этилен-фосфоновыми группами.

Аналогичные процессы наблюдали авторы [189, 190] для синтетических азотфосфорсодержащих амфолитов. При этом они установили, что в 0,1 н HCl происходит лишь частичное расщепление внутрисолевых связей. В щелочных средах наблюдается практически полное превращение биполярного иона в анион.

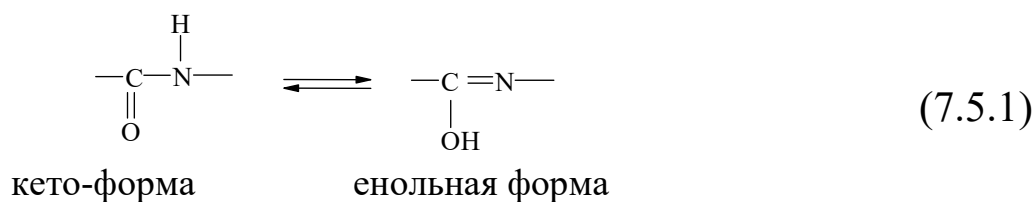
Поскольку фосфолипидные бислои могут легко изгибаться, то, сближаясь, они могут формировать сферические структуры (рис. 7.5.1). Подобные структуры, которые Штыков С.Н. с сотрудниками характеризует как химические микрореакторы [98-101], называются липосомами. Липосомы могут быть использованы в качестве депо и в качестве переносчиков лекарственных препаратов к определенным тканям организма.

Фосфолипиды и сфинголипиды формируют основу биологических мембран, как внутриклеточных, так и плазматических. Липидные слои могут существовать в отсутствие белков, но белки являются важнейшими компонентами биологических мембран. Мембранные белки непосредственно вовлечены в транспорт молекул и ионов через липидные бислои, передачу сигналов внутрь клетки, во взаимодействие между цитоскелетом и плазматическими мембранами [1, 55]. Толщина биомембран обычно 6-10 нм, что позволяет рассматривать их как наноструктуры.

Мембраны содержат большое число различных глобулярных белков с молекулярной массой от 25000 до 230 000. Белки, заключенные в бислое, можно подразделить на два типа – перифе-

рийные и интегральные. Интегральные белки находятся внутри бислоя, контактируя с гидрофобным окружением. Периферийные мембранные белки более слабо ассоциированы с мембранной поверхностью [1, 55].

Следовательно, функциональные группы интегральных белков могут выступать как носители дополнительных разнополярных фрагментов, оказывающих влияние на кислотно-основные свойства фосфолипидов в биологических мембранах. Общеизвестно, что основной связью в полипептидном каркасе белковых молекул является пептидная (кислотно-амидная) группа, которая проявляет кето-енольную таутомерию:



Длина С-Н-связи в пептидных группировках равна 0,13 нм, имеет промежуточное значение между длиной двойной ковалентной связи (0,12 нм) и одинарной ковалентной связи (0,15 нм). Следовательно, связь С-Н имеет частично характер двойной (π -связи), из чего следует, что вращение вокруг оси С-Н затруднено.

Отличительной особенностью пептидной группировки является взаимодействие ее с водой. До настоящего времени отсут-

ствует единое мнение о воздействии на воду $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ -\text{C}-\text{N}- \\ || \\ \text{O} \end{array}$ групп [107]. В большинстве случаев полярные группы разрушают структуру воды, образуя более прочные ассоциаты «вода – органический ион» по сравнению с ассоциатами «вода – вода» [77, 137, 138, 153-158]. Отдельные органические компоненты «разрыхляют» структуру воды, а ряд авторов приписывают пептидным фрагментам именно такое свойство [107, 133, 134, 161].

Упрощенно полипептидная цепь с различными функциональными группировками может быть представлена следующим образом:

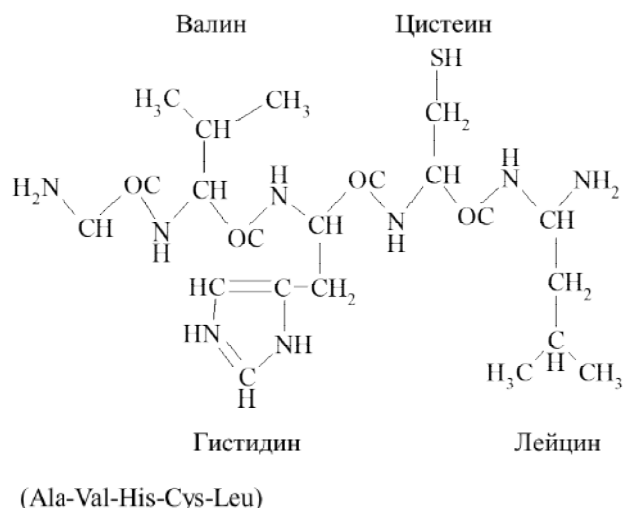


Рис. 7.5.4. Схематичное изображение фрагмента полипептидной цепи, образованной аланином, валином, гистидином, цистеином и лейцином. Аминокислотный остаток, находящийся на том конце цепи, где имеется свободная аминогруппа, называется аминоконцевым (или N-концевым) остатком. Остаток на другом конце, несущем свободную карбоксильную группу, называется карбоксилконцевым (или C-концевым). Название пептида складывается из названия аминокислот, начиная с N-концевого остатка [1, 55].

Представляя мембраны как липидные биослои, в которые инкрустированы мембранные белки, можно полагать, что при определенных условиях возникает возможность вступать в реакции протолиза не только у функциональных групп фосфолипидов, но и у концевых $-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$ -групп, а также боковых полярных радикалов полипептидных цепей (фрагменты триптофана, тирозина, гистидина, лизина, аргинина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, цистеина). При этом указанные группировки также могут вступать в реакции обмена с ионами в растворе. Нельзя игнорировать также факт образования ассоциатов между функциональными группами фосфолипидов (сфинголипидов, стероидов) с ионогенными (полярными группами) полипептидных фрагментов.

В соответствии с жидкостно-мозаичной моделью мембрана представляет собой динамичную структуру, в которой как белки, так и липиды способны перемещаться внутри бислоя. Мембранные структуры сформированы за счет слабых электростатических сил (полярных, водородных связей) и гидрофобных взаимодейст-

вий. Ковалентные связи в формировании этих структур играют второстепенную роль. Поэтому ясно, что биологические мембраны – структуры динамичные; молекулярные компоненты в них охраняют довольно высокую подвижность, однако они могут двигаться легко только в плоскости мембраны. Поперечная диффузия происходит очень медленно. Она связана с переходом полярной головки структурного компонента через гидрофобную сердцевину бислоя. Белки, имеющие более высокую молекулярную массу, движутся более медленно, чем липиды. Движение белковых глобул может быть вращательным в пределах монослоя и даже бислоя. Кроме того, сами белки способны претерпевать изменения своей трехмерной конформации в составе мембраны, причем изменение конформации одной молекулы, вероятно, может влиять на конформацию молекул белков из ближайшего микроокружения [1, 55, 172].

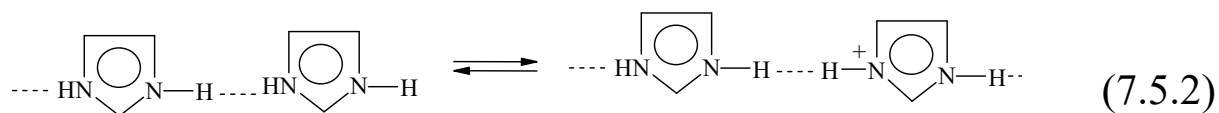
В результате подобных процессов мембрану можно охарактеризовать как полифункциональный ионообменник, имеющий ки-

слотные $\left[\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2; \text{—C}(\text{OH})=\text{O}; \text{—S—H} \right]$ группы, основные $[-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3; -\text{NH}_2; \text{H}_2\text{N—C}(\text{NH}_2)=\text{NH—}; \text{HC}(\text{NH})=\text{C}(\text{NH})=]; >\text{NH}$ в индольном цикле] и полярные $[-\text{OH}; >\text{C}=\text{O}$ и амидные] группы.

Представляет с поведение $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (ионов четвертичных аммониевых оснований), присутствующих в сфингомиелине и фосфатидилхолине, по отношению к воде. Ионы алкиламмония как бы стремятся избежать контактов с молекулами воды, так как поле катиона будет направлено главным образом на близлежащий анион (в нашем случае на $\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2$). При этом в присутствии ионов алкиламмония водородная связь между молекулами воды усиливается, а частота перестройки молекул воды (а следовательно и энтропия) убывают [77, 137, 139]. Такая тенденция водной структуры в присутствии ионов алкиламмония имеет решающее значение для возникновения гидрофобного взаимодействия, а ионы $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ в биологических мембранах будут ориентированы внутрь этих мембран, фактически они стремятся изолировать себя от водной среды, (ионы алкиламмо-

ния «заякорены» в липидной структуре, а олигосахаридные цепи гликофинголипидов и полярные группы C=O и $\text{—P} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{O} \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ фосфатидилхолина находятся вне бислоя липидов, что согласуется со взглядами, развиваемыми О.Я. Самойловым, о положительной и отрицательной гидратации различных ионов [155, 191]. В соответствии с этими представлениями подвижность молекул гидратной воды в окружении одних ионов (Li^+ , Mg^{2+} , Al^{3+} , F^- , SO_4^{2-}) уменьшается (положительная гидратация), а других (K^+ , Rb^+ , Cs^+ , ClO_4^- , Cl^- , I^-) увеличивается (отрицательная гидратация) по сравнению с подвижностью молекул в чистой воде. Другими словами, в зависимости от природы ионов, взаимодействие молекул гидратной воды может быть сильнее или слабее взаимодействия молекул воды между собой. Как отмечено выше Н-связь между молекулами воды в присутствии ионов алкиламмония усиливается, что характеризует последние как ионы с отрицательной гидратацией.

Еще одним существенным отличием «инкрустированных» белковых фрагментов является способность поляризованных водородных связей за счет флуктуаций протонов образовывать симметричные Н-визи, включающие туннельные протоны. Прежде всего, подобные процессы будут иметь место при условии достаточного числа акцепторных групп с величиной pK_a в физиологическом интервале pH. Такими группами являются остатки гистидина, которые имеют функциональную имидазольную группировку, способную в присутствии избыточных протонов образовывать симметричные водородные связи, включающие туннельные протоны [77, 137]:



Проявление туннельных переходов фиксируется в виде непрерывного поглощения в ИК-спектрах (рис. 7.5.5) пленок поли-L-гистидина с разной степенью протонирования.

Если степень протонирования становится больше 50 %, то непрерывное поглощение начинает исчезать, потому что водородные связи $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ разрываются и образуются ассиметричные связи $\text{NH}^+ \cdots \text{Cl}^-$, что обнаруживается по увеличению интенсивности широкой полосы валентных колебаний около 2600 см^{-1} . Таким образом, поляризуемые водородные связи с двумя минимумами на потенциальной кривой для избыточного туннельного протона наблюдаются в поли-L-гистидине при увеличении степени протонирования, причем, поскольку между ними действуют протонные дисперсионные силы, переходы протона коррелированы с влиянием этих сил (см. также исследования в ультрафиолетовой области спектра [193]).

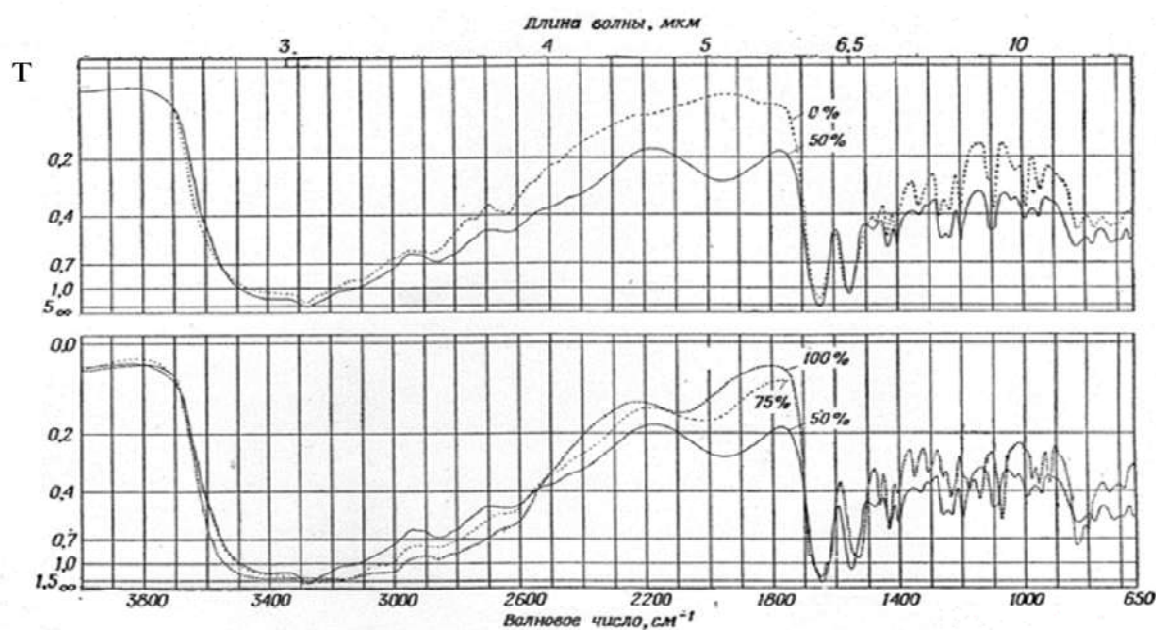


Рис. 7.5.5. ИК-спектры пленок поли-L-гистидина при разной степени протонирования (%).

Имеются ли наблюдения, указывающие на существование водородных связей типа $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ в реальных биологических системах? Такие водородные связи были обнаружены методом ядерного магнитного резонанса между остатками гистидина в активном центре фермента – панкреатической рибонуклеазе [192]. В дальнейшем ЯМР-методом было показано, что в полупротонированном гистидине в водном растворе при этих условиях проявляется характерный «стэкинг»-эффект [167] (стопкообразная упаковка).

Последний может быть обусловлен взаимодействием между связями $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$. Олдридж и Розе [134] на основании большого числа экспериментальных работ рассматривали водородные связи между имидазольными группами гистидиновых остатков белков в мембранах митохондрий.

Протонные дисперсионные силы действуют между связями $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ и переходы протонов в них коррелированы. Электрическое поле очень сильно поляризует эти связи. Поле 10^8 В/м вызывает заметные сдвиги протонов в направлении поля [137]. На рис. 7.5.6 показано как может осуществляться механизм проводимости через имидазольные группы гистидина [47, 77]. При отсутствии избыточного протона водородная связь $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ имеет несимметричную потенциальную функцию. При добавлении избыточных протонов потенциал становится почти симметричным и имеется два минимума. Переходы протонов в этих связях скоррелированы. Если на эту цепочку наложить электрическое поле, то протоны сместятся в направлении поля вследствие высокой поляризуемости этих водородных связей. Избыточный протон в конце цепи может быть удален.

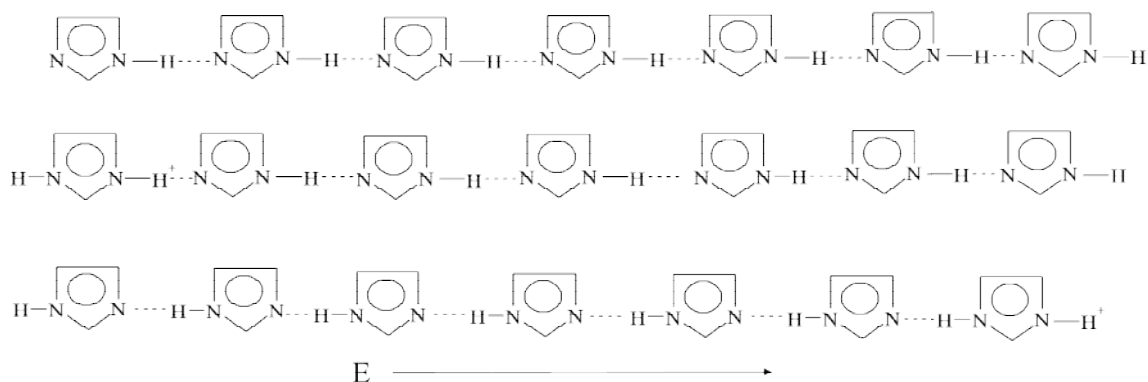


Рис. 7.5.6. Схема, объясняющая протонную проводимость через цепочку из имидазольных остатков. (E – направление электрического поля) [137].

Это значит, что если такие водородные связи имеются в мембране, то под влиянием электрического поля рН уменьшится по одну сторону и увеличится по другую сторону от мембраны. Таким образом, электрическое поле может вызвать протонный ток в мембране, как это и следует из экспериментов на хлоропластах и митохондриях и как это полагает Митчел в своей теории. Следует

подчеркнуть, что рассмотренный механизм является основным по важности при объяснении появления протонного тока под действием поля [55].

В этих процессах могут играть роль не только симметричные водородные мостики $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ в гистидине (с потенциальной кривой с двумя минимумами). Аналогичные взаимодействия проявляются и для тирозина, триптофана, глутаминовой кислоты (табл. 7.5.2, рис. 7.5.7).

Непрерывное поглощение в системе «ионит-аминокислота» возникает, когда протоны участвуют в образовании симметричных Н-связей между двумя однотипными группами (потенциальная функция с двумя минимумами [168, 169]). При этом одна однотипная группа в названных выше аминокислотах является донором, а другая – акцептором протона. Если величина pK_a акцепторной группы цвиттерлитов, растворенных в воде, больше pK_a воды, то при определенной степени протонирования должны образоваться симметричные Н-связи между R-радикалами даже в водной среде [137]. Для тирозина и триптофана, имеющих pK_a 11,50 и 9,11, наиболее вероятно образование граничных структур (R' - α -группировка аминокислот) в области pH:

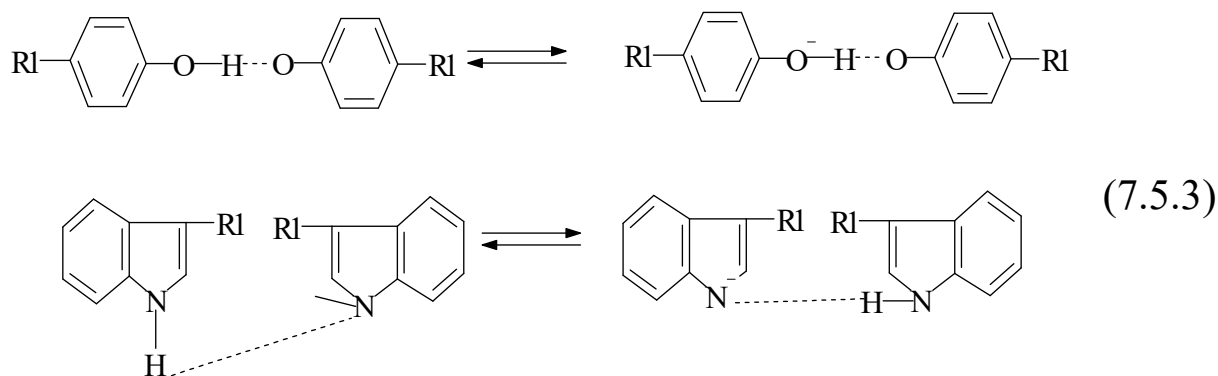


Таблица 7.5.2. Сорбция аминокислот на ОН-анионите АВ-17-2П при 293 К в зависимости от pH раствора [77].

Сорбат	№	E_p , мг-экв/г	Q , мг-экв/г	K_{H_2O} , г/г	K'/K	$\text{pH}_{\text{исх}}/\text{pH}_{\text{равн}}$	τ'/τ
	1	3	4	5	6	7	8
Глу	1	3,85	0,65	0,630	11,6/12,1	0,9/4,1	380/40
	2	3,96	0,76	0,606	14,1/4,4	2,1/4,2	350/62
	3	3,46	0,26	0,814	3,2/1,6	3,1/4,8	240/30
	4	2,20	0,14	0,920	1,4/0,8	4,3/6,2	$1,5 \cdot 10^3/-$

Окончание табл. 7.5.2

1	2	3	4	5	6	7	8
Тир	1	4,79	1,59	0,526	106/3,5	0,9/7,9	460/80
	2	4,98	1,78	0,512	126/5,2	3,6/8,6	620/186
	3	3,96	0,76	0,690	9,6/1,4	5,3/9,8	400/65
	4	3,38	0,18	0,803	9,6/1,4 0,6/0,2	8,2/12,0	-
Гис	1	4,55	1,35	0,560	5,9/1,8	1,9/4,4	600/100
	2	4,80	1,60	0,574	7,2/2,1	2,8/4,9	640/95
	3	5,26	2,06	0,592	10,8/2,8	3,6/5,9	690/118
	4	5,20	2,00	0,760	1,5/0,9	5,9/11,6	1,5·10 ³ /-
Три	1	4,16	0,96	0,690	14,2/2,6	0,9/8,6	200/20
	2	4,34	1,14	0,668	12,0/2,3	1,9/9,8	205/35
	3	5,09	1,89	0,610	20,5/4,1	2,8/10,6	340/66
	4	3,72	0,52	0,724	4,5/0,3	5,8/12,8	1,5·10 ³ /-

Q – сверхэквивалентная сорбция, мг-экв/г

K_{H_2O} – коэффициент влагоемкости (ОН – анионит – 2,76 г/г);

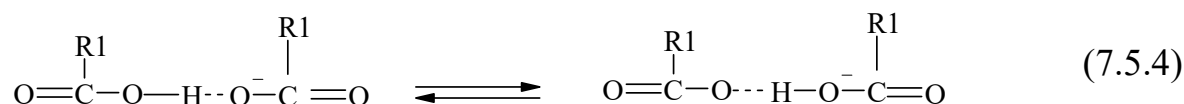
$K' = \bar{Q} / P$; $K = Q / P$ – коэффициенты пересыщения;

\bar{Q} , Q и P – содержание аминокислоты (г/г H_2O) в фазе смолы, во внешнем растворе и растворимость цвиттерлитов во внешнем растворе соответственно;

τ' , τ – время устойчивости пересыщенного раствора аминокислоты в ионите и элюате соответственно, $9,8 \geq pH \geq 8,6$ и $12,8 \geq pH \geq 9,8$ соответственно, т.е. при существовании «однозарядный анион-цвиттер-ион» тирозина и «двухзарядный анион-однозарядный анион» триптофана.

Представляет интерес тот факт, что непрерывное поглощение проявляется и в спектрах, пересыщенных элюатов после вытеснения аминокислот из ионитов и сохраняется до начала выпадения кристаллов. Следовательно, особую роль на устойчивость перенасыщенных растворов аминокислот оказывают группировки с граничными структурами (7.5.3).

В случае сорбции глутаминовой кислоты непрерывное поглощение проявляется в интервале $6,2 \geq pH \geq 4,1$; т.е. при совместном присутствии цвиттериона и однозарядного аниона [77, 169]:



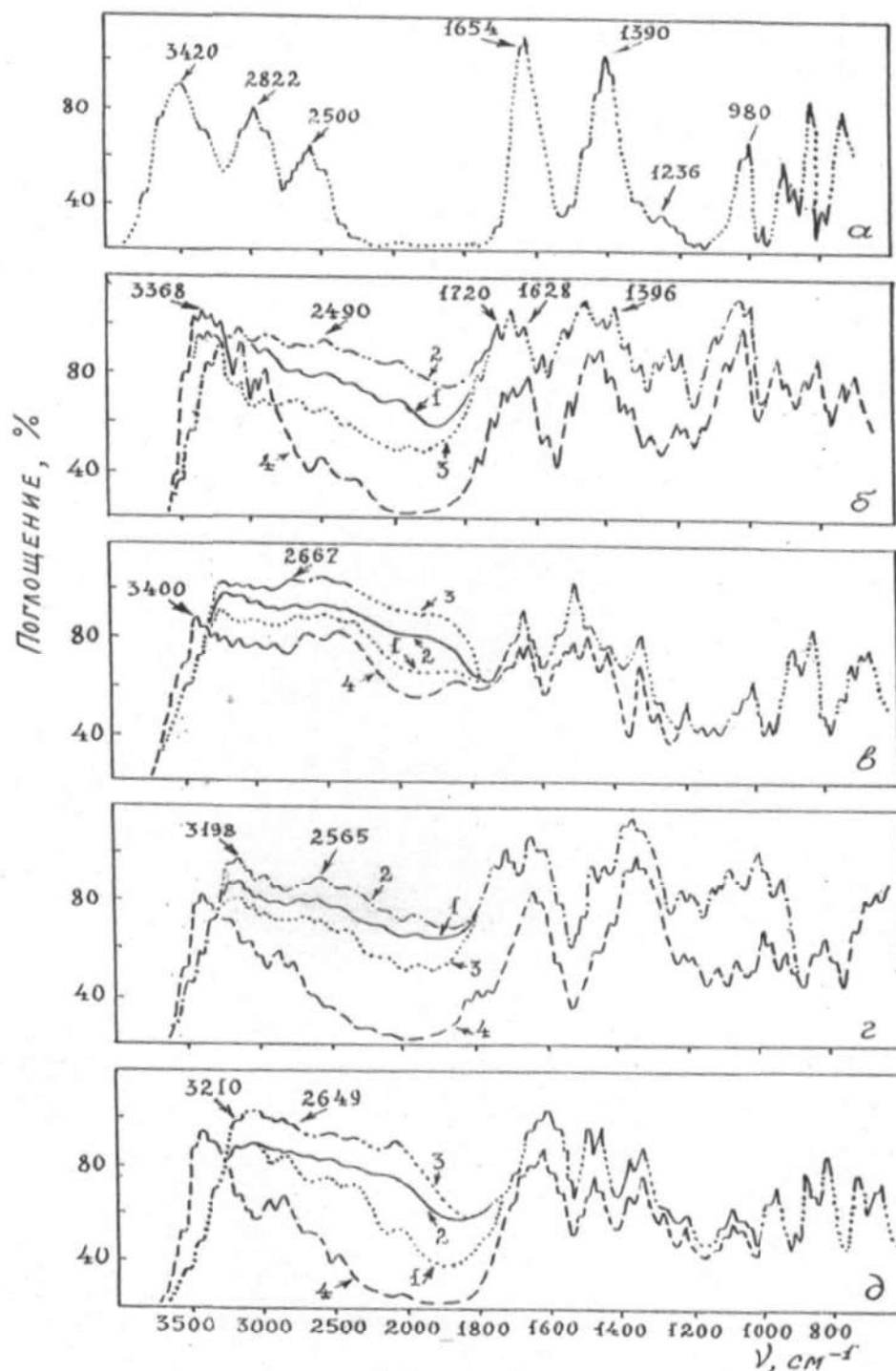
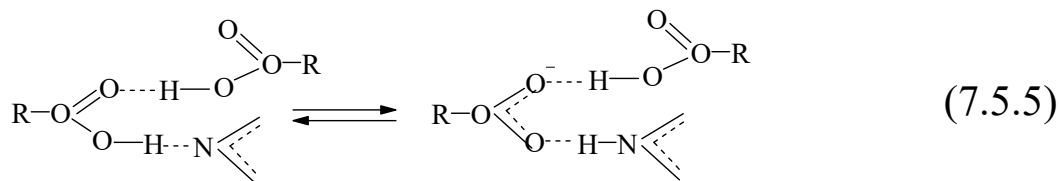


Рис. 7.5.7. а- ИК-спектры ОН-анионита АВ-17-2П; б - насыщенного глутаминовой кислотой; в - гистидином, г - тирозином, д - триптофаном при различных значениях рН (обозначения соответствуют табл. 7.5.2).

В этих процессах могут играть роль не только симметричные водородные мостики (с потенциальной кривой с двумя миниму-

мами), но также и менее симметричные Н-связи, в которых, однако, возможен перенос протона:



В неводных растворах перенос протонов к основанию происходит при разности между pK_a кислоты и основания около 4, а в водных растворах такой же перенос осуществляется при ΔpK_a всего около 2 [137].

Тот факт, что перенос протона в водородных связях между карбоксильной кислотной и азотным основанием происходит, когда кислотность кислотной группы на ΔpK_a больше кислотности основания, и что величина ΔpK_a зависит от окружения, имеет особое значение, поскольку в белках ΔpK_a остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот на несколько единиц меньше ΔpK_a основных остатков лизина аргинина. Следовательно, в безводной среде водородные связи, образованные между кислыми и основными остатками, могут быть в высокой степени симметричными. Симметрия этих связей и перенос протона в них, как мы видели выше, зависят от степени гидратации. Гидратация внутри белковых молекул исключительно мала. При конформационных переходах степень гидратации индивидуальных групп может значительно изменяться, однако в соответствии с результатами, полученными, выше, тогда может произойти перенос протона. Весьма вероятно, что это играет существенную роль в регуляторных механизмах в белках [1, 55].

Поляризуемые водородные связи имеют важное значение не только для белков, но и других компонентов биологических мембран [55]. Для полупротонированной полицитидиловой кислоты наблюдается очень широкая полоса, простирающаяся от полос колебаний группы NH_2 в сторону меньших волновых чисел вплоть до 2100 см^{-1} . Это поглощение обусловлено водородными связями $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$, между которыми действуют протонные дисперсионные силы, вызывающие уширение. Следует отметить, что эти водородные связи более или менее сильно поляризуются по-

лями диполей гидратных молекул воды и ионов >PO_2^- основной цепи. Напряженность поля фосфатных ионов зависит от степени экранирования их катионами. Это также приводит к взаимодействию индуцированных диполей и, конечно, вызывает значительное уширение полос поглощения, наблюдаемое на опыте. Сильное электростатическое отталкивание избыточных протонов двойной спирали полицитидиловой кислоты снижает стабильность вторичной структуры, если только взаимная поляризация связей $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ не дает значительного выигрыша энергии. Таким образом, рассмотренные взаимодействия имеют важное значение для стабильности вторичной структуры полупротонированной цитидиловой кислоты, которая (подобно фосфолипидам) содержит фосфатные и аминокгруппы [96, 137].

Таким образом, туннельные переходы протоны характерны для молекул воды, а также между однотипными группами (остатками фосфорной кислоты в фосфолипидах: имидазольными, индольными, фенольными, -S-H, карбоксильными группировками в белковых цепях бислоев биологической мембраны). В отдельных случаях перенос протонов в мембранах обусловлен Н-связями между кислотными и основными группами полипептидов и фосфолипидов. Структурные построения фосфолипидов и биологических мембран можно рассматривать с точки зрения свойств ионообменных систем как природных, так и синтетических. Фосфолипиды в рассматриваемом контексте можно рассматривать как фрагменты супрамолекулярных систем с элементами самоорганизации.

7.6. Биомембраны – транспортные системы

Вопросы взаимодействия фосфолипидов, белков и полисахаридов в биомембранах, непосредственно связаны с переносом молекул и ионов через липидные биослои. Следует отметить, что биологические мембраны физически отделяют живую клетку от окружающей среды. Но не менее важной функцией липидных слоев является их способность переносить воду, кислород и вещества, необходимые для роста. Кроме того, компоненты, синтезирующиеся в клетках на экспорт (токсины, гормоны, пищевари-

тельные ферменты, мочевины, диоксид углерода), должны покидать их, диффундируя через липидный бислой.

В данном разделе использован материал, представленный в работах [55, 195], в котором подчеркивается, что гидрофобные и небольшие незаряженные молекулы могут свободно диффундировать через биологические мембраны, но в то же время липидные бислои представляют собой практически непроницаемый барьер для большинства заряженных молекул.

Растворенные вещества могут перемещаться через мембрану как непосредственно, так и путем опосредованного процесса. В первом случае молекула растворенного вещества в ходе всего процесса переноса остается в своей первоначальной молекулярной форме. Неопосредованный процесс – целиком и полностью результат простой физической диффузии растворенного вещества в ответ на проявление электрохимического или концентрационного градиента [1].

Скорость, с которой вещества перемещаются с одной стороны мембраны на другую, зависит от разницы концентраций, т.е. от градиента концентрации, между двумя компартментами. Диффузия молекул по концентрационному градиенту происходит самопроизвольно, так как приводит к возрастанию энтропии и, следовательно, к уменьшению свободной энергии. Движение какого-либо вещества через мембрану по закону обычной диффузии, т.е. по градиенту концентрации этого вещества, иногда называют пассивным транспортом.

Способность многих ионов и небольших молекул диффундировать через липидные бислои оценивается их коэффициентами проницаемости, варьирующими от 10^{-4} до 10^{-14} м·с⁻¹. Величина коэффициента проницаемости приблизительно соответствует растворимости веществ в неполярных растворителях. Гидрофобные соединения диффундируют быстро. Индол, например, проходит через липидный бислой менее чем за 1 с. Полярные и заряженные молекулы пересекают бислои намного медленнее, так как они должны оставлять молекулы вводы в окружающей их среде, пока они движутся через промежутки между липидными молекулами. Этот процесс термодинамически невыгоден для полярных молекул и особенно ионов. Например, для пересечения

мембраны глюкозой, представляющей собой полярную молекулу, требуется время от минут до часов, тогда как для ионов натрия – дни и недели. Исключением из общего правила является вода; ее молекулы диффундируют через мембраны чрезвычайно быстро, достигая равновесия за миллисекунды. Многие биологически важные молекулы входят и выходят из клетки путем простой диффузии, включая неполярные газы, такие как O_2 , CO_2 , и гидрофобные молекулы, такие как стероидные гормоны, жирорастворимые витамины, а также некоторые лекарства [1, 55].

Скорость диффузии ионов через мембраны значительно усиливается ионофорами (переносчиками ионов). Многие из этих соединений представляют собой токсины, синтезирующиеся грибами и бактериями. Существует два типа ионофоров: мобильные переносчики и канал-формирующие ионофоры. И те, и другие обеспечивают передвижение ионов по концентрационному градиенту. В качестве примера можно привести валиномицин, синтезируемый видом *Streptomyces*. Валиномицин диффундирует через мембрану, перенося ион на другую сторону, где высвобождается. Он обладает значительной ионоселективностью: связывается в 1000 раз эффективнее, по сравнению с Na^+ . Неполярные участки молекулы ионофора контактируют с ацильными цепями мембранных липидов, в результате чего входящий комплекс «валиномицин- K^+ » становится жирорастворимым (рис. 7.6.1) [1]:

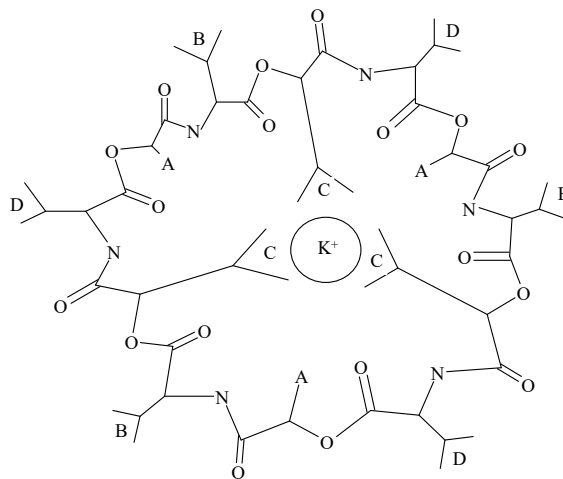


Рис. 7.6.1. Строение молекулы валиномицина. Циклическое строение его позволяет иону K^+ располагаться в центре полости, что позволяет иону K^+ проходить сквозь митохондриальные мембраны:

А – L-лактат; В – L-валин; С-Д – оксиизовалериат; Д – D – валин.

Еще один подход к изучению возможности молекулярных основ пассивного переноса ионов калия через биомембраны связан с грамицидином D. Это каналообразующий ионофор, синтезируемый бактериями *Bacillus brevis*. Грамицидин ускоряет перенос не только K^+ , но и Na^+ , Li^+ , Rb^+ и Cs^+ (валиномицин способствует миграции помимо ионов K^+ также ионов Rb^+ и Cs^+ , но не Na^+ , Li^+ , H_3O^+). Грамицидин D инкрустируется в биомембраны, формируя спиральную структуру, в результате чего образуется пора (рис. 7.6.2).

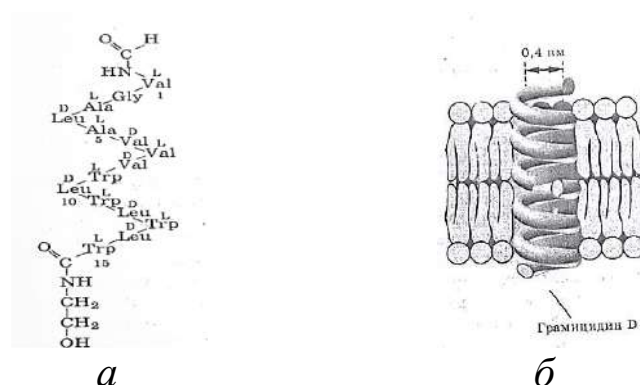


Рис. 7.6.2. Грамицидин D: *а*- ковалентная структура; *б* – димер грамицидина D, образующая канал в мембране [55].

Одна молекула грамицидина D способна пронизывать только один пласт бислоя; вся мембрана полностью пронизывается двум спиральными молекулами, формирующими димер за счет взаимодействия N-концевых участков молекул. Образующаяся пора имеет диаметр около 0,4 нм и позволяет быстро проникать моновалентным катионам, таким как H^+ , Na^+ и K^+ . Поскольку канал-формирующим ионофорам, таким как грамицидин D, не нужно диффундировать через бислой как мобильным переносчикам, то скорость трансмембранной диффузии ионов через грамицидиновые поры в 10^4 раз выше по сравнению с диффузией с помощью валиномицина [55].

Рассматриваемые антибиотики являются токсичными веществами и в мембранах обычно не встречаются, но полезны в качестве моделей систем пассивного переноса. И валиномицин, и грамицидин токсичны для митохондрий, так как они заставляют митохондрии затрачивать энергию, необходимую для окислитель-

ного фосфорилирования, на «накачивание» внутрь K^+ , которые затем интенсивно выходят наружу на счет пассивного переноса.

Перенос небольших молекул и ионов через биомембраны обеспечивается тремя типами интегральных мембранных белков: активными транспортерами; пассивными транспортерами; каналами [1, 55].

Каналы функционируют весьма сходно с ионофорами, обеспечивая перенос ионов и небольших молекул по концентрационному градиенту. Для этого процесса энергия не требуется, и он может рассматриваться скорее как диффузия через белки, нежели чем через липидный бислой. Однако, этот процесс существенно превосходит по скорости свободную диффузию, поэтому иногда его называют облегченной диффузией. Некоторые каналы позволяют транспортироваться веществам чрезвычайно быстро. Например, через ацетилхолин-рецепторный ионный канал может за секунду проходить 10^7 ионов Na^+ . Каналы представляют собой тансмембранные белки, внутри которых имеется гидрофильный проход. Необходимо отметить, что термин «каналы» используется для животных, а термин «поры» для бактерий.

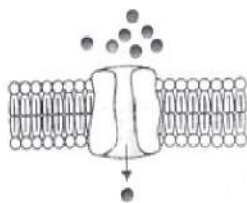


Рис. 7.6.3. Мембранный транспорт через поры или каналы. Такие белки содержат гидрофильный проход, который позволяет молекулам и ионам с подходящим размером, зарядом и геометрической конфигурацией проникать через мембрану в каком-либо направлении [55].

Молекулы веществ с соответствующими размером, зарядом и геометрической конфигурацией могут быстро проходить через эти проходы, диффундируя в направлении концентрационного градиента (рис. 7.6.3).

Клеточные мембраны животных содержат много каналобразующих белков, которые высоко специфичны по отношению к определенным ионам. Некоторые из этих каналов открыты постоянно, тогда как другие служат в качестве ворот, открываясь и закрываясь в ответ на определенные сигналы. Ионные каналы,

представляющие собой так называемые «лигандные ворота», открываются в ответ на связывание специфических сигнальных молекул. Другие каналы открываются и закрываются только тогда, когда меняются электрические свойства мембраны. Существуют также каналы, восприимчивые к изменениям натяженности и тургорного давления в мембране.

Активные и пассивные транспортеры, в отличие от каналов и пор, специфически связывают и транспортируют вещества через мембрану. Действие этих белков во многом сходно с ферментами, за исключением того, что вместо катализа химического изменения субстрата они перемещают его с одной стороны мембраны на другую. Вещества могут транспортироваться против концентрационного градиента, и этот процесс требует затрат энергии. Скорость транспортировки активными или пассивными белковыми переносчиками соизмерима со скоростью ферментативных реакций.

Транспортные белки обычно специфичны по отношению к определенным молекулам или группе структурно сходных молекул. Транспортёр, как правило, стехиометрически специфичен и транспортирует только биологически важные стереоизомеры. В простейшем случае мембранные транспортеры обеспечивают так называемый унипорт, т.е. они переносят только один тип веществ через мембрану (рис. 7.6.4 а). Многие транспортеры обеспечивают котранспорт двух веществ, перенося их либо в одном направлении (в этом случае имеет место симпорт), либо в различных направлениях (антипорт) (рис. 7.6.4 б, в). Некоторые транспортеры электронейтральны, т.е. в результате их действия не происходит изменения заряда по разные стороны мембраны. Транспорт с помощью электрогенных транспортеров приводит к переносу зарядов через мембрану и может, следовательно, существенно изменять мембранный потенциал (разницу электрического потенциала на противоположных сторонах мембраны). Все транспортные белки действуют как ворота. Транспортёр может принимать различную конформацию, так что связывающий центр будет обращен наружу и вовнутрь в зависимости от того, как этого требует конкретная ситуация. Находясь в конформации с обращенным наружу связывающим центром, белок связывает специфическую

молекулу или ион и претерпевает конформационное изменение, в результате чего связывающий центр оказывается на другой стороне мембраны, и транспортер возвращается в исходное состояние (рис. 7.6.5). Конформационные изменения белка-транспортера часто вызываются связыванием переносимой молекулы, подобно индуцированному соответствию определенных ферментов их субстратам. При активном транспорте конформационные изменения могут осуществляться за счет гидролиза АТФ или другого источника энергии.

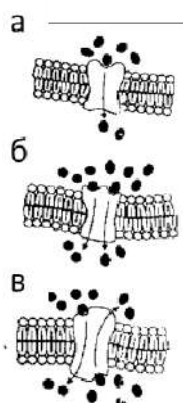


Рис. 7.6.4. Типы мембранного транспорта: *а* – унипорт; *б* – симпорт; *в* – антипорт [55].

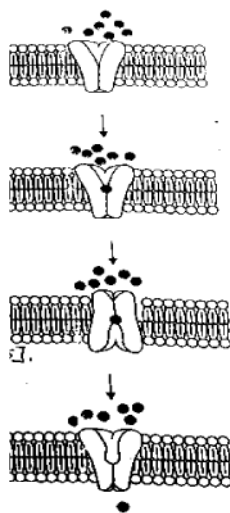


Рис. 7.6.5. Функционирование транспортного белка. Транспортные белки функционируют как «ворота». Белок связывает свой специфический субстрат и затем испытывает конформационное изменение, что позволяет молекуле или иону высвободиться на другой стороне мембраны. Контранспортеры имеют специфические связывающие центры для каждого типа транспортируемых молекул. [55].

В качестве примера пассивного транспортера можно привести глюкозный транспортер эритроцитов. Эритроциты используют в основном глюкозу в качестве источника энергии. D-глюкоза переносится из крови (где ее концентрация около 5мМ) о концентрационному градиенту в эритроциты путем пассивного транспорта с помощью глюкозы транспортеров. Этот транспортер представляет собой мембранный гликопротеин, связывающий глюкозу, когда он находится в конформации, обеспечивающей расположение связывающего центра на внешней поверхности мембраны. Затем транспортер, испытывая конформационные изменения, переносит глюкозу через бислой. Глюкоза высвобождается на цитоплазматической стороне, а транспортер вновь переходит в исходную конформацию. Глюкозные транспортеры, подобные этому эритроцитарному белку, присутствуют во всех клетках млекопитающих, и их активность может тонко регулироваться [55].

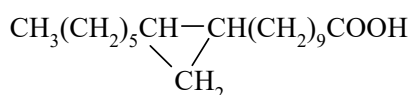
Активный транспорт требует затрат энергии, и она может поставляться в различных формах. Наиболее часто используемый источник энергии – АТФ. Большая группа АТФ-зависимых ионных транспортеров – ионтранспортирующие АТФазы, присутствующие во всех организмах. Эти активные транспортеры, включающие Na^+ - K^+ -АТФазу и Ca^{2+} -АТФазу, играют существенную роль в создании и поддержании градиентов концентрации ионов через плазматические мембраны и мембраны внутриклеточных органелл. Источником энергии для некоторых активных транспортеров, например, бактериородопсина, является свет. Первичный активный транспорт обеспечивается прямыми непосредственными источниками энергии, такими как АТФ, свет или электронный транспорт [1, 55]. Вторичный активный транспорт возможен благодаря ионным концентрационным градиентам [1, 55].

Следует отметить, что в транспортный процесс может быть вовлечен не один компонент мембраны, а много больше. Затраты энергии на активный транспорт очень велики, например, у человека составляют более трети всей энергии, аккумулируемой в процессе метаболизма [195].

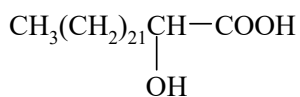
7.7. Физиологические функции структурных компонентов фосфолипидов, липопротеидов и биологических мембран

Фосфолипиды, липопротеиды, биологические мембраны и их структурные компонент, исходя из их свойств и строения, выполняют физиологические функции различного рода. Одна из основных функций их связана с проблемами полноценного, сбалансированного питания человека, животных и микроорганизмов. Если рассматривать развивающиеся организмы как единую систему с поступающими из воздуха, воды, почвы веществ, то с этих позиций компоненты фосфолипидов, липопротеидов и биологических мембран не только продукты технологических операций; пищевых природных цепочек; переработки пищевых продуктов, но и важнейший, необходимый фактор устойчивости жизненных процессов

Структурообразующая функция. Прежде всего, рассмотрим ту функцию для жирных кислот, которые входят в состав ацилглицеринов (нейтральных жиров типа триастерина, трипальмитина, триолеина); фосфолипидов; сфинголипидов; ганглиозидов; восков; терпенов; стероидов; жирорастворимых витаминов; простогландинов; липопротеидов и самих биологических мембран. Структурообразующая функция жирных кислот объясняется совместным присутствием неполярных «хвостов», одним из которых является ненасыщенная жирная кислот. Наибольший интерес у исследователей вызывают наряду с линолевой линоленовая и арахидоновая кислоты, так как они являются сильнейшими антиоксидантами, способствующими нейтрализации свободных радикалов в организме человека и животных [1, 185]. Кроме того, определенные структурные особенности присущи некоторым необычным жирным кислотам лактобацилловой



и цереброновой

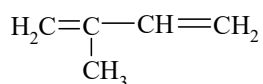


[7.7.1].

В ненасыщенных жирных кислотах невозможность вращения вокруг кратных (двойных) связей приводит к жесткому изгибу углеводородной цепи. В природных жирных кислотах цис-конфигурация двойной связи создает изгиб алифатической цепи под углом приблизительно 30° . Цис-формы менее стабильны, чем транс-формы (они переходят при нагревании в присутствии катализаторов в транс-формы). К примеру, олеиновая кислота довольно легко при нагревании переходит в свою транс-изомер элаидиновую кислоту, имеющую намного более высокую температуру плавления (из природных кислот широко распространена только одна ненасыщенная кислота в транс-форме, а именно вакценовая кислота [1, 175, 189, 234, 239]). В жирных кислотах с несколькими кратными связями цис-конфигурация придает углеводородной цепи изогнутый и укороченный характер (рис. 1.1). Естественно, эти структурные особенности жирных кислот значимы для других биологических объектов, в том числе в биологических мембранах.

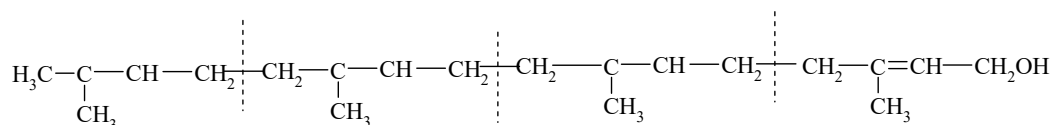
Природные жирные кислоты, как ненасыщенные, так и насыщенные, не поглощают свет ни в видимой, ни в близкой УФ-области. Однако, если ненасыщенные жирные кислоты, содержащие более одной двойной связи, могут быть изомеризованы нагреванием в присутствии калиевой щелочи и превратиться в жирные кислоты с сопряженными двойными связями типа —CH=CH—CH=CH— , то кислоты будут характеризоваться способностью поглощать свет в спектральной области 230-260 нм. Подобная изомеризация позволяет количественно определять полиненасыщенные жирные кислоты спектрофотометрически [1, 202, 223, 233].

Другой структурной единицей встречающихся в липидах компонентов являются терпены, молекулы которых выстроены путем объединения нескольких молекул пятиуглеродного углеводорода изопрена (2-метил-1,3-бутадиена):



Терпены, состоящие из двух изопреновых группировок, называются монотерпенами, из трех изопреновых фрагментов сескви-

терпенами. Терпены, содержащие 4, 6 и 8 изопреновых группировок, называются дитерпенами (точками разделены изопреновые единицы),



Фитол (дитерпен)

тритерпенами и тетратерпенами.

Молекулы терпенов могут иметь линейное или циклическое строение [1, 48, 55]. Последовательно расположенные изопреновые блоки терпенов (особенно в линейных сегментах, соединены обычно по типу «голова к хвосту», но известны и случаи соединения «хвост к хвосту». Такое расположение называется аperiодическим. Двойные связи в молекулах линейных терпенов находятся в устойчивой транс-конфигурации. Однако, для некоторых терпенов характерна цис-конфигурация (например, в витамине А и его предшественниках каротина) (рис.1.8). Подобные терпены придают растениям присущий им аромат и являются главными компонентами «душистых присадок» в маслах («душистых масел»). Так, монотерпены камфора, карван, гераниол, лимонен, ментол, пинен являются главными компонентами камфорного, тминного, гераниевого, лимонного, мятного, скипидарного масел. К дитерпенам относится упоминавшийся выше фитол (линейный терпеноидный спирт), являющийся компонентом фотосинтетического пигмента хлорофилла. Таким образом, и жирные кислоты, и терпены являются структурнообразующими единицами с ярко выраженными гидрофобными свойствами, которые в определенном приближении можно сравнивать с дисперсионными взаимодействиями неполярных блоков в фосфолипидах, липопротеидах и биологических мембранах:

$$E_{\text{дисн}} = -3/4 (\alpha^2 \cdot h \cdot \nu_0 / r^6) \quad (7.7.2)$$

где α – поляризуемость (деформируемость) молекул или атомов; h – постоянная Планка; ν_0 – частота колебаний, отвечающих нулевой энергии, присущая каждому атому или молекуле при 0° К возникает ν_0 в любой момент времени из-за несовпадения центров

тяжести электронного облака и ядра, что именуется как мгновенный диполь. В результате мгновенных диполей соседние молекулы испытывают притяжение друг к другу, а энергия системы снижается.

Необычные по своим структурообразующим функциям и свойствам представляют собой сложные эфиры высокомолекулярных жирных кислот и одноатомных спиртов с длинной углеводородной цепью, носящие названия восков. Воски обладают ярко выраженными гидрофобными свойствами, которые дополняют дисперсионные взаимодействия жирных кислот и терпенов при формировании биполярных слоев в биологических мембранах. В состав восков пчелиного происхождения могут входить

(наряду с мириципальмитатом) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$ высокомолекулярные кетоны [1, 55].

Близкими к воскам по структуре гидрофобных фрагментов являются простогландины, которые образуются из ненасыщенных жирных кислот путем замыкания циклопентенового цикла в середине гидрофобного «хвоста» (рис. 1.3.1). Наряду с присутствием в структуре гидрофобных цепочек у простогландинов (после процесса замыкания) остаются гидрофильные COOH - группы и появляются новые гидрофильные фрагменты – кетонные $>\text{C}=\text{O}$ и спиртовые $-\text{OH}$. Поэтому у простогландинов при определенных рН проявляются способности вступать в реакции (в качестве лигандов) с ионами щелочноземельных и переходных металлов Me^{n+} . При этом реакции идут по типу «коробка для яиц» с образованием хелатов. В качестве примера на рис. 2.31 приведен один из вариантов образования хелата простогландина с ионами Ca^{2+} :

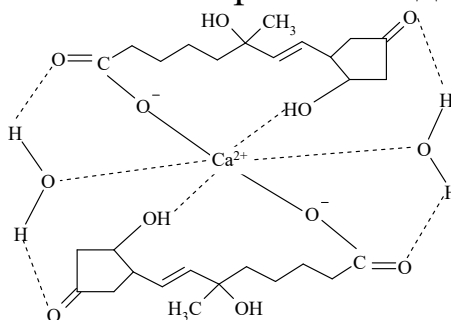


Рис. 7.7.1. Модель «Кальций – простогландиновой» структуры.

Следовательно, для простогландинов характерна (наряду с гидрофобными взаимодействиями) еще и структурообразующая способность с образованием хелатных комплексов с ионами Me^{n+} . Образование таких комплексов возможно из-за наличия в простогландах гидрофильных групп карбоксильного, карбонильного и спиртового типа.

Полипреновые соединения (структура которых выстроена из пятиуглеродных фрагментов изопрена) представлены стероидами и жирорастворимыми витаминами. Стероиды в структуре имеют четыре соединенных кольца, три из которых шестиугольны (А, В, С) и пятиуглеродное кольцо (схема 1.6). Одним из стероидов является холестерол – важнейший компонент плазматических мембран млекопитающих, но редко встречается в растениях. Холестерол обладает особыми структурообразующими функциями, потому, что в его молекуле имеется ОН-группа при С-3 атоме и метильные группы при С-10 и С-13. Кроме того, холестерол имеет у С-17 восьмиуглеродную часть цепи. Структура других стероидов, встречающихся в растениях и грибах, подобно холестеролу имеет гидроксильную группу при С-3 атоме. Стероидные гормоны млекопитающих эстроген и андроген содержат у С-18 и С-19 углеводородные цепи разной длины. Структурные особенности этих стероидов зависят от длины углеводородной цепи у С-17 атома кольцевой системы, количеством и расположением двойных связей, метильных, гидроксильных и кетогрупп [1, 55, 93].

Несмотря на негативное отношение к холестерину, как к фактору развития у людей сердечно-сосудистых заболеваний, этот стероид играет в жизнедеятельности млекопитающих и полезную роль [94, 102, 103]. Ведь он выступает не только как компонент биологических мембран у человека, но и как предшественник стероидных гормонов и солей желчных кислот. Для успешного функционирования различных систем живого организма необходимы такие стероидные гормоны как мужской половой гормон тестостерон, женский гормон эстрадиол, гормон альдостерон, образующийся в коре надпочечников и регулирующий водно-солевой баланс.

Необходимо отметить, что гидрофобность холестерина намного выше, чем у фосфолипидов и сфинголипидов. Вызвано это тем, что в холестерине единственной полярной группой является гидроксильная группа при С-3 атоме, поэтому максимальная концентрация стероида в воде не превышает 10^{-8} М.

Жирорастворимые витамины (токоферолы) подобно стероидам имеют гидроксилсодержащую систему ароматических колец и изопреноидную боковую цепь различной длины. Имеются основания предполагать, что витамины α -, β -и γ -токоферолы хотя и не являются структурообразующими компонентами, но препятствуют разрушающему действию молекулярного кислорода, способного атаковать двойные связи полиненасыщенных жирных кислот и носят название антиоксидантов [1, 18, 93].

Витамин К имеет две формы K_1 и K_2 , которые относятся к группе нафтохинонов с длинными боковыми изопреноидными цепями различной длины. Дефицит витамина K_1 и K_2 приводит к нарушению процесса свертывания крови из-за утраты организмом способности синтезировать протромбин – белок, необходимый для образования кровяного сгустка [1, 49, 75, 94]. В участии синтеза протромбина и заключается структурообразование витаминов K_1 и K_2 .

Витамины группы D (D_1 , D_2 и D_3) непосредственно являются производными стероидов, поэтому способность осуществлять структурообразующую функцию и у витаминов D_1 , D_2 , D_3 , и у стероидов будет аналогична. Отличие в этом случае проявляется в том, что синтез D_2 из эргостерина (содержащегося в растительном сырье), и D_3 из 7-дегидрохолестерина (содержащегося в печени рыб) происходит под действием ультрафиолетового излучения, которое вызывает разрыв кольца В между 9-м и 10-м углеродными атомами (схема 1.9) [1, 18, 96].

Структурообразующие функции клеточных мембран зависят и от формирования двойного фосфолипидного слоя (за счет гидрофобных взаимодействий и дисперсионных сил) [1, 55, 143, 145, 190], и от наличия гидрофильных групп, «головы» которых направлены наружу (рис. 4.3). В данном контексте подчеркивается, что липидные компоненты удерживаются вместе главным образом дисперсионными, а не ионными взаимодействиями. Каждой

мембране соответствует определенное, характерное для нее соотношение разных липидов (среди которых преобладают полярные). Предполагается, что двумерное распределение липидов в мембране носит строго специфический характер [1, 55, 190]. У фосфолипидов, сфинголипидов и гликолипидов «полярные головы» молекул значительно различаются по своей общей геометрии, по размерам, способности к реакциям протолитиза, полярности, электрическому заряду, к реакциям хелатообразования с ионами переходных металлов [8, 55, 57, 141, 160, 172, 205, 255]. Это создает возможность структурообразования и для самого разнообразного сочетания таких липидов в различных мембранах. Можно предположить, что характер взаимоположения различных типов полярных «голов» молекул сложных мембранных липидов содержит информацию о структуре и свойствах мембраны. Последнее вполне соотносится с тем, что подобная информация весьма сходна с порядком чередования различных R-групп аминокислотных остатков, содержащих информацию о структуре и свойствах белка [1, 18, 160, 190], а также с порядком чередования пуриновых и пиримидиновых оснований в ДНК и РНК [1, 55, 159, 172].

Несомненно, что эти рассуждения имеют силу только для жидкокристаллического состояния липидов (ламеллярные слои на рис. 4.3) или в случае сосуществования жидкокристаллических мицеллярных бислойных структур с гексагональными (рис. 4.3).

Механическая функция.

Исходя из структурообразующей функции, можно полагать, что она тесно связана с механическими свойствами биологических мембран. Фактически формирование клеточных структур приводит к ограничению воздействия внешних сил на бимолекулярные слои в мембране. Они играют роль механического барьера, способного ограничить лабильные, гибкие, эластичные, постоянно обновляющиеся образования компонентов в мембранах. Это позволяет мембранам сохранять и прочность, и эластичность при деформациях [55, 77, 161, 172, 190]. Основную механическую нагрузку, вызываемую гидростатическим и осмотическим давлением внутри клеток у высших растений, несет клеточная стенка, которая построена из пектина, целлюлозы, гемицеллюло-

зы и белка экстенсина. У бактерий клеточные мембраны построены из сложного полисахарида муреина и играют определяющую роль в регулировании механической нагрузки протоплазмы [1, 55, 249].

Внутриклеточные мембраны – сложные биологические системы, такие как мембраны эндоплазматического ретикулума, лизосом, ядра, наружная и внутренняя мембраны митохондрий. Суммарная поверхность мембран настолько огромна, что позволяет им выдерживать колоссальные механические напряжения. Прежде всего, с биологической точки зрения механическая функция характерна и интересна однопространственная ламеллярная и двухпространственная цилиндрическая, или гексагональная. В ряде случаев решающую роль в сдвиге липидных слоев и предотвращения сдвиговых деформаций в бислоях мембраны играет гексагональная мезофаза [1, 55, 159, 172].

Если обратимся к рис. 4.1, из которого следует, что наибольший интерес представляет для объяснения механической функции фосфолипидов участок С, когда конденсированная жидкая пленка липида начинает частично переходить в твердоконденсированное состояние D. В этом случае можно считать, что имеем неоднородную смесь (суспензию), для которой возможно рассчитать вязкость. Коэффициент вязкости является одной из основных величин, характеризующих очень важное для липидов в биологических мембранах свойство - оказывать сопротивление перемещению одного ламеллярного жидкого слоя фосфолипидов относительно другого [145, 190]. При расчете процессов, связанных с механической устойчивостью, седиментацией, фильтрацией, транспортными функциями в биологических мембранах необходимо знать вязкость, как физико-химическую величину. Существует большое число способов экспериментального определения и расчета вязкости как чистых жидкостей, так их смесей. Данные по этому вопросу нашли обобщение во многих научных публикациях, в том числе в монографиях Бретшнайдера С. [145] и Генниса Р. [195]. На основании литературных данных нами был выбран для определения по расчетным данным способ расчета вязкости ламеллярных бислоев биологической мембране на границе с (гелеобразной) твердой ламеллярной фазой (рис.5.2).

Чтобы быстро получить ориентировочное значение вязкости водной суспензии липида в ламеллярном бислое, можно воспользоваться номограммой (рис. 7.7.2), предложенной Дэвисом [145]. Дэвис разработал новые сетки для графического изображения зависимости вязкости растворов от концентрации. Неудобством при этом явилось использование величины логарифмов синусов десятикратного значения вязкости $\lg \sin 10\mu$. Чтобы избежать логарифмирования тригонометрической функции (синуса) в графическом изображении зависимости вязкости растворов гидроокисей и неорганических солей от концентрации (когда по оси абсцисс равномерными делениями откладывают мольные концентрации, а на оси ординат откладывают логарифмы синусов десятикратной величины вязкости $\lg \sin 10\mu$), Дэвис разработал специальную сетку (рис. 7.7.3) для вычерчивания прямой. На этой прямой необходимо иметь два значения вязкости раствора при той же температуре, но для разных концентраций.

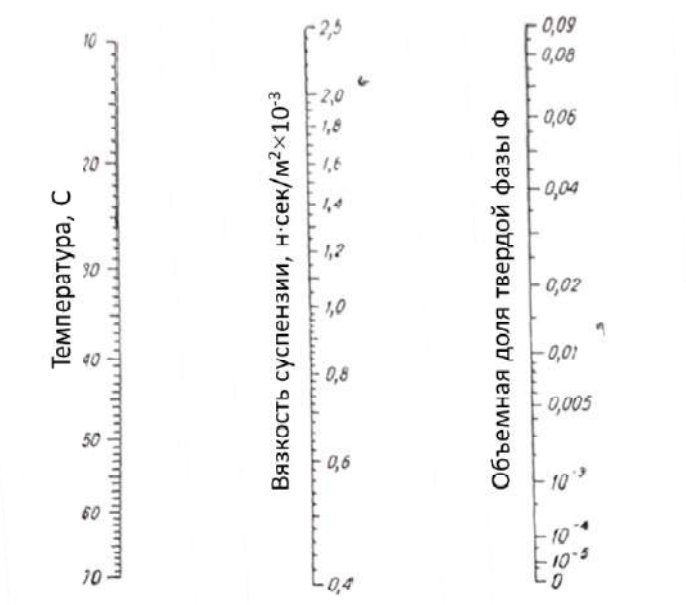


Рис. 7.7.2. Номограмма для расчета вязкости суспензий по Дэвису [145].

Для представления зависимости вязкости раствора электролита от температуры хорошо подходит диаграмма, предложенная Дюрингом (рис. 7.2.4). В качестве стандартного вещества берут растворитель, его температуру наносят на ось абсцисс. Температуру раствора откладывают на оси ординат. Затем наносят на

диаграмму точки, соответствующие одинаковой вязкости стандартного вещества и раствора (при разных температурах).

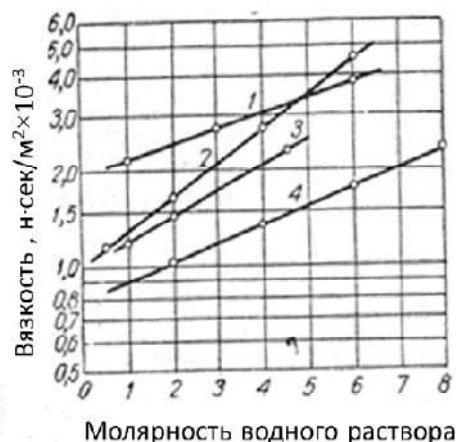
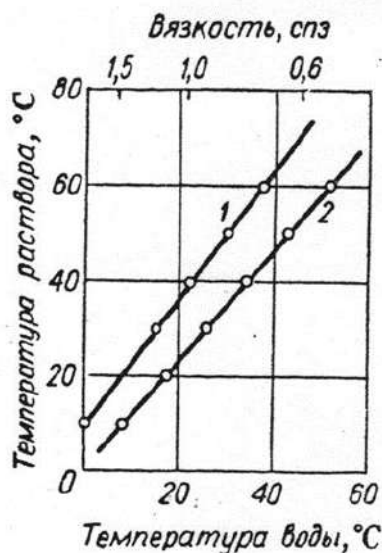
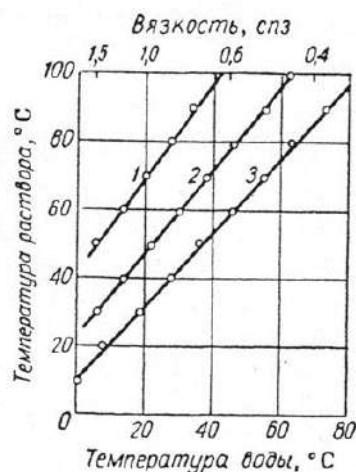


Рис. 7.7.3. Сетка Дэвиса.



а



б

Рис. 7.7.4. Диаграммы типа Дюринга: а) Зависимость вязкости раствора NaNO_3 от температуры (1- 25% раствор; 2-10% раствор); б) Зависимость вязкости раствора сахарозы от температуры (1,2,3-30%, 20%,10% соответственно); Стандартная жидкость – вода.

Следует заметить, что на диаграммах Дюринга прямолинейная зависимость не получается, если в растворах органических веществ происходит ассоциация, сольватация и другие физико-химические процессы. В этом случае расчет вязкости водных растворов электролитов, содержащих наряду с водой две соли или гидроокиси (не реагирующих между собой), пользуются

формулой Здановского [145]. Эта формула была проверена на системах $\text{NaCl-NH}_4\text{Cl-H}_2\text{O}$; $\text{NaCl-KCl-H}_2\text{O}$; $\text{NaOH-N}_2\text{CO}_3\text{-H}_2\text{O}$; $\text{NaCl-MgCl}_2\text{-H}_2\text{O}$. Автор составлял растворы, смешивая по два раствора, содержащих по одной соли. Вязкость $\mu_{\text{см}}$ такого раствора (смеси) можно определить, если известны вязкости μ_1 и μ_2 исходных растворов (один компонент плюс вода) и плотности ρ_1 и ρ_2 (или мольные доли v_1 и v_2 этих растворов).

По Здановскому

$$\mu_{\text{см}} = \frac{X_1\rho_1 + X_2\rho_2}{X_1(\rho_1 / \mu_1) + X_2(\rho_2 / \mu_2)} \quad (7.7.3)$$

или

$$\mu_{\text{см}} = \frac{V_1 + V_2}{(V_{M1} / \mu_2) + (V_{M2} / \mu_1)} \quad (7.7.4)$$

где X_1 и X_2 – объемные доли растворов.

Ограниченность предложенных уравнений (7.7.3) и (7.7.4) вытекает из отсутствия данных для органических молекул и ионов. Поэтому в наибольшей мере (по определению вязкости липидов в биологических мембранах) приемлемо использование диаграммы по Дэвису (рис. 7.7.2). Для этого на левой оси отмечается точка, соответствующая температуре смеси. На правой оси фиксируется точка, соответствующая объемной доле Φ твердой фазы (рис. 7.7.2) в монослое. Прямая линия, соединяющая указанные точки, пересекает среднюю ось в точке, соответствующей вязкости на границе «жидкая – твердая фазы» (рис. 7.7.2).

Таким образом, для расчета вязкости раствора в биологических мембранах намечены пути выбора. Этот выбор должен учитывать, как структуру мембраны и ее компонентов, так и те химические процессы, происходящие на наноуровне, а также процессы самоорганизации в системе, обусловленные супрамолекулярными структурами [1, 55, 144, 172].

Расчет вязкости растворов электролитов в мембранных слоях можно проводить по сетке Дэвиса или диаграмма типа Дюринга [145]. Применимость подобных способов распространяется также для биполярных липидных слоев, если учитывать данные табл. 7.7.1

Таблица 7.7.1. Формулы для расчета вязкости смесей липидов с учетом Φ^* .

Уравнение	Область применения
$\mu_{см} / \mu_{ж} = (1 + 0,5\Phi) (1 - \Phi)^4$	$\Phi < 0,1$
$\mu_{см} / \mu_{ж} = 1 + 4,5\Phi$	$\Phi < 0,4$
$\mu_{см} / \mu_{ж} = 1 / (1 - \Phi^{1/3})$	$0,5 < \Phi < 0,9$
$\mu_{см} / \mu_{ж} = 1 + 2,5\Phi + 10,05\Phi^2$	$\Phi < 0,3$

Φ^* - объемная доля «твердого» вещества в биполярном слое

Метод расчета (предложенный Кураевым) для расчета вязкости суспензий, применимый в биполярных слоях мембраны, основан на уравнении 7.7.5:

$$\mu_{см} = \mu_{ж} \left[1 + \frac{2c}{(1 - 1,2c^{2/3})^2} \right], \quad (7.7.5)$$

где $\mu_{см}$ – вязкость на границе жидкого ламеллярного бислоя I и твердой ламеллярной фазы IV (рис. 5.2) [190], приравненная к вязкости суспензии; $\mu_{см}$ – вязкость жидкости (растворителя); C – концентрация твердой фазы.

$$C = n^3 (\pi d^3 / 6), \quad (7.7.6)$$

где n – число частиц на единице длины пространства, заполненного жидкостью; d – диаметр частиц.

Формула 7.7.5 дает достоверные результаты для концентрации $C < 0,25$ (табл. 7.7.2).

Таблица 7.7.2. Сравнение расчетных и экспериментальных значений $\mu_{см}/\mu_{ж}$.

C	Значение $\mu_{см} / \mu_{ж}$.		C	Значение $\mu_{см} / \mu_{ж}$.	
	расчетное	экспериментальное		расчетное	экспериментальное
0,05	1,14	1,17	0,20	2,12	2,10
0,10	1,36	1,35	0,25	2,85	2,80
0,15	1,68	1,67	0,30	3,85	4,10

Наиболее точно можно вычислить вязкость в мембранных слоях (аналогично смесям), если известны экспериментально найденное хотя бы одно значение вязкости смеси и вязкости чистых компонентов. В этом случае целесообразно применять уравнение Тамуры и Кураты [45]:

$$\lg \mu_{см} = x_1 \cdot \mu_1 \cdot \Phi_1 + x_2 \cdot \mu_2 \cdot \Phi_2 + \mu_{1,2} (x_1 \cdot x_2 \cdot \Phi_1 \cdot \Phi_2)^{0,5} \quad (7.7.7)$$

где $\mu_{1,2}$ – коэффициент взаимодействия; x_1, x_2 – доли; μ_1, μ_2 – вязкости компонентов 1 и 2; Φ_1, Φ_2 – объемные доли компонентов в смеси.

Транспортная функция.

Особенности и закономерности переноса минеральных и органических компонентов в биологических мембранах достаточно полно освещены в главе 7.6. В связи с этим, при рассмотрении транспортных характеристик следует остановиться в основном на представлениях о том, что липидные бислои и мембраны являются избирательно проницаемыми барьерами, отделяющими живые клетки от окружающей среды. Несомненно, что транспортные функции липидных мембран самым тесным образом связаны с их структурообразующими и механическими свойствами. Липидные слои могут существовать и в отсутствие белков, но белки и другие полипептидные фрагменты являются важнейшими компонентами биологических мембран. Толщина мембран колеблется в пределах 6-10 нм вследствие наличия белков, закрепленных в бислое. Мембранные белки включены в транспорт молекул и ионов непосредственно через липидный бислой, передачу сигналов внутрь клетки и во взаимодействие между плазматическими мембранами и цитоскелетом.

Мембранные белки как бы «плавают» в фосфолипидном слое. Их обычно подразделяют на два типа – интегральные и периферийные. Периферийные белки фиксируются в бислой преимущественно электростатическими силами и сравнительно легко мигрируют из мембраны растворами электролитов с высокой ионной силой.

Интегральные белки глубоко погружены в липидный бислой, причем:

- 1) Одни из них полностью погружены в гидрофобные «хвосты», то есть в середину бислоя;
- 2) Другие белки «пронизывают» бислой насквозь и соответственно вступают в соприкосновение с водным раствором окружающей клеточной среды, а также с водным раствором цитозоля;
- 3) Третьи белки «погружены» в липидный бислой с той или другой его стороны, но не «пронизывают» бислой насквозь.

Интегральные белки находятся внутри бислоя и контактируют с гидрофобным окружением. Периферийные белки более слабо ассоциированы с мембранной поверхностью [1, 55, 75, 133]. В определенной мере ассоциация и интегральных, и периферийных белков с гидрофобными структурами мембраны сходна с процессами модификации нерастворимой матрицы (например агарозы, диэтиаминоэтил-ДЭАЭ-целлюлозы) углеводородами, образующими гомологические ряды $(X(CH_2)_nNH\text{-сепароза})$, где $X = H; NH_2; OH; COOH; C_6H_5$ и др.). Каждый член этого ряда обеспечивает лиганд «ножкой» различного размера и протяженности, которая взаимодействует с доступными гидрофобными «карманами или гидрофобными участками различных белков (рис. 7.5.4) [133, 188].

Гидрофобные взаимодействия в данном случае играют ключевую роль в ряде транспортных переходов органических молекул и ионов на агарозах ω -аминоалкильного ряда. Комплекс «белок-ДЭАЭ-целлюлоза» демонстрирует степень различной скорости транспорта через такие мембранные слои. Подобные процессы даже получили свое воплощение в гидрофобной хроматографии. В научный обиход прочно вошел термин «гидроиндекс (отношение гидрофильности к гидрофобности для коротких сегментов белковой макромолекулы)», который положителен для гидрофобных концевых аминокислот в «транспортируемых» ферментах и отрицателен для гидрофильных концевых аминокислот.

При рассмотрении таких транспортных переносов в мембранных слоях важно сохранить критический взгляд на взаимодействие гидрофильности и гидрофобности. Несомненно, трудно представить воду, полностью лишенную гидрофобного окружения. Растворимость воды в жидких углеводородах достаточна, чтобы происходил быстрый обмен через поверхность раздела между малым количеством растворенной воды и водной толщей. Большинство биологических мембран в действительности свободно проницаемо для молекул воды, если в мембранных слоях есть углеводороды. Быстрое движение воды через гидрофобный слой биомембран является важнейшим аспектом гомеостаза, при помощи которого индивидуальные клетки биологические организмы способны дать ответ на биохимические стрессы. Механизм

этого ответа не приводит к разрушительным и необратимым для живых организмов процессам. Проницаемость биомембран для заряженных ионов и больших гидрофильных молекул существенно ниже по сравнению с водой [160, 161].

При рассмотрении транспорта самих белков и их закрепления в бислоях мембран может быть полезна теория адсорбции изолированных макромолекул. Поведение молекул белка при этом рассматривается как присутствие адсорбционной поверхности на нормаль к этой поверхности (рис. 7.7.5), которая является плоской. Принимается во внимание вероятность W_F проницаемости ν -кратного пересечения макромолекулярной цепочки из N сегментов, крайний из которых прикреплен к плоскости.

Асимптотическая оценка числа ν при $N \rightarrow \infty$ показывает, что оно ведет себя различным образом в зависимости от значений энергии взаимодействия E . При $|E| < k \cdot T \cdot \ln 2$ значение (ν) не зависит от числа сегментов N молекулярной цепочки. При $|E| = k \cdot T \cdot \ln 2$ значение (ν) растет пропорционально \sqrt{N} , а при $|E| > k \cdot T \cdot \ln 2$ – пропорционально N . Следовательно, при $|E| = k \cdot T \cdot \ln 2$ происходит скачкообразное изменение адсорбируемости белка (то есть число его адсорбированных сегментов резко возрастает). При этом $|E| = k \cdot T \cdot \ln 2$ называется критической энергией $E_{кр}$.

Если $E = E_{кр}$. (когда энергия взаимодействия белковых сегментов с поверхностью E равна $E_{кр}$), то наш белок ведет себя одинаково как в присутствии адсорбционной поверхности бислоя, так и в отсутствии таковой. Значит в этом случае состояние бислоя не меняется и энергетическое (энтальпийное) взаимодействие белка с бислоем компенсирует ограничение степеней свобод сегментов при их распределении на поверхности. При $|E| < |E_{кр}|$ и $|E| > |E_{кр}|$ подобная компенсация не имеет места. В первом случае белок стремится «оттолкнуться» от поверхности бислоя мембраны и «уйти» в раствор, а во втором случае белок адсорбируется большим числом сегментов. Статистическая сумма Q для молекул реального белка есть функция его свободной энергии F :

$$Q = \exp (-F/kT) \text{ и } F = U - TS \quad (7.7.8)$$

где U – внутренняя энергия белковой молекулы; S – энтропия; T – абсолютная температура.

Статистическая сумма Q определяет вероятность некоторого состояния белковой макромолекулы в растворе. Присутствие поверхности бислоя в мембране изменяет величину каждого из слагаемых в (7.7.8). При этом значение свободной энергии системы F , с одной стороны, уменьшается за счет адсорбционного взаимодействия сегментов белка с поверхностью бислоя, а с другой – возрастает вследствие уменьшения энтропии макромолекулы белка. Значение энергии взаимодействия $E=E_{кр}$ соответствует случаю, когда энергетические изменения, происходящие с белком в присутствии плоской адсорбционной поверхности в бислое, компенсирует его энтропийные изменения S [15].

Для реальных белков при $|E| = |E_{кр}|$ среднее число адсорбированных сегментов (ν) пропорционально \sqrt{N} ; при $|E| > |E_{кр}|$ - пропорционально N ; при $|E| < |E_{кр}|$ - не зависит от числа сегментов белка. Скачкообразный характер зависимости ν от N и E при переходе через точку $E = E_{кр}$ связан с фазовым переходом второго рода, меняющим поведение макромолекулы белка с изменением E . В практическом плане это соответствует прочному связыванию белковой макромолекулы с бислоем мембраны.

Важной характеристикой фиксации белков является способ, которым гидрофобные или гидрофильные группы концевых аминокислот распределяются вдоль полипептидного скелета.

Белки, естественно, отличаются друг от друга последовательностью соединенных друг с другом аминокислот. В водорастворимых глобулярных белках гидрофобные аминокислоты с известной структурой «спрятаны» внутри структуры полипептида, а гидрофильные группы находятся на поверхности, где они гидратируются водой.

Большой вклад по изучению физико-химии и закреплению пептидов в фазе синтетических мембранных слоев различной структуры внес доктор химических наук В.А. Даванков. Эти исследования по отношению к биомембранам необходимо рассматривать как модельные [146, 147, 188]. Сорбция пептидов на сверхсшитых полимерах, синтезированных на основе полистирола, может быть представлена как лигандообменная хроматография, а физико-химические взаимодействия «сорбент – пептид»

идентичны процессам, используемым в аффинной хроматографии.

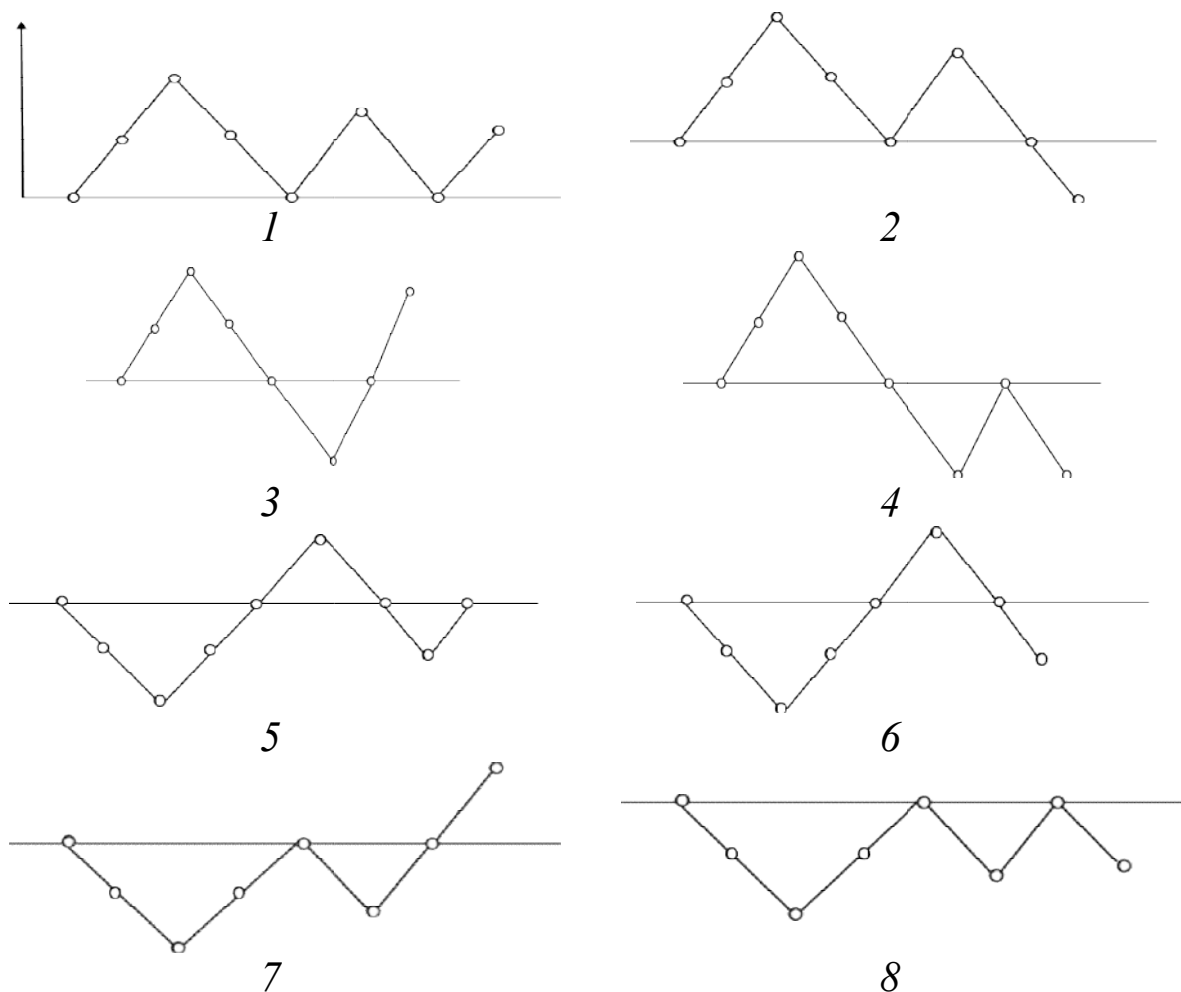
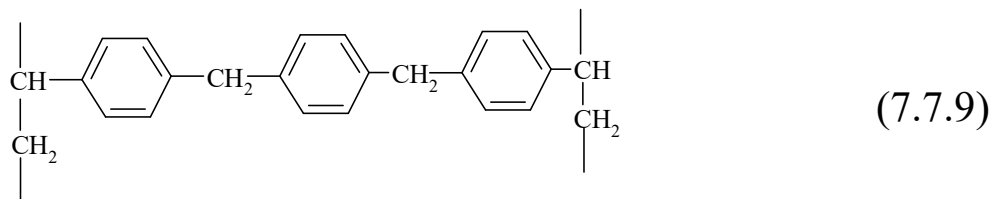


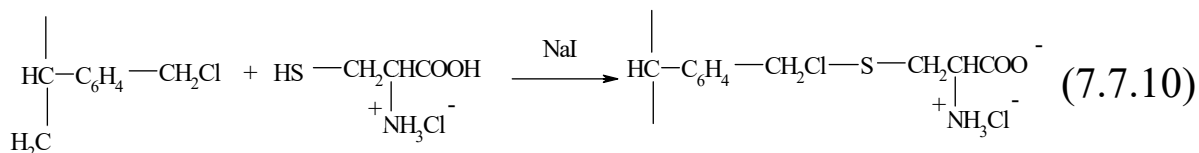
Рис. 7.7.5. Схема одной конформации одномерной полимерной цепочки из семи сегментов вблизи плоской поверхности адсорбента (1) и семи различных разрешенных конформаций в отсутствие поверхности (2-8) [15, 234].

Даванков и сотр. [148] предложили при синтезе сверхсшитых полимеров изопористого типа проводить поперечную сшивку линейных полистирольных цепей в растворах с использованием различных дифункциональных соединений. Взаимодействие 4,4'-бис(хлорметилдифенила) (ХМДФ) или п-ксилиленхлорида (КДХ) с полистиролом по реакции Фриделя-Крафтса приводит к образованию сшивающих «мостиков» между двумя соседними цепями, которые на два фенильных кольца длиннее, чем исходные сшивающие агенты:

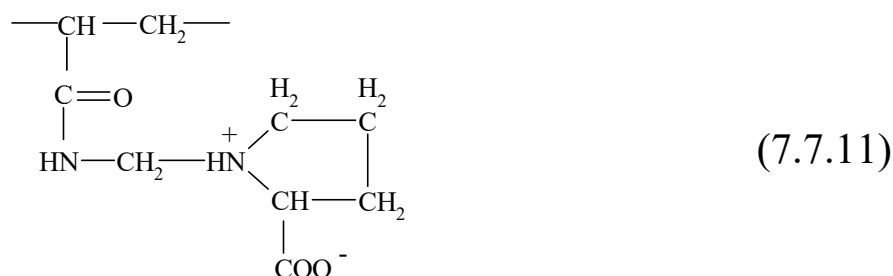


В качестве сшивающего агента можно использовать строго определенное количество моноклордиметилового эфира (МХДЭ). Во всех случаях размеры сшивающих мостиков значительно превосходят размеры дивинилбензола (стандартного сшивающего агента для стирольных мономеров). Описанные гели можно характеризовать как сорбенты с макросетчатой структурой [148]. Из важных специфических свойств макропористых (изопористых макросетчатых) полимеров стирола, подробно описанных в работах Даванкова с сотр. [146-148, 188], наиболее эффективным в плане транспортных функций следует отнести высокую набухаемость этих трехмерных сеток. Неоспоримым преимуществом сверсшитых полистирольных гелей является способность сохранять пространственную структуру и большой объем, в котором была образована и зафиксирована их жесткая сетка. В отличие от сополимеров обычной структуры стирола и ДВБ сверхсшитый полистирол способен набухать не только в растворителях таких как толуол, но и в жидкостях, которые не сольватируют линейный полистирол – метаноле, этиловом спирте, этиленгликоле, воде. Фактически в данном случае можно говорить об общих тенденциях транспорта гидрофильных растворителей в сетке макропористых полимеров и в биполярных слоях внутриклеточных мембран.

Другой ценной характеристикой транспортных возможностей изопористых макросетчатых сополимеров стирола и биполярных слоев внутриклеточных мембран способность закрепления в геле пептидов и аминокислот. Даванков с сотр. [149] осуществили закрепление цистеина в макросетчатом сополимере, вводя цистеиновую кислоту в реакцию с хлорметилированным сополимером в присутствии 2 молей этилдиизопропиламина (необходимого для нейтрализации двух кислотных групп –SH и –COOH):

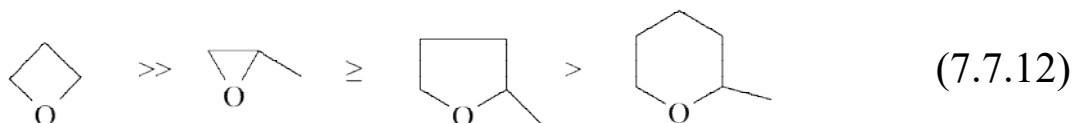


Для преодоления транспортных трудностей аминокислот в гидрофобных слоях матриц на основе сополимеров стирола с ДВБ необходимо использовать гидрофильные матрицы. Весьма эффективной явилась фиксация на полиакриламиде пролина с использованием формальдегида [49]:



Наряду с пролином подобным образом были привиты к полиакриламиду и другие аминокислоты и пептиды: аланин, валин, треонин, фенилглицин, гистидин, гидросипролин, фенилаланин, пипеколиновая кислота, азетидинкарбоновая кислота [188].

Отличия в механизме закрепления пептидов и аминокислот в гелях синтетических сополимеров и в бислоях внутриклеточных мембран вызваны тем, что фиксация осуществляется путем образования ковалентных связей (в первом случае) и межмолекулярных ассоциатов (во втором случае). Общим в рассматриваемом случае является то, что появившиеся в гелях и в бислоях пептиды и аминокислоты сами участвуют в переносе минеральных ионов (с образованием хелатных структур) и в селективном транспорте энантиомеров цвиттерлитов. Заслуживает внимание еще непонятое до конца аномально сильное координационное взаимодействие четырех членных оксетанов с хелатами металлов, а общая способность к координации метилзамещенных циклических эфиров изменяется в следующем порядке:



Для отдельного простого циклического эфира способность к координации возрастает в ряду: $Mn^{2+} < Co^{2+} \leq Ni^{2+}$; и соответственно скорость миграции в оксетановых растворах ионов Ni^{2+} (в бислоях мембраны) будет существенно выше, чем других ионов-комплексообразователей [188].

Протекторная функция.

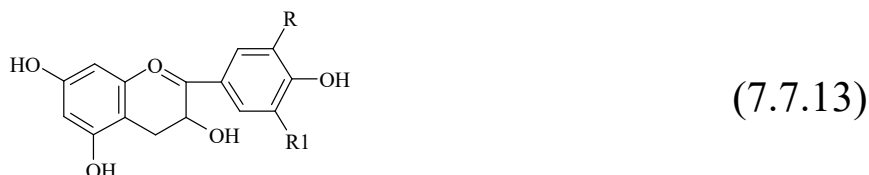
Продукты питания, содержащие фосфолипиды, ненасыщенные жирные кислоты, сквален, жирорастворимые витамины, сфинголипиды, простагландины выполняют несколько протекторных функций. Во-первых, вышеназванные компоненты являются активными антиоксидантами, уничтожающие в живых организмах избыток свободных радикалов (последние, как известно, являются инициаторами многих негативных процессов, приводящих к разрушительному воздействию на системы живого организма).

Сильнейшим антиоксидантом признана арахидоновая кислота, содержащая в молекуле четыре двойных связи:



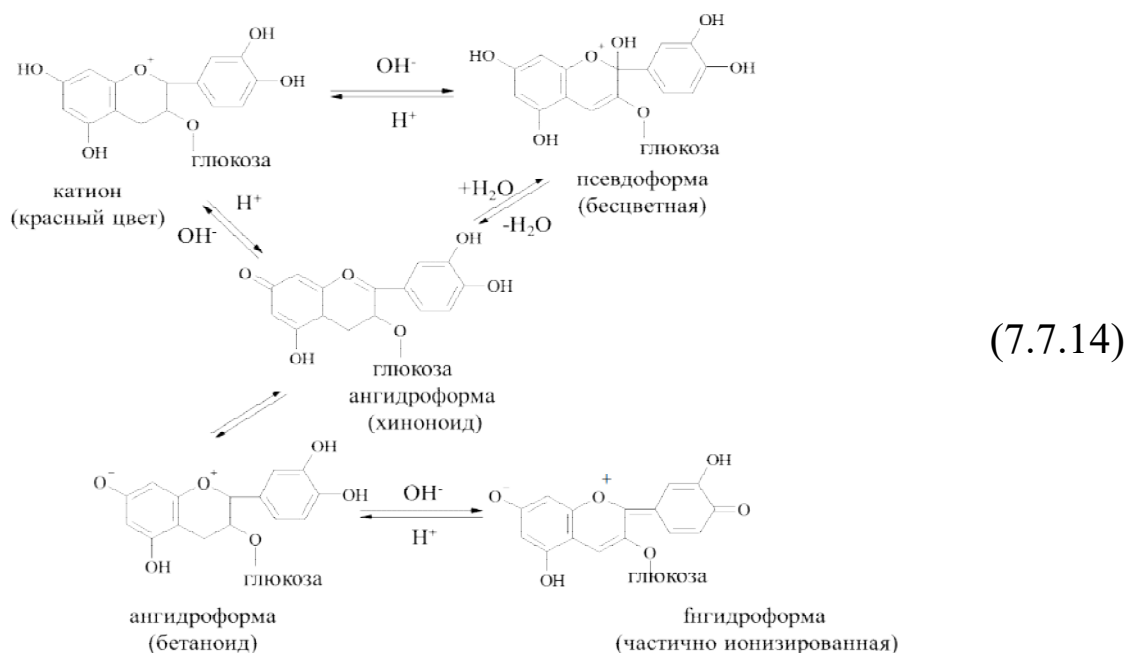
В малых количествах арахидоновая кислота содержится в морском планктоне. На два порядка больше этого антиоксиданта содержится в соленом свином сале, что позволяет рекомендовать в завтрак включать бутерброды с этим ценным питательным продуктом.

Другая группа веществ, «гасящих» свободные радикалы, принадлежит антоцианам [55, 150]. Неуглеводной частью (аглюконом) в них выступают производные флавона, в котором кольца А и В соединены гетероциклом, содержащим оксоний (четырёхвалентный кислород):



где в цианидине ($R=OH$; $R_1=H$); пеларгонидине ($R=R_1=H$); пеонидине ($R=OCH_3$; $R_1=H$); дельфинидине ($R=R_1=OH$); петунидине ($R=OCH_3$; $R_1=OH$); мальвидине ($R=R_1=OCH$).

В интервале pH от 2,0 до 5,0 антоцианы образуют очень неустойчивую ангидроформу, которая быстро обесцвечивается с образованием бесцветной хроменолпсевдоформы (7.7.14):



Окраска многих плодов, ягод, овощей обусловлены в основном антоцианами. С антоцианами связана и окраска продуктов переработки плодов и овощей (варенья, сиропы, соки, компоты). Воздействие температуры в данном случае объясняется превращениями (7.7.14) флавоноидов в мембранных слоях растительных клеток. В организме человека (на клеточном уровне) антоцианы также выполняют важные протекторные функции. Вместе с катехинами, флавоноидами их относят к витаминоподобным соединениям (так называемому витамину Р). Антоцианы, ассоциированные в мембранных слоях клеток, обладают способностью снижать ломкость и проницаемость капилляров крови. В комплексе с витаминами С (аскорбиновой кислотой) антоцианы активируют дыхание тканевых структур, участвуют в регуляции клеток коллагена у человека и животных.

Особыми веществами с протекторными функциями являются серотонин и трептамин. Они называются «молекулами радости», так как избирательно взаимодействуют с нейронами мозговых клеток, вызывая состояние оптимизм, уверенности и комфорта человека. Непосредственно серотонин и трептамин не содержатся

в живом организме, но они образуются в мембранных бислоях клеток с участием двух обязательных компонентов – аминокислот тирозина и триптофана. Разные продукты питания имеют различное соотношение триптофана и тирозина (так называемое «тирозиновое число»). Наиболее полезным признано соотношение в клеточных мембранах соотношение тирозина и триптофана как 2:1, что приводит к максимальному образованию серотонина в живом организме.

Необходимо отметить, что довольно часто чрезмерное увлечение пищевиков по получению целевого продукта питания высокой степени чистоты приводит к снижению его питательной ценности. Одной из таких технологических операций является рафинирование масел при выделении из семян масличных культур. В натуральном, нерафинированном масле присутствует всегда осадок, называемый фузой. Он, по сути, представляет собой очень ценный концентрат фосфолипидов и жирорастворимых витаминов. Наши хозяйки предпочитают готовить пищу на рафинированном масле, поскольку масло с фузой при жарке очень быстро вскипает. Однако, масло первого (холодного или горячего) отжима, содержащего в осадке фосфолипиды, можно использовать при приготовлении салатов, спреев, майонезов. Ведь и фосфолипиды, и жирорастворимые витамины «сглаживают» токсичное действие ионов переходных металлов, попавших в клеточные мембранные структуры живого организма. Липид и витамины образуют хелатные комплексы с ионами металлов и выводят токсикианты из организма, предупреждая разрушающее действие их на печень, поджелудочную железу и нейроны.

Регуляторные функции.

Регуляторные функции фосфолипидов, липопротеидов и биологических мембран определенным образом связаны с протекторными свойствами. Регуляторные функции проявляются, прежде всего, в обмене (углеводного и липидного) веществ при деятельности индивидуума в различных климатических и социальных условиях. При этом определенной моделью при рассмотрении регуляторных функций могут служить длительные занятия в ходе системной спортивной подготовки человека. О том, что движения являются не только необходимым условием развития и

укрепления мышц, опорно-двигательного аппарата, но и других показателей здоровья человека.

При анализе феномена «здоровье человека» следует рассматривать совокупность и взаимосвязь четырех составляющих: здоровье социальное, психологическое, духовное и физическое. Следовательно, здоровье человека необходимо характеризовать как совокупность отдельных компонентов и связей между ними, то есть целостную систему. Эффективность работы любой системы, ее единство зависят от качества структуры связей.

Характеризуя социальную составляющую, можно говорить о статусе личности в обществе, в том числе о материальной обеспеченности и финансовом благополучии, с формированием значимых для общества качеств, способностью к долговременной и полноценной активности на благо большинства членов сообщества.

Психологическая составляющая определяется степенью регуляции умственной, эмоциональной, волевой энергии человека, способностью противостоять информационным нападкам.

Духовность характеризуется нравственной ориентацией, восприятием добра и зла как основополагающих абсолютных понятий, менталитетом по отношению к природе, обществу и к себе, как к личности, гордостью за подвиги наших предков во благо Отечества.

Физическое здоровье неразрывно связано с элементами личной гигиены, уровнем физического развития, со способностью центральной нервной, мускульной, кровеносной, дыхательной и других систем саморегуляции, с наличием резервных возможностей организма, сопротивлением к неблагоприятным воздействиям, владением приемами направленного восстановления при стрессовых ситуациях.

Обратившись к именам, почитаемым русскими православными людьми, можно в какой-то мере сравнить рассмотренные компоненты здоровья с Верой (духовный фактор), Надеждой (физический фактор), Любовью (психологический фактор) и Матерью их Софьей (социальный фактор). В этом плане физкультурная и оздоровительная деятельность должна рассматриваться в тесной связи с культурой психофизической регуляции, культурой меж-

личностных отношений. Можно полагать, что по отношению к психологическому, духовному и физическому факторам социальная компонента является определяющей. Человек всегда стремится к подлинному совершенству психологическому, духовному и физическому, которое, несомненно, неосуществимо без приемлемых социальных условий.

Каким образом оценить эффективность структурных связей в системе «здоровье человека»? Для этого есть уникальный показатель, определяющий качество связей – энтропия (S). Энтропия – это нарушение упорядоченности (возрастание неупорядоченности) системы. В случае замкнутых систем, изолированных от внешней среды, энтропия быстро перераспределяется внутри себя и приходит в равновесие. Однако реальные системы открыты и при совершении работы часть энергии рассеивается (энтропия передается вовне). Следовательно, производимая энтропия в обобщенном смысле является мерой излишней работы при достижении поставленных целей. В случае здоровьесберегающих форм жизнедеятельности человека энтропия характеризует побочные процессы и явления.

Для большинства населения на современном этапе развития России доля побочных, бесполезных процессов в духовной сфере сильно возросла. Если раньше при социализме исповедовался один из православных принципов: «Человек человеку – друг, товарищ и брат», то в наше нынешнее время главенствующим является принцип: «Обмани ближнего, ибо ближний обманет тебя и возрадуется». Попытка внедрить в сознание россиян нормы западноевропейской морали: «Личный успех – прежде всего», а общественные ценности – вторичны, привела к расщеплению сознания большинства россиян, вызвала внутреннее сопротивление, породила параллельную мораль «жить по понятиям». Неприятие многих протестантских (западноевропейских) ценностей создало духовную пустоту и потребность в альтернативных (национальных) российских идеях. Можно полагать, что в основе российской национальной идеи должны быть абсолютные ориентиры (добро - зло; правда - ложь; верность – измена; жизнь – смерть и так далее), а не относительные ориентиры типа «богат-

ство — бедность», так как последние и являются источником энтропии в обществе.

Психологическое здоровье (также как и социальное, и духовное) на современном этапе в России испытывает сильное влияние энтропийных факторов, которые в ряде случаев называются шумами: в телепередачах — избыточная реклама, заимствование у Запада шоу-программы; в информационной сфере — поток бесполезных или ложных сведений об истории России, о нашей Великой Победе над фашизмом, о наших мирных инициативах; в музыке — дисгармония, попса, спектакли и концерты с потоком матерщины; в экологии — воздействие радиационных, тепловых, магнитных, электрических полей, накопление твердых неконтролируемых бытовых и производственных отходов; в языке — суесловие, мат, сленг, сокращение учебных часов в школе по литературе и русскому языку. Следовательно, эти примеры проявления энтропии в системах, влияющих на психологическое здоровье граждан России, свидетельствует о преднамеренном внедрении (в том числе и западными спецслужбами) разрушающих факторов. В большинстве случаев это снижает степень регуляции умственной, эмоциональной, волевой деятельности наших граждан.

Необходимо отметить, что человек — система и очень сложная. Нам в настоящее время неизвестны биологические системы сложнее человека. Как наиболее системно развитые организмы, мы можем в известной мере нивелировать негативные проявления социального, духовного, психологического характера. По сути, мы должны проповедовать, выполняя принцип: наше состояние должно стремиться к такому, при котором производство энтропии минимально. В этом плане физическое состояние, физическое здоровье человека выступает как основной фактор снижения энтропии (рис. 7.7.6).

Восходящая ветвь кривой на рис. 7.7.6 показывает преобладание негативных психологических, духовных, социальных воздействий на человека, приводящая к росту энтропии в человеческом организме. Важным свойством энтропии является то, что в системе она либо сохраняется, либо возрастает, но никогда не уменьшается сама по себе. Для уменьшения энтропии в своем ор-

ганизме человек должен провести сложную (в какой-то мере внешнюю), кропотливую работу. И здесь одним из важных факторов выступает физическая нагрузка (на рис.7.7.6 пониженная ветвь кривой). Следствием этого является возможность передачи энтропии из организма во внешнюю среду (за счет физических возможностей человека).

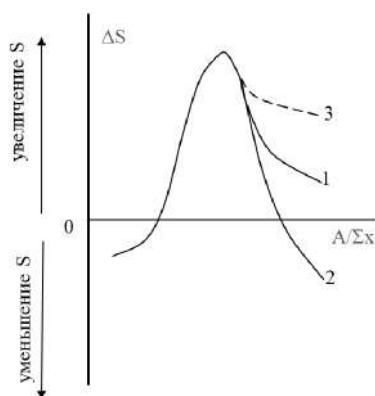


Рис. 7.7.6. Влияние соотношения $A/\Sigma x$ (A – резервные физические возможности организма; Σx – сумма негативных социальных, духовных и психологических факторов) на изменение энтропии ΔS человека.

Для человека, который совершенствует свое физическое состояние (кривая 2), процесс передачи от организма вовне происходит более полно. Если же человек искусственно допускает приток энтропии извне (злоупотребляя курением, алкоголем, психотропными препаратами, нерационально питаясь, нарушает режим сна и отдыха), то наш организм как система деградирует. Значения энтропии при этом превышает нулевую отметку (кривая 1), человек утрачивает способность к отлаженному взаимодействию иммунной, мускульной, пищеварительной, кроветворной, центральной нервной и других подсистем. Когда организм не может подавить в себе рост энтропии, наблюдается ее резкий скачок и человек умирает (кривая 3).

Следовательно, значительную роль в подготовке организма к физическим и психологическим нагрузкам отводится физической культуре и спорту, в частности оздоровительной ходьбе и бегу. «Дотянувшись» до определенного тренировочного уровня, человек уже не мыслит себя без бега, который в отдельные дни дает состояние душевного комфорта, близкого к эйфории. Бег в этом

случае выступает не просто средством оздоровления, а физической и психологической потребностью, которая находит обоснование в открытиях английского ученого М. Каразерса. Он обнаружил у людей, занимающихся длительным бегом, гормон норэпинефрин, количество которого вдвое превышает содержание в организме людей, устраняет депрессивное состояние, порождает чувство душевного комфорта и оптимизма.

Необходимо отметить, что в ходе системных беговых тренировок (в том числе и спортсменов высшей квалификации) необходимо учитывать три методически различных процесса: а) развитие физических качеств; б) удержание достигнутого уровня; в) восстановление. Идея о разработке системы направленного восстановления как важнейшего фактора повышения эффективности процесса тренировки и соревнований была разработана и апробирована впервые в мировой практике при подготовке стайеров нашим выдающимся тренером Григорием Исаевичем Никифоровым. Многих тренеров, врачей, корреспондентов поражала легкость, с какой спортсмены – олимпийцы (которых тренировал Г.И. Никифоров) справлялись с огромными нагрузками, пробегая за тренировку по сорок и более километров. Ведь в те времена никто из зарубежных стайеров не использовал подобные тренировочные объемы. Позднее группа ученых-физиологов, проведя детальное обследование известного марафонца Ивана Филина (Чемпиона Европы в марафонском беге), марафонца Сергея Попова; Владимира Куца (Олимпийского Чемпиона в Мельбурне на 5000 и 10000 м); Петра Болотникова (Олимпийского Чемпиона в беге на 10000 м в Риме), была потрясена. И было отчего! При тестировании выяснилось, что все стайеры и марафонцы, тренировавшиеся у Никифорова, спокойно переносили такой недостаток кислорода, который был смертельным для обычного человека. Фактически Григорий Исаевич подготовил на клеточном уровне дыхательную и кроветворную систему спортсменов, чтобы они функционировали при недостаточных количествах кислорода. Никифоров пришел к выводу, что запредельные нагрузки можно переносить, если четко действует система восстановления функций спортсмена, система реабилитации. Будучи глубоко образованным специалистом, Григорий Исаевич прекрасно понимал

роль восстановительных процессов при тренировке бегуна. Он скрупулезно заботился о быте, отдыхе спортсменов, их питании, сне, обуви, бане, витаминах. «Умелая, направленная, точно дозированная реабилитация открывает перед спортсменом огромные перспективы», считал Никифоров. Любители бега до сих пор помнят спортивные подвиги на легкоатлетических аренах мира воспитанников Григория Исаевича: Владимира Куца, Петра Болотникова, Алексея Десятчикова, Ивана Филина, Сергея Попова, Ивана Чернявского, Александра Артынюка, Хуберта Пярнакиви, Евгения Жукова. Так Никифоров делом ответил на возникшие в те далекие годы разговоры о необратимых последствиях, которые якобы имеют место при сверхнагрузках на организм спортсмена.

Позднее австралийский тренер Перси Черутти, подготовивший Олимпийского Чемпиона в беге на 1500 м Герберта Эллиота скажет: «Мы учились у Никифорова и Куца». Известный новозеландский тренер Артур Лидьяр также осознавал свою тренерскую работу со своими учениками Питером Снеллом и Мюрреем Халбергом, ставшими Олимпийскими Чемпионами в 1960 году в Риме, как цепь в системе, основанной Никифоровым. Под выносливостью Григорий Исаевич понимал способность не только терпеть, переносить нагрузки на тренировках соревнованиях, но и способность восстанавливаться в ходе работы.

Позднее эти взгляды были обобщены известным ученым в области теории спорта Владимиром Кузнецовым – нашим известным копьеметателем, Чемпионом СССР и рекордсменом мира. Им впервые целенаправленно изучались закономерности активного функционирования всех систем организма здорового человека в условиях максимально предельных физических напряжений. Фактически В.В Кузнецов с сотрудниками изучали влияние энтропийных факторов, вызванных сверхмаксимальными физическими нагрузками, на организм спортсменов высшей квалификации. Им предложено эту отрасль знаний о максимальных нагрузках, приводящих к гипоксии, но нивелируемых направленным восстановлением и передачей энтропии организмом спортсмена вовне, именовать как «антропомаксималогия». Из представленных выше подсистем подготовки высококвалифициро-

ванных спортсменов (наряду с методами спортивной тренировки и соревнований) важное место занимают принципы направленного восстановления, их связи с модельными характеристиками, раскрывающими особенности и необходимый уровень специальных физических качеств, совершенствования технической, тактической, психологической подготовленности. При этом предполагается использование средств активного и пассивного воздействия на спортсмена. К пассивным средствам относятся: специализированное питание, физиотерапевтические процедуры, комплекс фармацевтических средств, иглоукалывание, баротерапия, парная баня, электростимуляция, водные процедуры, гидромассаж, сон. Активными средствами являются: вариативность тренировочной нагрузки, разнонаправленность средств общей физической подготовки, психорегулирующая тренировка. Последняя (в отличие от сна) способствует более интенсивному избавлению от последствий тренировочных перегрузок. Иногда комната для отдыха спортсменов совмещает в себе функции помещения для проведения психорегулирующих тренировок.

Одним из факторов, оказывающим эффективное воздействие на восстановление спортсмена, является включение в рацион питания настоев, травяных чаев, отваров, сиропов. Они содержат терпены, эфирные, жирные масла, природные окрашенные вещества, простогландины, витамины. Следует учитывать при этом, что вода для чаев, отваров не должна содержать вредных компонентов (солей тяжелых металлов, солей жесткости, избытка хлора, бактерий). Можно полагать, что напитки, включающие синтетические компоненты (красители, консерванты, стабилизаторы), малопригодны для восстановления сил спортсменов.

Позволим себе также отметить следующий фактор положительного влияния длительного бега и околопредельных беговых нагрузок (наряду со способностью сердечной мышцы, дыхательной и кровеносной систем) переносить «гибельный» недостаток кислорода. Для сокращения мышцы необходим нервный импульс. Поэтому к каждому мышечному волокну подходят окончания «двигательного» нерва. Сами же нервные клетки, называемые мотонейронами, регулирующие различные мышечные сокращения, находятся в спинном и головном мозге. От каждого

двигательного нейрона идут ответвления к различному числу мышечных волокон. Нервная клетка и все мышечные волокна, которые управляют ею, получили название двигательной единицы. Одна нервная клетка может управлять различным количеством мышечных волокон.

В результате регулярных физических нагрузок в мышечной системе происходит определенное и значительное изменение: увеличивается объем и размер самих мышечных волокон и в целом всей мышцы. При этом утолщение мышечных волокон происходит за счет увеличения несократительной части волокна (саркоплазмы), а также за счет увеличения миофибрилл (сократительного аппарата мышечных волокон).

Установлено, что мозг регулирует деятельность мышцы в зависимости от того, какую силу она должна развить. Нервная система вначале на уровне двигательного нерва не может быть пассивной по отношению к увеличению массы и размера мышечного волокна. Откликом на это может быть постепенный рост количества мотонейронов (синтез нервных клеток) в мозге, чтобы обеспечить эффективное сокращение увеличенных мышечных волокон. Следовательно, при циклических упражнениях (беге, ходьбе, лыжах, плавании) может наблюдаться увеличение числа нейронов в мозге, хотя до сих пор главенствующим фактором было мнение, что с возрастом число нейронов постоянно уменьшается. Подобный «дополнительный синтез» нервных клеток обеспечивает не только «управление» вновь возникшими мышечными волокнами, но ведет к укреплению психологического здоровья, в том числе с активизации умственной деятельности человека. Вполне закономерным поэтому является то, что олимпийские Чемпионы гребца Юрий Тюкалов, штангист Юрий Власов, боксеры Геннадий Шатков и Валерий Попенченко достигли огромных успехов в искусстве, литературе, науке после завершения спортивной карьеры.

Аккумулятивная функция.

В большинстве биологических мембран содержатся ферменты, белки, витамины, терпены, фосфолипиды, сфинголипиды, стероид, а также ферментные комплексы и метаболиты, обеспечивающие важнейшие метаболические процессы. На биомембра-

нах происходит формирование градиентов электрического потенциала, а также для осуществления энерготрансформирующих реакций в клетке. Трансформация и аккумуляция энергии протекает в специализированных мембранах. В таких мембранах возможна трансформация электрической и осмотической форм энергии в энергию макроэргической фосфатной связи АТФ.

Как отмечено выше, универсальным показателем, определяющим качество связей в любой системе, является энтропия S , т.е. возрастание неупорядоченности системы. В случае замкнутых систем, изолированных от внешней среды, энтропия быстро перераспределяется внутри себя и приходит в равновесие. Однако, реальные системы открыты и при совершении работы техническими приборами (музыкальный центр, кондиционер, телевизор) часть энергии рассеивается, т.е. энтропия передается вовне. В рассматриваемом случае энтропийными факторами (шумами), во-первых, выступают появившиеся в воздухе (при длительной работе электроприборов или при скоплениях людей в замкнутых помещениях) микроорганизмы и бактерии. При этом будет нарушаться внутриклеточный гомеостаз, запасание энергии в клетке. Во-вторых, накопление положительно заряженных аэроионов в воздухе помещений на клеточном уровне (из-за «сжигания» кислорода в воздухе) несет болезни дыхательной и кроветворной систем. Это ионы-убийцы, на что впервые в 20-е годы прошлого столетия указал профессор Александр Леонидович Чижевский. Для уменьшения энтропии, вызываемой накоплением положительных аэроионов, делающих воздух «мертвым», необходимо провести работу по их уничтожению. Для этих целей Чижевский создал первую в мире электроэффлювиальную люстру (точнее аэроионизатор), дающую мощные потоки отрицательно заряженных целебных аэроионов. Поток отрицательных аэроионов от «Люстры Чижевского» нейтрализует смертоносный «положительный» ионный смог, делает воздух в закрытых помещениях идентичным (по содержанию отрицательных аэроионов) лесному и морскому воздуху, а в ряде случаев – воздуху горных курортов или воздуху после грозы. Следствием этого является то, что потерявшие свой заряд клетки и мембранные слои, вновь восстанавливают электрический заряд мембран (который необходим

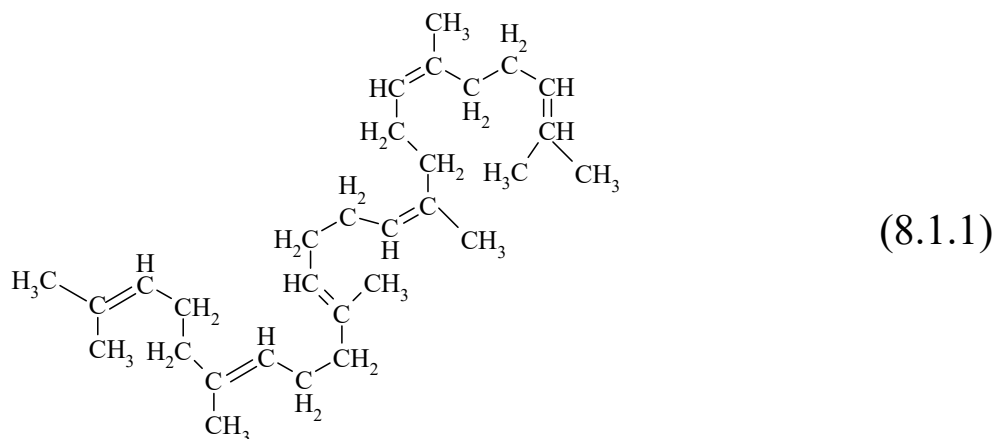
для аккумулятивной функции органов дыхания, нервной и сердечно-сосудистой систем).

Фотосинтезирующие мембраны трансформируют энергию света в энергию восстановленных соединений – углеводов – основного химического источника энергии для гетеротрофных организмов. В связи с наличием в мембранах специфических белковых рецепторов клетки воспринимают внешние сигналы и в ответ на них перестраивают свой обмен веществ. В известной мере, аккумулятивная функция противоречит транспортной функции фосфолипидов.

Глава 8. Выделение и определение фосфолипидов в растительном сырье

8.1. Определение сквалена в растительных маслах

Сквален – бесцветная вязкая жидкость, легко растворяется в ацетоне, эфире; плохо – в холодном этаноле и уксусной кислоте; не растворяется в воде. Природный сквален – полностью транс-изомер, является промежуточным соединением в биосинтезе холестерина и других стерина, играет важную роль в обмене веществ:



Сквален выделяют из неомыляемой фракции жиров действием HCl в ацетоне или диэтиловом эфире при -5°C . При гидрировании сквалена образуется сквалан, который применяют как неподвижную фазу в газожидкостной хроматографии, высококачественное смазочное масло, компонент некоторых фармацевтических препаратов.

Количество сквалена – важный критерий фармакотерапевтической активности масла, поэтому определение содержания его в различных растительных маслах необходимо. Одна из методик связана с тонкослойной хроматографией (ТСХ), отличительными чертами которой являются простота, экспрессность, доступность, чувствительность.

Наиболее четкие и контрастные хроматографические зоны получаются на пластинках Плазмахром и Сорбфил (табл. 8.1.1) при использовании в качестве наименее полярного растворителя – декана. Проявляющим реагентом служит 5% фосфорномолибденовая кислота (в спирте), обеспечивающая высокую контраст-

ность и длительную сохранность интенсивности хроматографических зон.

Таблица 8.1.1. Характеристика тонкослойных пластин для ТСХ сквалена из растительных масел

Название пластины	Размер, см x см	Неподвижная фаза	Подложка	Дисперсия пятна σ_x/σ_y , см
Silufol	5 x 15	Силикагель	Алюминиевая фольга	0,8 / 0,9
Сорбфил	10 x 10	Силикагель	Пластик	0,7 / 0,8
Армсорб	10 x 20	Силикагель	Алюминиевая фольга	0,5 / 1,0
Плазмахром	10 x 10	Силикагель	Пластик	0,5 / 0,5
Shliecher Schull	15 x 15	Полиамид	Пластик	0,7 / 0,7

Таблица 8.1.2. Элюирующие системы для разделения сквалена на пластинках Silufol

Состав системы	Полярность R_n	R_f
Гептан – бензол (9:1)	2,64	0,90
Гептан	1,44	0,75
Изооктан	0,32	0,74
Декан	0	0,56

Количественный анализ сквалена проводится с использованием программы Sorbfil Videodensitometer после предварительного компьютерного сканирования пластины на типовом планшетном сканере. Для этого предварительно получают хроматограммы серии стандартных растворов сквалена с концентрациями 0,0016; 0,0050; 0,0084; 0,011; 0,0168; 0,0252 моль/л в рассматриваемых системах.

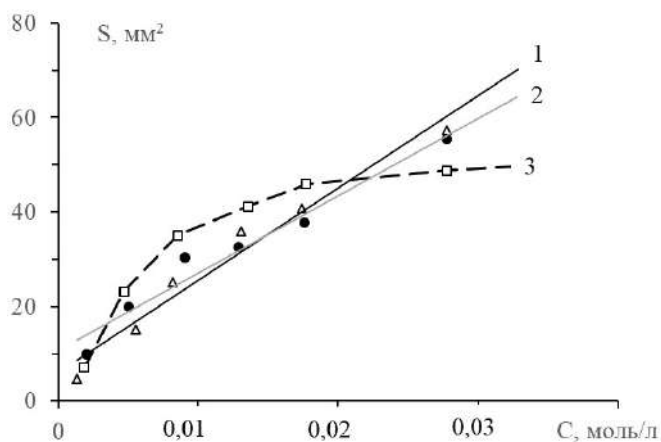


Рис. 8.1.1 Градуировочные зависимости для определения сквалена методом ТСХ: 1 – гептен; 2 – декан; 3 – изооктан.

По полученным данным строится градуировочный график по площади пятен от концентрации. В системе с деканом и плазматроном наблюдается удовлетворительная линейная зависимость (кривая 2, рис. 8.1.1) размера пятна от концентрации сквалена в выбранном диапазоне концентраций $S=1890C+11$, со степенью аппроксимации $R^2=0,9822$.

С использованной методикой были проанализированы широко используемые в пищевой и фармацевтической промышленности хлопковое, амарантовое, репейное, облепиховое масла и масло из семян грейпфрута (табл. 8.1.3). Данные табл. 8.1.3 указывают на перспективность выделения сквалена из амарантового масла.

Таблица 8.1.3. Содержание сквалена в различных растительных маслах

Вид масла	Содержание сквалена, %
Хлопковое масло	$0,99 \pm 0,05$
Амарантовое масло	$4,41 \pm 0,22$
Масло из семян грейпфрута	$0,65 \pm 0,03$
Облепиховое масло	$0,84 \pm 0,04$
Репейное масло	$1,25 \pm 0,06$

8.2. Выделение фосфолипидных концентратов из семян масличных культур и их исследование методом ТСХ [3, 20, 28, 70, 128, 203]

Фосфолипиды (ФЛ) в семенах масличных культур условно подразделяются на свободные и связанные. Для их выделения используют отличающиеся друг от друга приемы. Выделение свободных фосфолипидов осуществляют из измельченных и подсушенных в вакуумном шкафу в течение трех часов семян настаиванием с диэтиловым эфиром в соотношении 300 мл эфира на 50 г семян течение 1,5 часов. После этого осадок отделяют фильтрованием от экстрагента и фильтрат упаривают на роторном испарителе. Полученную фракцию заливают 20 мл хлороформа, добавляют 150 мл ацетона и помещают на 18-20 часов в холодильник при температуре 5°C . Образовавшийся осадок фильтруют, получая фракцию свободных фосфолипидов.

Для выделения связанных ФЛ обезжиренный осадок освобождают от остатков диэтилового эфира выдерживанием в вакууме

в течение 1 часа. После этого берут навеску 25 г и подвергают настаиванию в 150 мл смеси хлороформ – этиловый спирт (в соотношении 2:3) в колбе при температуре 20°C в затемненном месте. Содержимое колбы взбалтывают в течение 1,5 часов и фильтруют через пористый фильтр №4. Исходный материал еще дважды обрабатывают 150 мл растворителя в течение 1 часа при взбалтывании на встряхивателе. После третьей экстракции остаток на фильтре трижды промывают смесью хлороформ-этанол по 25 мл.

Фильтраты от трех экстракций выдерживают при 4°C для освобождения от большей части углеводов. Выпавшие кристаллы углеводов отделяют фильтрацией. Раствор упаривают досуха и дважды обрабатывают диэтиловым эфиром по 10 мл, а затем дважды по 5 мл хлороформом. Диэтиловые и хлороформные фракции экстрагентов объединяют, промывают водой (20% по объему) для удаления водорастворимых примесей и упаривают досуха. При этом получают фракцию «сырых» фосфолипидов. «Сырые» ФЛ растворяют в 20 мл хлороформа и обрабатывают 10-кратным объемом ацетона, выдерживают в течение 14-16 часов при температуре 10°C. Осадок фильтруют, промывают трижды охлажденным ацетоном по 10 мл, растворяют в хлороформе, упаривают и сушат в вакуумном шкафу при 40-45°C до постоянной массы. Полученный фосфолипидный концентрат не содержит нейтральных липидов.

Выделение фосфолипидного концентрата непосредственно из подсолнечного масла проводят следующим способом. К 50 мл масла добавляют 10 мл хлороформа, обрабатывают 150 мл холодного ацетона и помещают в холодильник на 16-18 часов при температуре 5°C. Образовавшийся на дне колбы осадок фильтруют.

В связи с тем, что большинство выделенных фосфолипидных концентратов получалось в виде осадков на фильтрах, растворы ФЛ для анализа готовят, помещая эти мелко нарезанные фильтры в 30 мл хлороформа. После полного растворения осадка хлороформе, фильтры из раствора удаляют. Концентрация ФЛ в растворах для анализа методами ТСХ, УФ- и ИК-спектроскопии со-

ставляет 30-11 мг/мл (в зависимости от образца). Объем наносимой пробы – 1 мкл.

В методе ТСХ для анализа ФЛ неподвижная фаза тонким слоем (100-300 мкм) наносится на металлическую, стеклянную или пластмассовую пластинку. В качестве неподвижной фазы используют оксид алюминия, силикагель, полиамиды, кизельгур, декстрины. На линию старта (1,5-2,0 см от края пластинки) наносится анализируемая смесь ФЛ в виде малого пятна, а также стандартные вещества. Для этого используют микропипетки, капилляры или микрошприцы. Затем пластинку в герметичной камере погружают в растворитель, выполняющий роль подвижной фазы. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента до финиша и с разной скоростью переносит ФЛ, что приводит к их разделению. Выбор системы растворителей для разделения ФЛ методом ТСХ зависит от типа масляных культур, а также от полярности элюирующих систем (табл. 8.2.1).

Таблица 8.2.1. Полярность элюирующих систем, используемых для разделения ФЛ методом ТСХ.

№	Системы	Соотношение растворителей	Полярность
1	Хлороформ – ацетон – метанол – уксусная кислота	8:4:2:2:1	8,33
2	Хлороформ – метанол	19,5:7,5	4,94
3	Хлороформ – метанол	19:9	5,04
4	Хлороформ – метанол - вода	19,5:7,5:0,5	5,01
5	Хлороформ – метанол – уксусная кислота	19,5:7,5:0,5	4,96
6	Хлороформ – метанол – уксусная кислота - вода	50:5:8:4	5,35
7	Хлороформ – ацетон - метанол – уксусная кислота - вода	12:6:3:3:1	

Элюенты готовят смешиванием компонентов в указанных в табл.8.2.1 соотношениях непосредственно перед использованием.

Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений в ТСХ является величина $R_f = x/y$ – отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x) к расстоянию (y), пройденному растворителем от линии старта до финиша. Величина R_f является характеристикой природы опреде-

ляемого соединения и зависит от сорбента и растворителя, используемых для разделения (рис. 8.2.1).

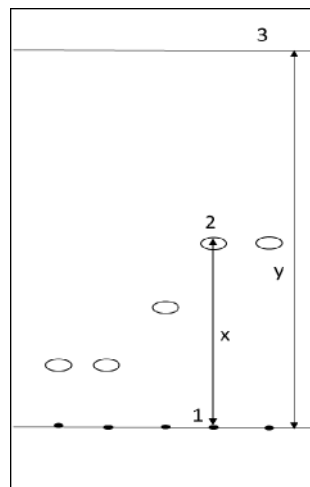


Рис. 8.2.1. Определение R_f на тонкослойной хроматограмме: 1 – линия старта; 2 – хроматографическая зона; 3 – фронт растворителя.

Для надежности идентификации веществ при определении R_f используют «свидетели». Для этого на пластинке вместе с разделяемой смесью веществ хроматографируют стандартные вещества («свидетели», метчики).

Правильный выбор сорбента и подвижной фазы определяет эффективность (полноту) разделения. Подбор хроматографической системы обуславливается природой анализируемой смеси. Например, насыщенные углеводороды сорбируются в очень малой степени и поэтому движутся в сорбенте с более высокой скоростью. Ненасыщенные углеводороды сорбируются тем сильнее, чем больше в них содержится двойных связей. Для разделения следует использовать наиболее активные сорбенты малополярные растворители.

Для органических веществ, содержащих разные функциональные группы, адсорбционное сродство повышается в следующем ряду: алканы > алкены > арены > простые эфиры > сложные эфиры > кетоны > альдегиды > спирты > амиды > диолы > карбоновые кислоты > полифункциональные соединения. Это приводит к тому, что на слоях силикагеля или окиси алюминия при применении в качестве растворителя, например, бензола, простые или сложные эфиры располагаются в верхней части хроматограммы, кетоны и альдегиды – примерно в середине, спирты –

ближе к линии старта, а кислоты остаются на старте. Отличия от указанного порядка могут быть связаны с сильной разницей в молекулярной массе или в структуре углеродного скелета.

Идентификацию веществ (качественный анализ) проводят в первую очередь по равенству значений R_f анализируемого вещества и стандарта («свидетеля»), а также по цветной реакции, присущей искомому компоненту.

Параметры эффективности и селективности рассчитывают по следующим формулам:

$$N = 16 (l'/w)^2, \quad (8.2.1)$$

где N – число теоретических тарелок; l' – расстояние от стартовой линии до нижней границы пятна, образованного зоной этого вещества; w – расстояние от нижней до верхней границы того же пятна.

$$H = \frac{l'}{N} = \frac{w^2}{16l'}, \quad (8.2.2)$$

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке.

$$\alpha = \frac{(1/R_{f1} - 1)}{(1/R_{f2} - 1)} \quad (8.2.3)$$

где α – коэффициент селективности; R_{f1} и R_{f2} – значения R_f , соответствующие двум компонентам смеси с большей и меньшей величиной R_f , соответственно.

$$R_s = \sqrt{N} \cdot \frac{R_{f1} - R_{f2}}{\sqrt{R_{f1}} - \sqrt{R_{f2}}} \quad (8.2.4)$$

где R_s – разрешение, т.е. величина, характеризующая качество разделения.

$$D = \frac{C_{H\Phi}}{C_{П\Phi}} \quad (8.2.5)$$

где D – коэффициент распределения; $C_{H\Phi}$, $C_{П\Phi}$ – концентрации вещества в неподвижной фазе подвижной фазе, соответственно.

$$K = \frac{C_{H\Phi} \cdot V_{H\Phi}}{C_{П\Phi} \cdot V_{П\Phi}} \quad (8.2.6)$$

где $V_{НФ}$, $V_{ПФ}$ – объемы неподвижной и подвижной фаз, соответственно.

В качестве проявителей используют фосфорномолибденовую кислоту, нингидрин, родамин. В качестве стандартного вещества применяют лецитин фирмы Biomedical, основными компонентами которого являются фосфатидилхолин (ФХ) (21%), фосфатидилэтаноламин (23%) и фосфатидилинозитол (19%). Кроме того, в состав лецитина входят лизофосфатидилхолин, фосфатидные кислоты, фосфатидилсерин.

В качестве определяемого вещества выбирают ФХ, так как он присутствует во всех маслах (в том числе в подсолнечном) и является одним из основных компонентов фосфолипидных концентрата и экстрактов. Эффективность различных систем растворителей при определении ФХ проводили с учетом R_f ; K ; H , мм; N (табл. 8.2.2).

Таблица 8.2.2. Параметры хроматографирования, характеризующие эффективность различных систем растворителей при определении фосфатидилхолина.

№	Система	R_f	K	H , мм	N
1	Хлороформ – ацетон – метанол – уксусная кислота (8:4:2:2:1)	0,49	1,04	0,10	830,00
2	Хлороформ – метанол (19,5:7,5)	0,24	3,17	0,50	150,00
3	Хлороформ – метанол (19:9)	0,25	3,00	0,45	175,56
4	Хлороформ – метанол – вода (19,5:7,5:0,5)	0,21	3,76	0,42	169,05
5	Хлороформ – метанол – уксусная кислота (19,5:7,5:0,5)	0,43	133	0,24	366,67
6	Хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода (50:5:8:4)	0,56	0,79	0,22	463,64

Из табл. 8.2.2 и рис. 8.2.2 следует, что системы № 2, 3, 5 не подходят для разделения фосфолипидов подсолнечного масла, так как многие компоненты (особенно фосфатидилхолин) остаются в нижней части хроматограммы и плохо разделяются. Данные табл. 8.2.2 свидетельствуют, что самые высокие значения числа теоретических тарелок (a , следовательно, и самые низкие значения ВЭТТ) наблюдаются в системах №1 и №2. В системе №1 не все компоненты лецитина (их семь) разделяются. Поэтому самой оптимальной системой для определения фосфолипидов подсолнечного концентрата является система №6.




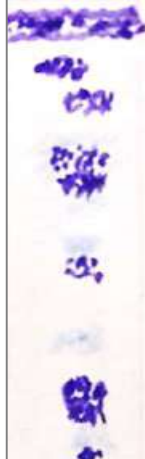


	Хлороформ – ацетон – метанол – уксусная кислота (8:4:2:2:1)	Хлороформ – метанол (19,5:7,5)	Хлороформ – метанол (19:9)	Хлороформ – метанол – вода (19,5:7,5:0, 5)	Хлороформ – метанол – уксусная кислота (19,5:7,5:0, 5)	Хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода (50:5:8:4)
№	1	2	3	4	5	6
Хромато- граммы						

Рис. 8.2.2. Хроматограммы стандартного вещества лецитина в различных системах

Для количественного анализа ФЛ в растворах фосфолипидных концентратов, полученных экстракцией смесью хлороформ : этанол из очищенных (1) и неочищенных (2) семян подсолнечника; растворов свободных ФЛ из очищенных (3) и неочищенных (4) семян; растворов связанных ФЛ из очищенных (5) и неочищенных (6) семян, а также фосфолипидного концентрата из масла (7) предварительно проводят количественный анализ стандартного образца ФЭА, ФИ и фосфатидилхолина. Готовят серию стандартных растворов с концентрациями 1,42; 2,84; 4,25; 5,67 мг/мл. Пробы наносят на пластину в объеме 1 мкл.

Из рис. 8.2.3 следует, что градуировочный график практически линеен и величина аппроксимации больше 99%. Следовательно, в выбранных условиях количественное определение определения ФЭА, ФИ и фосфатидилхолина возможно.

Предварительно получают значения R_f в выбранной системе растворителей сравнивают с литературными источниками (табл. 8.2.3). Практически все ФЛ имеют значения R_f близкие к R_f , приведенным Н.С. Арутюняном и Е.П. Корненой. Для обнаружения

ФЛ используют фосфорномолибденовую кислоту, нингидрин, родамин 6Ж, реагент Драгендорфа.

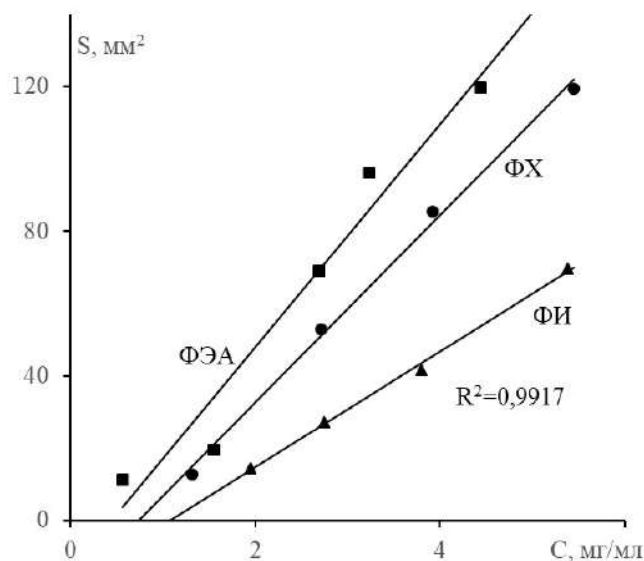


Рис. 8.2.3. Градуировочный график для определения ФЭА, ФИ и фосфатидилхолина методом ТСХ.

Таблица 8.2.3. Значения R_f фосфолипидов подсолнечных масел.

Фосфолипид	R_f	
	Литер.	Практ.
Лизофосфатидилхолин	0,10	0,14
Лизофосфатидилэтаноламин	0,22	0,20
Фосфатидилинозитол	0,31	0,31
Фосфатидилхолин	0,55	0,54
Фосфатидилсерин	0,66	0,67
фосфатидилэтаноламин	0,83	0,83
Примеси нейтральных липидов	-	0,95-1,00

Для количественной интерпретации данных ТСХ используют специальные сканирующие денситометрические устройства. Однако возможно применение типовых планшетных сканеров, сопряженных с персональным компьютером, оснащенным программами обработки изображений, например, Photoshop и Sorbfil Videodensitimeter. Сразу же после проявления хроматографических зон пластины сканируют на сканере, а полученные изображения обрабатывают компьютерной программой Sorbfil Videodensitimeter. Принцип работы программы состоит в построении аналоговой кривой хроматограммы по отклонению яр-

кости пятен от яркости фона с последующим нахождением пиков на этой кривой и расчетом их площади. В результате получают треки в координатах R_f - интенсивность (рис. 8.2.4). Максимум на кривой соответствует центру зоны, площадь под кривой – площади пятна, а высота пика – интенсивности хроматографической зоны.

Следует отметить, что расчет R_f с помощью специальной программы дает более точные результаты, поскольку в данном случае центром пятна считается область с максимальной интенсивностью окрашивания. В случае размытых зон неправильной формы такое определение центра является более точным, чем при визуальной оценке, так как истинный центр зоны неправильной формы не совпадает с геометрическим. Кроме того, видимый размер пятна почти вдвое меньше его фактической площади.

Градуировочные графики, полученные по данной методике, сопоставлялись с графиками, полученными с помощью специализированного сканирующего устройства «Shimadzu CS 9000». Показано, что результаты количественной оценки, полученные в обоих случаях не превышают принятых нормативов воспроизводимости, характерных для рутинных методик ТСХ [30].

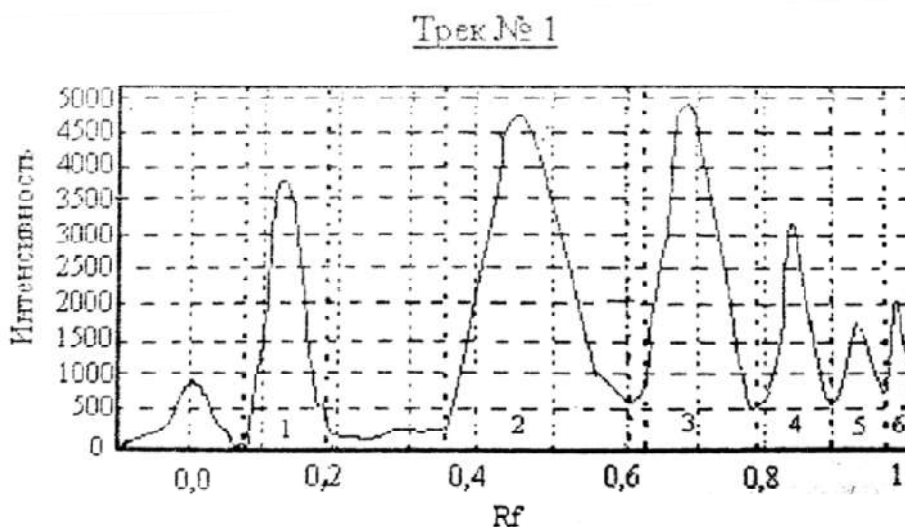


Рис. 8.2.4. Аналоговая кривая раствора лецитина в хлороформе ($C=2,19$ мг/мл), полученная в оболочке программы Sorbfil Videodensitimeter после обработки сканированной ТСХ.

В приведенных выше условиях анализировались водно-спиртовые экстракты из семян подсолнечника на содержание фосфолипидов (табл. 8.2.4).

Таблица 8.2.4. Качественный и количественный состав экстрактов з семян подсолнечника на содержание фосфолипидов.

ФЛ	R _f	Содержание ФЛ в образце						
		1	2	3	4	5	6	7
ЛФХ	0,14	-	4,8	-	9,0	+	+	5,4
ЛФЭА	0,20	-	+	-	3,5	+	+	-
ФИ	0,31		+	-	14,7	+	+	+
ФХ	0,54	34,8	21,3	3,9	37,9	+	31,4	36,1
ФС	0,67	15,4	-	-	5,4	-	22,5	23,7
ФЭА	0,83	-	-	-	5,3	-	5,8	30,1
Примеси НЛ	0,95- 1,00	47,6	65,2	89,9	16,9	89,4	29,6	4,7

Примечания к табл. 8.2.4.

I. Экстракты хлороформ: этанол из семян подсолнечника 1 – из очищенных семян; 2 – из неочищенных семян; 3 – из р-ров свободных ФЛ (очищенных); 4 – из р-ров свободных ФЛ (неочищенных); 5 - из р-ров связанных ФЛ (очищенных); 6 – из р-ров связанных ФЛ (неочищенных); 7 – из фосфолипидного концентрата масла.

II. Знак (+) означает, что пятна соответствующих ФЛ определяется визуально, но в связи с большой погрешностью программы невозможно установить точный процентный состав ФЛ;

III. Знак *означает, что пятно, характеризующее ФЛ, обнаружено визуально, но ввиду его малой площади провести количественный анализ не удастся.

IV. Следует помнить, что величина R_f достаточно лабильна, она может меняться в зависимости от температуры, влажности, типа камеры, качества пластины, но относительный порядок элюирования, последовательность сохраняется (табл. 8.2.5):

Таблица 8.2.5. Параметры удерживания фосфолипидов типовых условиях ТСХ.

Группа фосфолипидов	элюент	Величина R _f
Лизофосфатидилхолины	Хлороформ – метанол – вода (19,5:7,5:0,5)	0,06-0,07
Фосфатидилинозитолы		0,15-0,16
Фосфатидилхолины		0,20-0,22
Фосфатидилсерины		0,30-0,33
Фосфатидилэтаноламины		0,38-0,42
Фосфатидилглицерины		0,54-0,57
Фосфатидные кислоты		0,82-0,84
Нейтральные липиды		0,94-0,96

Из табл. 8.2.5 следует, что в фосфолипидном концентрате масла, получаемого методом горячего прессования из очищенных семян (образца 7), находится больше ФЛ, чем в концентрате сво-

бодных липидов (образцы 3 и 4). Это может быть связано с разрушением комплексов ФЛ с белками при высокой температуре и переходе ФЛ в свободное состояние. Кроме того, на хроматограммах образцов очищенных семян и в фосфолипидном концентрате масла отсутствует лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭА).

8.3. Выделение фосфолипидного комплекса семян амаранта [81]

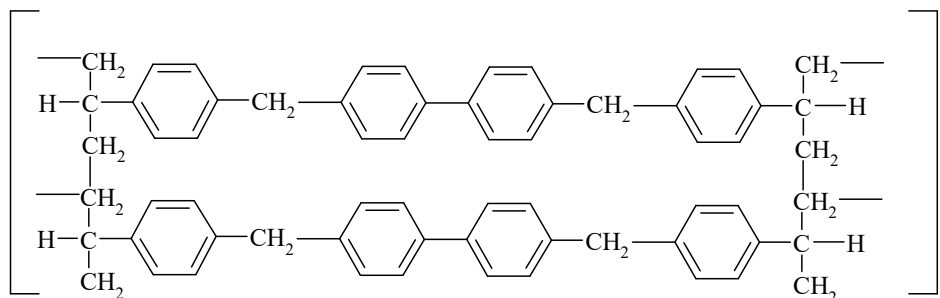
Для выделения фосфолипидного комплекса (ФЛК) из семян амаранта применяется экстракция. В качестве экстрагентов использованы растворители метанол марки х.ч. (ГОСТ 6995-77), хлороформ технический (ГОСТ 200015), ацетон марки х.ч. (ГОСТ 2603). Непосредственно перед проведением экстракции растворители перегоняют для удаления из них перекисей, которые способны окислять липиды.

Навеску амарантового масла массой 10 г растворяют в 150 мл смеси хлороформ – метанол (1:2), прибавляют 50 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Хлороформный и водно-метанольный слои разделяли на делительной воронке, чтобы водорастворимые примеси перешли в водно-метанольный слой, а в хлороформном слое остались свободные от примесей липиды [105].

Отделение фосфолипидов от нейтральных липидов проводят при добавлении к хлороформному экстракту семикратного количества ацетона, полученную смесь перемешивали на механическом встряхивателе в течение 1 часа и выдерживали 72 часа при $t=5^{\circ}\text{C}$ в затемненном месте. При этом фосфолипиды остаются в осадке, ди-, моно-, триглицериды и другие нейтральные липиды концентрируются в ацетоне. Выпавший осадок ФЛ отделяют фильтрацией и высушивают под вакуумом при 30°C . Полученный таким образом фосфолипидный комплекс масла семян амаранта сразу же растворяют в хлороформ, очищенном от перекисей [81, 105, 205].

Фракционирование ФЛК проводят методом колоночной хроматографии с использованием в качестве сорбента неионогенный макропористый сорбент Стиросорб (1-МХДЭх100), который по-

лучают сшиванием цепей полистирола бифункциональным кросс-агентом монохлордиметилловым эфиром:



Степень сшивки сорбента Стиросорб 1-МХДЭх100 составляет 100%, что позволяет считать его «сверхсшитым». При набухании Стиросорб значительно увеличивает объем и проявляет свойства макропористого сорбента, селективно поглощающего органические вещества [146, 47, 148, 168, 188, 262, 263].

Сорбцию фосфатилхолина проводят из его раствора в 96% этаноле. Для проведения эксперимента навеску сорбента Стиросорб в 1,000 г заливают 20-кратным избытком (20 см^3) спиртового раствора ФХ с концентрацией 3 мг/мл и выдерживают 72 часа при 5°C для установления равновесия в системе. После этого раствор декантируют с сорбента и анализируют на содержание ФХ методом УФ-спектрофотометрии.

Количество сорбированного вещества рассчитывают по разнице его содержания до и после контакта с сорбентом по формуле:

$$Q_C = Q_O - Q_P = C_O \cdot V = (C_O - C) \cdot V; \quad (8.3.1)$$

где Q_C - количество сорбированного ФХ, мг; Q_O - количество ФХ в исходном растворе, мг; Q_P - количество ФХ в растворе после контакта с сорбентом, мг; V - объем раствора ФХ, приведенного в контакт с сорбентом, мг; C_O , C - концентрация ФХ в растворе до и после контакта с сорбентом, мг/см³.

Для упрощения расчетов можно перейти к пропорциональным оптической плотности величинам – градуировочным коэффициентам (k). Подставив в уравнение (8.3.1) величины концентраций, выраженные через оптическую плотность, получают формулу (8.3.2) для расчета количества сорбированного вещества:

$$Q_C = (A_O \cdot k - A \cdot k) \cdot V = (A_O - A) \cdot k \cdot V; \quad (8.3.2)$$

где A_O , A – оптические плотности исходного раствора ФХ и после сорбции соответственно; k – градуировочный коэффициент.

Емкость сорбента рассчитывают по соотношению:

$$E = Q_C / m_C; \quad (8.3.3)$$

где m_C – масса сорбента, г.

Объединив уравнения (8.3.2) и (8.3.3), получаем:

$$E = (A_O - A) \cdot k \cdot V / m_C;$$

Подставив значения $V=20$ и $m_C=1$, приходим к окончательной формуле (8.3.4) для расчетов:

$$E = (A_O - A) \cdot k \cdot 20 \quad (8.3.4)$$

Емкость сорбента выражают мг/г или моль/г. Для Стиросорба МХДЭх100 емкость по ФХ оказалась равной 39,0 мг/г.

Построение изотерм сорбции ФХ проводят методом переменных концентраций. Каждая серия состоит из семи растворов с концентрациями 1-50 мг/см³; 2-25 мг/см³; 3-12,5 мг/см³; 4-6,25 мг/см³; 5-3,12 мг/см³; 6-1,56 мг/см³; 7-0,78 мг/см³. Навески подготовленного к работе сорбента по 0,100 г заливают 3 мл спиртового раствора ФЛ соответствующей концентрации и выдерживают полученные смеси в течение 72 час. при - 5°C до установления равновесия. После завершения эксперимента сорбент отфильтровывают и измеряют оптическую плотность фильтратов. По формулам (8.3.2) и (8.3.4) рассчитывают данные для построения изотерм сорбции (рис. 8.3.1)

Отфильтрованные сорбенты высушивают при 105°C, растирают в агатовой ступке, сушат под вакуумом при 105°C, берут по 1,5 мг ФХ и по 150 мг KBr, смешивают в агатовой ступке, отвешивают по 100 мг для приготовления таблеток в пресс-форме, устанавливают давление 150 атм и прессуют до получения однородной прозрачной таблетки. ИК-спектры снимают в области 4000-400 см⁻¹. Отнесение полос поглощения проводят в сравнении с ИК-спектром стандарта, ИК-спектрами воздушно-сухих сорбентов и данными литературы [8, 39, 47, 77, 97, 108, 110, 122,

137, 139, 156-158, 161, 168, 231, 232, 245-249, 257] (табл. 8.3.1; рис. 8.3.3).

На ИК-спектрах Стиросорба МХДЭх100, насыщенного ФХ выделяется группа полос 3599-3259 см^{-1} , характеризующих участие H_2O в образовании ассоциатов с четырьмя диполями фосфолипидов [8]. Об этом же свидетельствует наличие деформационных колебаний при 1653, 1603 см^{-1} ; 1247-1172 см^{-1} и 885 см^{-1} . Образование ассоциатов сопровождается изменениями структуры растворителя, вызванных образованием новых водородных связей «вода-вода»; «вода-кетонная группа»; «вода-фосфатная группа» [8, 110] с различной энергией взаимодействия в аквакомплексах. Наличие максимумов при 3005-2852 см^{-1} ; 969 см^{-1} и 817-740 см^{-1} характерно для колебаний CH , CH_2 и CH_3 -групп в алкил- и арилзамещенных группировках ФХ и сорбента [110, 137, 139, 157, 161, 248]. В ИК-спектрах четко фиксируется участие фосфатных групп в образовании водородных связей (максимумы 3259; 2385; 1653; 1603; 1491; 1454; 1247-1072; 1089-1060 см^{-1}) [137, 139, 174, 110] (табл.9.1).

Таким образом, приведенные данные рис. 8.3.1 и 8.3.3 свидетельствуют о полифункциональных взаимодействиях в системе «ФХ - Стиросорб МХДЭх100». Важным параметром, характеризующим селективность сорбции, является коэффициент распределения K :

$$K = Q_C / Q_P \quad (8.3.5)$$

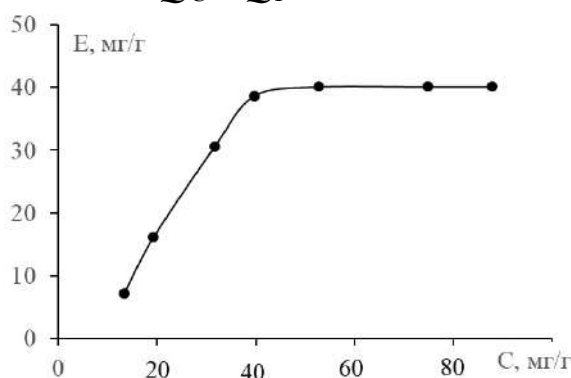


Рис. 8.3.1. Изотерма сорбции ФХ на сорбенте Стирасорб МХДЭх100.

Сорбция фосфатидилхолина на сорбенте МХДЭх100 растет в области концентраций от 10 до 40 мг/см^3 пропорционально со-

держанию фосфолипида в растворе, далее от 40 до 90 мг/см³ выходит на плато. Ход изотерм соответствует уравнению Ленгмюра. Из рис. 8.3.2 следует, что в интервале концентраций от 5 до 30 мг/см³ коэффициент распределения ФХ между сорбентом МХДЭх100 и раствором больше единицы. При более высоких концентрациях ФХ его сорбция в данной системе неселективна.

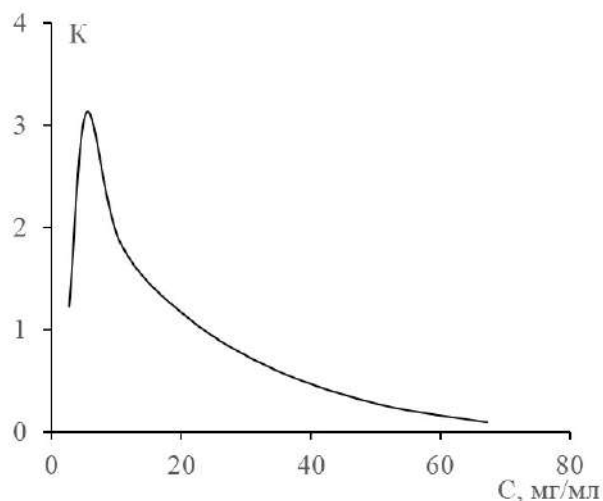


Рис. 8.3.2. Зависимость коэффициента распределения (K) ФХ от концентрации в растворителе для сорбента Стирасорб МХДЭх100.

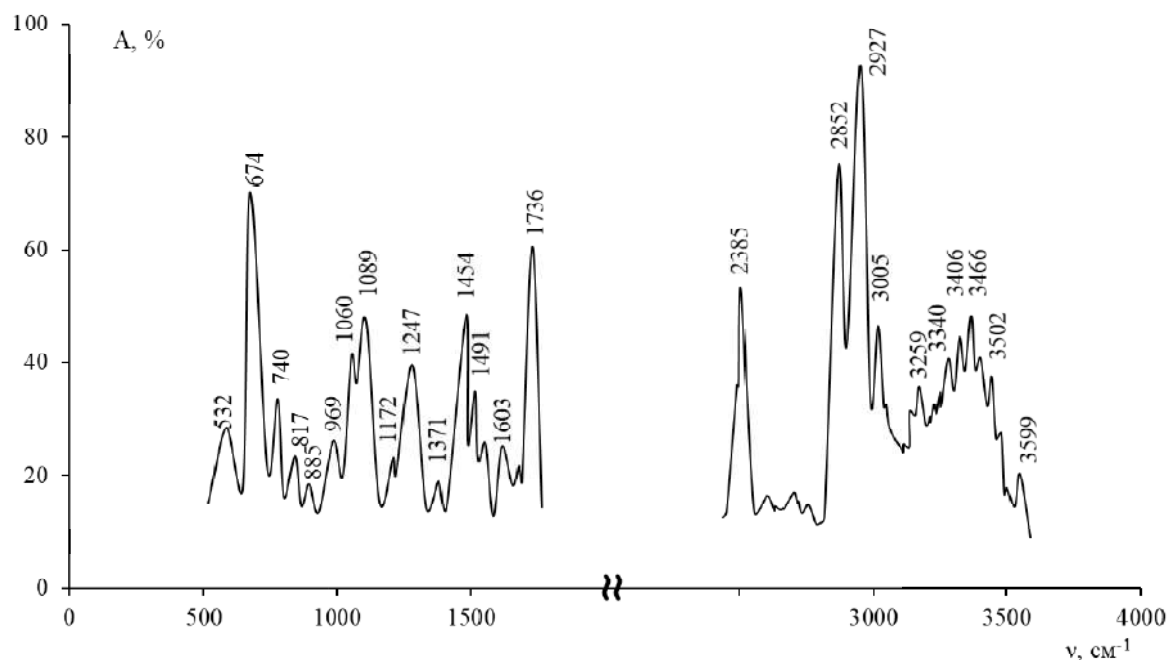


Рис. 8.3.3. ИК-спектры сорбента Стирасорб МХДЭх100 после сорбции ФХ.

Таблица 8.3.1. Характеристические полосы поглощения в ИК-спектрах Стирасорб МХДЭх100 после сорбции фосфатидилхолина.

Частота колебаний, ν , см^{-1}		$\Delta\nu$, см^{-1}	Отнесение колебаний
[8, 77, 97, 110, 137, 139, 174, 231, 248, 257]	Фосфатидилхолин		
3610	3599	11	ν^* $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ неассоциированные
3491	3502	-11	ν $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ с нарушен. сеткой H_2O
3460	3466	-6	ν $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ с нарушен. сеткой H_2O
3400	3406	-6	ν $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}_2\text{O}$ с 4-мя Н-связями
3384	3340	44	ν $\text{H}_2\text{O} \cdots$ ассоциир. с
3226	3259	-23	ν $\text{H}_2\text{O} \cdots$ ассоциир. с
3010	3005	5	ν $>\text{CH}$ в $\text{RCH}=\text{CHR}'$ (транс.)
2925	2927	-2	ν_{as} CH_2
2853	2852	1	ν_s CH_3 ; ν_s CH_2
2419	2385	34	ν_{OH} в Р-О-Н демиризованных
1726	1736	-10	$\nu_{C=O}$ в кетонных группах
1647	1653	-6	δ_s^{**} $\text{OH} \cdots \text{O}-\text{P} \equiv -$
$\sqrt{165}$	1603	12	δ_{as} $\text{OH} \cdots \text{O}-\text{P} \equiv -$
1472	1491	-19	$\equiv\text{P}=\text{O}$, связан. с CH_2 -группой
1450	1471	-4	
1376	1247-1142	5	δ_{as} CH_3 ; $\equiv\text{P}=\text{O}$ неассоциирован.
1245-1180	1089-1060	-2	$\nu \equiv\text{P}-\text{O} \cdots$ с водородной связью
1080	969	-9; 20	$\equiv\text{P}-\text{O}$ в алкилзамещ. фосфатах
945	885	-24	$\nu_{as} \equiv\text{N}^+ - \text{CH}_3$ холина
896	817	11	Неплоск. колеб. δ_{as} O $\text{H}_2 \cdots \text{O}=\text{C} <$ в ассоциатах
833	740	16	Скелетн. в $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_3$
750	674,	10	δ_s маятник. В $(\text{CH}_2)_n$
-	532	-	Надежных данных нет

ν^* , δ^{**} - валентные и деформационные колебания соответственно.

8.4. Выделение и фракционирование фосфолипидов из масла семян амаранта методом колоночной хроматографии

Для проведения исследований из товарных образцов сорбента Стиросорб 1-МХДЭх100; макропористого анионита АВ-17х2П и катионита КРС выделяют методом рассева на ситах рабочую фракцию с диаметром гранул 0,5-1,0 мм, заливают их 96% этиловым спиртом и выдерживают 35-45 мин до набухания. После этого иониты обрабатывают растворами кислот и щелочей последо-

вательно возрастающей концентрации (1-3 М HCl и 0,5-2 М NaOH). По достижении концентрационного максимума обрабатываемых растворов их постепенно (во избежание осмотического разрушения гранул) разбавляют водой до полного исчезновения реагентов. Такая обработка приводит к вымыванию основной массы примесей. Подобную последовательную обработку сорбентов повторяют 3-4 раза до полного удаления ионов железа (III) или по цветности щелочного раствора.

Для более полного удаления низкомолекулярных органических примесей сорбенты дополнительно обрабатывают полярными растворителями (ацетоном, этанолом). В ряде случаев для полного удаления ионов переходных металлов используют сильные комплексообразователи типа Трилона-Б. Попеременная обработка сорбента растворами кислот, щелочей или солей умеренной концентрации, связанная с изменением его набухаемости, приводит к более полному вытеснению пространственно разветвленных органических примесей и стабилизации всех характеристик сорбента. Завершающей стадией процесса, получившего название «кондиционирования» является полная противоточная отмывка сорбента деионизированной водой от контактирующего раствора [50, 53, 81, 110, 161, 168, 181, 182, 187]. Хроматографирование проводят в следующих условиях: колонки стеклянные 15x1,9 см; высота сорбционного слоя 10 см; температура 20°C; раствор фосфолипидного концентрата (ФЛК) с концентрацией 1 г/л объемом 0,1 л; скорость пропускания 0,5 мл/мин. Спиртохромофорные растворы ФЛК переносят в колонку с сорбентом, устанавливают заданную скорость элюирования и проводят разделение в изократическом режиме с использованием в качестве элюента – смеси хлороформ – этанол (1:10). На выходе из колонки собирают фракции по 10 мл. процесс сорбции – десорбции контролируется спектрофотометрически в УФ-области. Определение относительной плотности растворов проводится на спектрофотометре СФ-56 в кварцевой кювете толщиной 10 мм в диапазоне длин волн 190-340 нм. Для компенсации фонового поглощения в кюветы сравнения помещают исходный элюент. Отсутствие характерных максимумов поглощения при УФ-контроле на выходе из колонки свидетельствует о поглощении ФЛ сорбентом,

а увеличение оптических плотностей в отобранных фракциях при проведении десорбции указывает на наличие концентрационных зон. Контроль фосфолипидного состава в каждой фракции проводят методами ТСХ и ИК-спектроскопии [80, 93, 122].

Элюирующими системами в методе ТСХ служат: 1) петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота в соотношении 45:5:1 и 2) хлороформ-метанол-вода в соотношении 40:15:1; хроматографические пластины марки «Сорбфил» размером 10x10; стандартные растворы липидов «Sigma». Время элюирования 60 мин.; объем наносимой пробы 5, 10 мкл; детектирование пластин проводится 5% спиртовым раствором фосфатидолипидного комплекса с фосфомолибденой кислотой (ФМК).

Идентификацию липидов проводят по величине R_f и полученные экспериментально данные сравнивают с литературными. Проверку воспроизводимости данной методики проводят на стандартных растворах α -токоферола и метилового эфира стеариновой кислоты. Совпадение величин R_f , полученных экспериментально (0,20 для α -токоферола и 0,067 для метилового эфира стеариновой кислоты) с аналогичными величинами – стандартами (0,19 и 0,65) позволяет проводить идентификацию липидных фракций описанным способом (табл. 8.4.1).

Таблица 8.4.1. Фракционный состав липидов масла семян амаранта.

Липидная фракция	Среднее содержание фракций липидов, %	
	x	R_f
Стерины	$0,7 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
Глицериды жирных кислот	$68 \pm 3,10$	$0,35 \pm 0,02$
Свободные жирные кислоты	$1,5 \pm 0,2$	$0,16 \pm 0,0$
Токоферолы	$7,1 \pm 0,6$	$0,19 \pm 0,02$
Фосфолипиды*	$13,8 \pm 0,9$	$0,33 \pm 0,02$
Сквален	$5,4 \pm 0,4$	$0,93 \pm 0,03$
Углеводороды	$6,2 \pm 0,5$	$0,95 \pm 0,03$
*в элюирующей системе №2		

Из представленных в табл. 8.4.2 данных следует, что лучшее разделение фосфолипидов достигается при использовании неионогенного сорбента Стиросорб 1-МХДЭх100, профиль которого представлен на рис. 8.4.1.

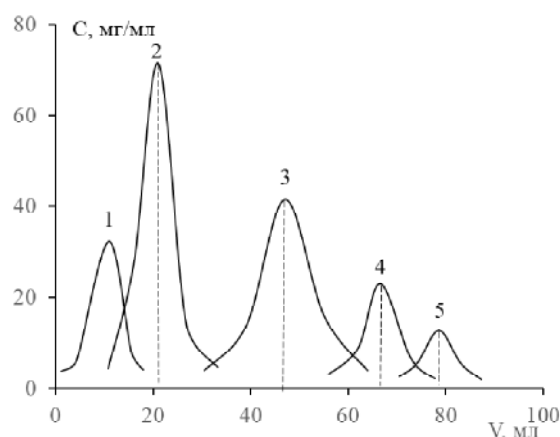


Рис. 8.4.1. Разделение фосфолипидного комплекса масла семян амаранта на сорбенте Стиросорб 1-МХДЭх100: 1 – фосфатидные кислоты; 2 – фосфатидилхолин; 3 – фосфатидилэтаноамин; 4 – фосфатидилинозитол; 5 – фосфатидилсерин.

Таблица 8.4.2. Результаты ТСХ и ИК-спектроскопии, полученных после разделения ФЛК на сорбентах.

Фосфо- липид*	№ фракций										R _f	ν**см ⁻¹
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Анионит АВ-17х2П												
ФХ											0,33	969
ФИ											0,23	1510,1610
ФЭА											0,80	1588,1650
ФК											0,74	
Катионит КРС-2П												
ФХ											0,33	969
ФИ											0,23	1510,1610
ФЭА											0,80	1588,1650
ФС											0,74	
ФК											0,55	
Стиросорб 1-МХДЭх100												
ФХ											0,33	969
ФИ											0,23	1510,1610
ФЭА											0,80	1588,1650
ФК											0,74	
ФС											0,55	

*ФХ – фосфатидилхолин; ФИ – фосфатидилинозитол; ФЭА – фосфатидилэтаноламин; ФС – фосфатидилсерин; ФК – фосфатидные кислоты.

**Характеристические частоты поглощения, см⁻¹

Из представленных данных следует, что лучшее разделение фосфолипидов достигается при использовании неиногенного сорбента Стиросорб. На анионите АВ-17х2П и катионита

КРСх2П разделения фосфолипидов на отдельные фракции не происходит. Проведенные исследования показывают, что Стиросорб 1-МХДЭх100 обладает высокой сорбционной емкостью разделительной способностью к фосфолипидам.

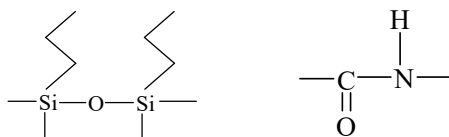
8.5. Сравнение результатов определения сквалена в растительных маслах методом ТСХ и ГЖХ

Сквален выделяют из неомыляемой фракции жиров соляной кислотой в ацетоне или диэтиловым эфире при -5°C . При анализе сквалена методом ТСХ наиболее четкие и контрастные зоны получаются на пластинах Плазмахром и Сорбфил при использовании в качестве растворителя декана. Проявляющим реагентом служит 5% фосфорномолибденовая кислота в спирте, так как она обеспечивает высокую контрастность и длительную сохранность интенсивности хроматографических зон.

Таким образом, предлагаемая методика отличается от известных ранее по следующим параметрам:

1) Элюирующей системой предлагается использовать декан, так как по совокупности параметров, характеризующих эффективность разделения и качество хроматографических зон сквалена в методе ТСХ, он более эффективен и оптимален по сравнению с общепринятой элюирующей системой Гептан-бензол (9:1) [4];

2) Наилучшими по дисперсии пятен сквалена явились пластины Плазмохрон и Сорбфил, имеющие элементарные структурные звенья



соответственно и дисперсии пятен 0,5 / 0,5 и 0,7 / 0,8.

3) Приготовление стандартных растворов сквалена осуществляется по следующей схеме. Взвешивают 2,0500 г сквалена («ICN Biomedical») (с концентрацией основного компонента 99,99%), растворяют в 100 мл трихлорметана и последовательным разбавлением готовят растворы с концентрациями 0,0016; 0,0050; 0,0084; 0,0117; 0,0168; 0,0252 моль/л.

4) Обнаружение сквалена на пластинках проводится следующими реагентами: 5%-ный раствор (спиртовой) фосфоромолибденовой кислоты (ФМК); концентрированной серной кислотой; парами йода и раствором родамина 6Ж. Йод – специфический реагент, взаимодействующий с непредельными связями в определяемых веществах. При опускании пластинки в камеру, наполненную парами йода, присутствие сквалена фиксировалось красно-коричневыми пятнами на белом фоне (рис. 8.5.1а). Для проявления серной кислотой, которая является специфическим реагентом на непредельные углеводороды, пластинку тщательно высушивают, а затем под вытяжкой обрабатывают раствором серной кислоты и помещают в сушильный шкаф. Зоны сквалена проявляются в виде серо-черных пятен на светло-сером фоне пластинки (рис. 8.5.1б).

Фосфоромолибденовая кислота – неспецифический проявитель в ТСХ, так как позволяет обнаружить все разделяемые компонент. Зоны веществ имеют высокую контрастность по сравнению с общим фоном пластинки и длительное время не меняют свою интенсивность. Сухую хроматограмму обрабатывают 5%-ным раствором ФМК в этиловом спирте, помещают на 10-15 мин в нагретый термостат. Появление темно-синих пятен определяемых веществ на желто-зеленом фоне свидетельствует о присутствии сквалена (рис. 8.5.1в).

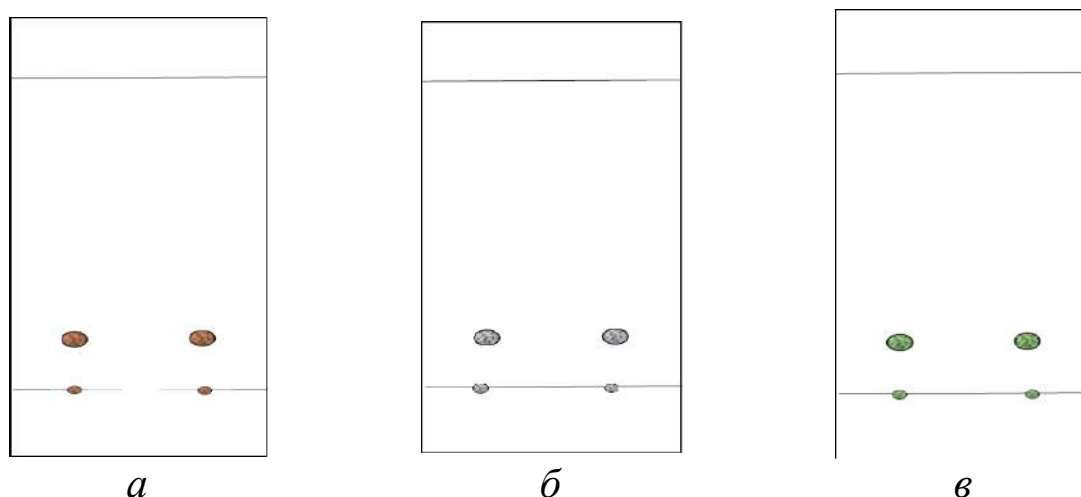


Рис. 8.5.1. а - хроматограмма сквалена, обработанная парами йода; б - концентрированной серной кислотой; в - фосфоромолибденовой кислотой.

Родамин 6Ж – неселективный проявитель, применяемый для обнаружения веществ в УФ-области спектра. Хроматограмму обрабатывают 0,0012%-ным водным раствором реагента и во влажном состоянии просматривают в УФ-свете при $\lambda=366$ нм. На бледно-розовом фоне пластины отмечают флуоресцирующие фиолетовые пятна сквалена.

В связи с тем, что сквален практически не растворим в этиловом спирте и ледяной CH_3COOH , для отделения сквалена от спирто- и водорастворимых компонентов (аминокислот, витаминов, гидратируемых липидов) используется следующий прием. 5 г масла смешивают с 30 мл абсолютного этилового спирта и подвергают механическому встряхиванию в течение 30 мин. Масляный слой отделяют на делительной воронке, остатки спирта удаляют безводным хлоридом кальция. Затем масляный слой отделяют на делительной воронке, остатки спирта удаляют безводным хлоридом кальция. Затем масляный раствор (10 мл) растворяют в 10 мл хлороформа и наносят на пластины ТСХ.

С использованной методикой проанализированы используемые в пищевой и фармацевтической промышленности масла: хлопковое (0,99% сквалена); облепиховое (0,84% сквалена); репейное (1,25% сквалена); из семян грейпфрута (0,65% сквалена); из семян амаранта (4,41% сквалена). Эти данные свидетельствуют о перспективности выделения сквалена из амарантового и репейного масел.

Исследование сквалена методом газожидкостной хроматографии обычно начинается с подбора сорбента (инертного носителя) и нанесения на него неподвижной жидкой фазы. Хорошим инертным носителем является модифицированный диатомитовый кирпич (сферохром), отличающийся пористостью, развитой внутренней поверхностью и термостойкостью. Используют для работы фракцию сферохрома диаметром 0,5-1,0 мм. Просеянную фракцию промывают ацетоном, сушат в сушильном шкафу при 100°C до полного удаления растворителя, и активировали в муфельной печи при 900°C в течении 30 мин. Носитель помещают в сухой мерный цилиндр и определяют массу носителя. Масса неподвижной жидкой фазы Апиэзон L или SE-30 равняется 1% от массы носителя.

Навеску жидкой фазы растворяют в бензоле или толуоле (Апиезон L) или в хлороформе (SE-30) при нагревании. Объем растворителя должен быть достаточным, чтобы добавляемый носитель был полностью покрыт жидкостью. Смесь высушивали в сушильном шкафу при 70°C до полного удаления растворителя, что определяется по отсутствию специфического запаха.

Перед заполнением 3-х метровых стальных колонок сорбентом их промывают разбавленным раствором серной кислоты, затем ацетоном. Высушивают до полного удаления влаги с внутренних стенок. Заполнение колонки сорбентом проводят через стеклянную воронку под вакуумом, закрыв концы стекловолокном. Перед использованием готовой колонки проводят ее кондиционирование для удаления остатков летучих примесей при 50°C с последующим увеличением температуры на 20°C, до тех пор, пока не достигается максимальная рабочая температура НЖФ. Подобная операция выполняется в течение 5 дней. Для анализа сквалена ГЖХ используется хроматограф марки Chrom 5 лаборатории Prijsron (Прага) с детектором ионизации пламени с газом-носителем аргоном особой чистоты. Водород для детектора получают в генераторах водорода методом электролиза раствора КОН. Скорость во всех опытах для водорода была 30 мл/мин. Скорость воздуха поддерживалась 300 мл/мин.

Включение хроматографа и выведение его на заданный режим проводится по следующим параметрам:

- температура колонки 250 °C;
- температура испарителя 260 °C;
- температура детектора 250 °C;
- скорость газа-носителя 30 мл/мин.

В испаритель с помощью микрошприца вводят 1 мкл сквалена и засекают время удерживания. После проведения измерений на одном сорбенте выключают хроматограф, меняют колонку с сорбентом и повторяют эксперимент.

Для количественного определения сквалена включают хроматограф и проводят исследования при температуре колонки 270°C. В испаритель последовательно вводятся 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мкл сквалена и регистрируются площади пиков, соответствующие анализируемому объему. Хроматограммы сканируют, а изображе-

ния обрабатываются по специальной программе для точного расчета площади пиков. Затем по полученным данным строятся градуировочные графики для каждого из исследованных сорбентов.

На хроматограммах для каждой элюирующей системы рассчитывались: относительная скорость перемещения R_f ; высоты эквивалентной теоретической тарелки H ; числа теоретических тарелок N ; фактор удерживания K .

При первой исследуемой температуре 250 °С оптимальные скорости газаносителя носителя сильно различались для обоих сорбентов, то с увеличением температуры эта разница постепенно пропадала, и при температуре в 300 °С оптимальная скорость газа-носителя при определении сквалена на апиезоне L и SE-30 составила 30 мл/мин (см. табл. 1 и рис.2).

Таблица 8.5.1. Сравнение величин H при оптимальных скоростях газаносителя для сорбентов апиезон L и SE-30 при разных температурах.

Температура, °С	Величина H , мм (оптимальная скорость газа-носителя, мл/мин)	
	Апиезон L	SE-30
250	0,743 (40)	0,561 (45)
270	0,589 (35)	0,518(40)
300	0,386 (30)	0,462 (30)

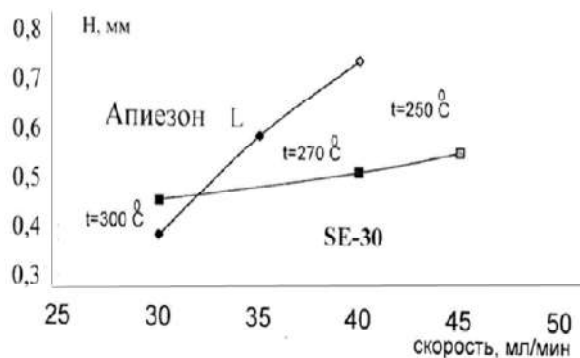


Рис. 8.5.2. Сравнение величин, эквивалентных теоретической тарелке, и оптимальных скоростей газа-носителя для двух сорбентов при различных температурах.

Как видно из рис. 8.5.2, разделительная способность сорбента SE-30 не так сильно зависит от температуры, как апиезона L. Величина H для этого сорбента практически не изменяется с увеличением температуры, и при низких температурах значительно

меньше, чем величина N сорбента апиезон L (табл. 8.5.1). Однако при высоких температурах (300 °С) величина N при определении сквалена на апиезоне L меньше. Следовательно, при низких температурах определение сквалена эффективнее проходит на универсальном сорбенте SE-30, а при высоких - на сорбенте апиезон L. Для количественного определения сквалена приемлемой температурой является 270°С. По совокупности полученных данных выбираются оптимальные условия определения сквалена на различных сорбентах (табл. 8.5.2).

Таблица 8.5.2. Оптимальные условия для определения сквалена методом газожидкостной хроматографии.

Параметры	Неподвижная жидкая фаза	
	Апиезон L	Se-30
Температура определения, °С	270 °С	270 °С
Скорость газа-носителя, мл/мин	35	40
Время выхода сквалена, с	1648	1578
Объем вводимой пробы, мкл	1	1

Количественный анализ сквалена в растительных маслах

В условиях, приведенных в табл. 8.5.2, был проанализирован стандартный образец сквалена «ICN Biomedical». Объемы вводимой пробы составили 1, 1,5, 2, 2,5, 3 мкл. На рис.8.5.3 приведены градуировочные графики зависимости площади пика от объема вводимой пробы для определения сквалена на различных сорбентах.

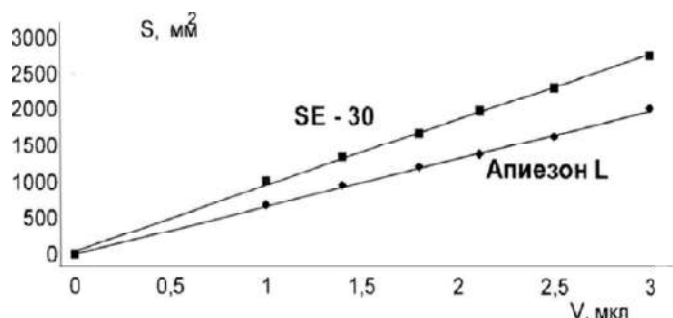


Рис. 8.5.3. Градуировочные графики для определения сквалена на различных сорбентах.

Как видно из рис. 8.5.3, оба графика линейны и выходят из нуля, но график, соответствующий определению сквалена на

сорбенте SE-30, имеет больший угол наклона к оси абсцисс, что свидетельствует о более высокой чувствительности этого сорбента к сквалену. Однако в зависимости от целей исследования можно количественно определять сквален на обоих этих сорбентах. В случае применения апиезона L в качестве НЖФ можно получить подробную информацию о тех веществах в составе масел, по отношению к которым этот сорбент наиболее селективен. Остальные компоненты масел могут не разделиться на этом сорбенте. При разделении на сорбенте SE-30, напротив, можно получить информацию обо всех веществах, входящих в состав анализируемого объекта и испаряющихся при температуре исследования. Кроме того, этот сорбент наиболее распространен в современных лабораториях. Исходя из вышесказанного, для дальнейшего количественного определения сквалена в растительных маслах выбран сорбент SE-30.

Предварительная подготовка масла может не проводиться, если сквалена в выбранных объектах анализа содержится очень мало, и при любых предварительных обработках, концентрировании или экстракции резко возрастет погрешность анализа. Масло объемом 10 мкл вводится в испаритель, в котором находился диатомитовый кирпич (=2-3 мл) без нанесенной НЖФ. Компоненты масла, которые не испаряются при температуре анализа, остаются на поверхности кирпича и не попадают в колонку. Остальные вещества, в том числе и сквален, испаряются и беспрепятственно проходят в колонку. В табл.8.5.3 приведены данные о количественном содержании сквалена в некоторых растительных маслах.

Таблица 8.5.3. Содержание сквалена в растительных маслах.

Масло	Литературные данные, %	Данные эксперимента, %
Амарантовое масло	2-8 [1-4.18]	4,47 ± 0,06
Репейное масло	-	1,08 ± 0,02
Хлопковое масло	-	0,54 ± 0,02
Масло из виноградных косточек	-	0,84 ± 0,02
Масло календулы	-	0,62 ± 0,01
Масло шиповника	-	0,19 ± 0,01
Масло шалфея	-	0,35 ± 0,01

Как видно из табл. 8.5.3, в литературе не имеется данных о содержании сквалена в большинстве анализируемых масел, а существующие данные носят приблизительный характер. По полученным результатам, наибольшее количество сквалена содержится в амарантовом, оливковом и репейном масле, которые часто рекомендуются как вспомогательное лечебное средство при поражениях кожного покрова. В масле из косточек винограда его содержится меньше одного процента, однако по сравнению с другими проанализированными маслами его количество все же значительно. Это отчасти объясняет высокую антиоксидантную активность этого масла, которое входит в состав многочисленных средств для омоложения кожи. По разработанной методике впервые получены данные о количественном содержании сквалена в наиболее популярных и часто используемых в медицине маслах.

Сравнение результатов определения сквалена в растительных маслах методом ТСХ и ГЖХ

Впервые разработаны методики количественного определения сквалена в растительных маслах методом газожидкостной и тонкослойной хроматографии. В табл. 8.5.4 приведены данные по количественному анализу сквалена вышеперечисленными методами.

Таблица 8.5.4. Содержание сквалена в растительных маслах, определенное двумя методами.

Масло	Содержание сквалена, %	
	по данным ТСХ	по данным ГЖХ
Амарантовое масло	5,57 ± 0,43	4,47 ± 0,06
Репейное масло	1,22 ± 0,32	1,08 ± 0,02
Хлопковое масло	-	0,54 ± 0,02
Оливковое масло	1,47 ± 0,38	1,21 ± 0,04
Масло из виноградных косточек	0,95 ± 0,25	0,84 ± 0,02
Масло календулы	-	0,62 ± 0,01
Масло шиповника	-	0,19 ± 0,01
Масло шалфея	-	0,35 ± 0,01

К достоинствам метода ТСХ можно отнести экспрессность (анализ занимает не более 30 мин), доступность и простоту (для проведения анализа не требуется дорогостоящего оборудования и

специальных навыков). Однако погрешность при определении сквалена методом ТСХ достаточно высока (около 10 %), что необходимо учитывать при выборе метода анализа. Кроме того, для проведения исследования этим методом необходима предварительная подготовка образца, так как в состав масла, кроме сквалена, входит большое число насыщенных и ненасыщенных углеводов, которые имеют такие же R_f , что и сквален. Наличие в пробе неполярных соединений приводит к завышению результатов и неправильной интерпретации полученных данных.

Метод ГЖХ не имеет указанных недостатков. Для определения сквалена не требуется предподготовка образца, так как углеводороды в маслах сильно различаются по температурам кипения, а, следовательно, и по времени выхода. Отсутствие предварительного концентрирования снижает общее время анализа и уменьшает погрешность измерений (для метода ГЖХ она составляет около 3 %). Однако для проведения анализа необходимо специальное оборудование (газовый хроматограф), которое есть не во всех лабораториях. Анализируя данные табл. 8.5.4, можно сказать, что, несмотря на разницу в погрешностях, оба метода анализа дают практически одинаковые результаты. Некоторое завышение результатов в случае применения метода ТСХ можно объяснить присутствием в пробе неполярных углеводов, имеющих со скваленом одинаковые значения R_f . Сравнительные характеристики двух обсуждаемых методов представлены в табл. 8.5.5.

Таблица 8.5.5. Сравнительная характеристика методик определения сквалена в растительных маслах.

№	Параметр	ТСХ	ГЖХ
1	Возможности методики	Качественный и количественный анализ; препаративное выделение.	Качественный и количественный анализ
2	Определение близких по структуре и свойствам углеводов	нет	да
3	Чувствительность, мг/г масла	100	10
4	Время выполнения анализа, ч	1,5	0,5
5	Стандартное отклонение	1,5	0,05
6	Относительная ошибка, %	10%	3%

Исходя из вышесказанного можно сделать вывод, что для определения сквалена и в зависимости от целей и возможностей исследователя в маслах можно использовать методы ТСХ и ГЖХ. Обе методики являются достаточно точными, не требуют больших количеств стандартных веществ и анализируемых объектов, являются информативными и отвечают основным метрологическим характеристикам.

8.6. Расчет коэффициентов распределения углеводородов между газовой и конденсированной (пленка модификатора) фазами [221]

Пленка модификатора в газовых сенсорах, действующих по типу объемно-акустических волн, принимается как массовая нагрузка, изменяемая при сорбции определяемого вещества. Такой подход корректен при толщине пленки-модификатора намного меньшей длины акустической волны. Толщину пленки-модификатора рекомендуется ограничить в пределах 0,1-0,3% от длины акустической волны.

Прежде всего, сенсор выдерживается до установления стабильной частоты колебаний, а затем в ячейку детектирования вводится серия стандартных проб с возрастающими концентрациями углеводородов. Температуру в термостате контролируют цифровым термометром сопротивления и поддерживают с точностью $\pm 0,5^\circ$. После введения каждой пробы фиксируют резонансную частоту колебаний пьезосенсора и вычисляют относительный сдвиг частоты Δf по уравнению:

$$\Delta f = f_o - f_l, \quad (8.6.1)$$

где f_o и f_l – частоты колебаний сенсора до и после сорбции, Гц.

Основной физико-химической величиной, количественно оценивающей чувствительность сорбента к определяемому веществу, является коэффициент распределения k :

$$k = C'_y / C''_y, \quad (8.6.2)$$

где C'_y , C''_y – концентрация углеводородов в газовой и конденсированной фазе соответственно.

При физической адсорбции для масс-чувствительных пьезохимических устройств коэффициент k вычисляют по уравнению:

$$k = (\Delta f_a \cdot \rho_C \cdot R \cdot T \cdot 10^7) / (\Delta f_C \cdot M_{газ} \cdot p_{газ}), \quad (8.6.3)$$

где $M_{газ}$ – молекулярная масса углеводорода, г/моль; ρ_C – плотность модификатора, г/см³; $p_{газ}$ – парциальное давление аналита, Па; 10^7 – коэффициент перевода единиц измерения в систему СИ.

Избыточную адсорбцию (n^S) вычисляли по уравнению:

$$n^S = \Delta f_a / (\Delta f_C \cdot M_{газ}) \text{ (моль/кг)}. \quad (8.6.4)$$

Если предположить, что фаза является смесью идеальных молекул, то парциальное давление каждого компонента p_i будет связано с его концентрацией уравнением (9.6):

$$p_i = B \cdot C_i, \quad (8.6.5)$$

где $C_i = N_i / V$ (N_i – число молекул определяемого вещества, V – объем системы); $B = (N_A \cdot k_B \cdot T)^{-1} = (RT)^{-1}$ (N_A – число Авогадро, k_B – постоянная Больцмана).

Коэффициент распределения нитрометана рассчитывается по уравнению (8.6.6):

$$K = n^S \cdot \rho_C \cdot 10^7 / C_{газ} \quad (8.6.6)$$

где $C_{газ}$ – концентрация нитрометана в газовой фазе, моль/м³.

Концентрация углеводородов в газовой фазе $C_{газ}$:

$$C_{газ} = p_{газ} \cdot M_{газ} \cdot B$$

После введения значения универсальной газовой постоянной:

$$C_{газ} = (p_{газ} \cdot M_{газ} \cdot 10^{-4}) / T \text{ (кг/м}^3\text{)},$$

Концентрация нитрометана в конденсированной фазе:

$$C_k = p_C \cdot n^S \text{ (кг/м}^3\text{)}. \quad (8.6.7)$$

Уравнение Зауэрбрея получено для металлических пленок на поверхности пьезосенсора с допущением, что любая масса, добавляемая на поверхность преобразователя, настолько мала, что не приводит к значительным изменениям плотности кварца, а, следовательно, и массы кристалла. Поэтому, несмотря на это до-

пущение, уравнение (8.6.7) применимо для количественного описания сорбции других веществ.

Массу сорбированного углеводорода вычисляют по уравнению (8.6.8):

$$\Delta m_a = (\Delta f_C \cdot A) / C_f \quad (8.6.8)$$

где $C_f = 2,26 \cdot f_o^2 \cdot 10^6$.

Коэффициенты распределения углеводородов между газовой и конденсированной фазами максимальны для аренов, что связано с образованием π -связей с ароматическим кольцом.

Таблица 8.6.1. Коэффициенты распределения углеводородов между газовой и конденсированной фазами

Углеводород	k	Углеводород	k	Углеводород	k	Углеводород	k
Гекса	1600	Декан	3500	Нитрометан	16300	Нитробензол	35000
Гептан	2200	Додекан	3800	Нитроэтан	22700	О-нитротолуол	42500
Октан	3000			1-нитропропан	8600	М-нитротолуол	42500
Нонан	3200			2-нитропропан	28400		

8.7. Метод кондукто- и потенциометрии для определения ацетильных групп и солевых форм свекловичного пектина [57, 103, 112, 118]

Содержание в пектине ацетилированных гидроксогрупп и его солевых форм определяют технологические свойства Д-галактуроновой кислоты. Наиболее эффективным приемом для определения вышеназванных характеристик является одновременное кондуктометрическое и потенциометрическое титрование.

По объему титранта в точках эквивалентности определяется общее содержание в пектине свободных и диэтерифицированных карбоксильных групп ($C_{св}$), а содержание этерифицированных группировок рассчитывали по формуле:

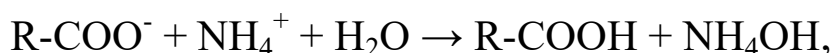
$$C_{эт} = C_{общ} - C_{св} \quad (8.7.1)$$

Содержание общего количества функциональных групп C_{ϕ} определяется ацидиметрическим титрованием гидролизованного раствора пектина, полученного при определении карбоксильных

групп 0,1 н раствором HCl. Количество ацетилированных гидроксогрупп C_{ac} рассчитывается по формуле:

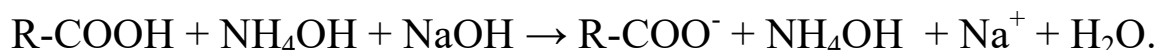
$$C_{ac} = C_{общ} - C_{эт} - C_{св} \quad (8.7.2)$$

На кислотно-основное равновесие в растворе пектина влияет содержание нейтрализованных карбоксильных групп, образующихся в процессе обработки пектина аммиаком. При этом 10-кратный избыток NH_4OH по отношению к содержанию свободных гидроксильных групп приводит к частичному нахождению пектина в солевой аммонийной форме. Выявление сходства и различия между процессами титрования аммонийной и кислотной форм пектина позволяют объяснить причины вариаций в электропроводности растворов (рис. 8.7.1). На начальной стадии титрования ход кривых аммонийной формы пектина значительно отличается от титрования кислотной формы. Причиной увеличения электропроводности при титровании солевой формы пектина является то, что в водном растворе пектат аммония (как соль слабой кислоты и слабого основания) полностью гидролизуется:



где R – полимерная цепь молекулы пектина.

При титровании щелочью идет нейтрализация карбоксильных групп:



Фиксированные а полимере карбоксилат-ионы практически не участвуют в электропроводности, а относительное ее постоянство обусловлено наличием в растворе гидроксида аммония. Кривые потенциометрического титрования солевой формы пектина (рис. 8.7.2) показывают объем в точке эквивалентности близкий данным кондуктометрии (рис. 8.7.1).

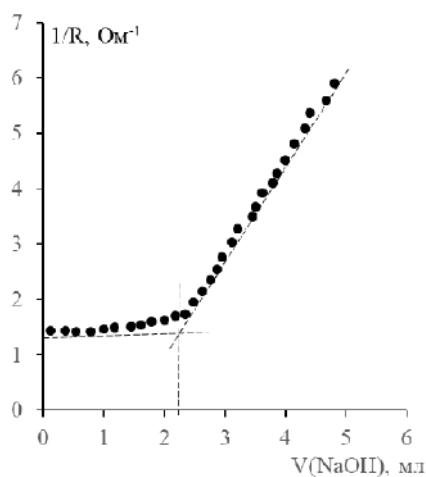


Рис. 8.7.1. Кривые кондуктометрического титрования: солевая (NH_4^+) форма пектина.

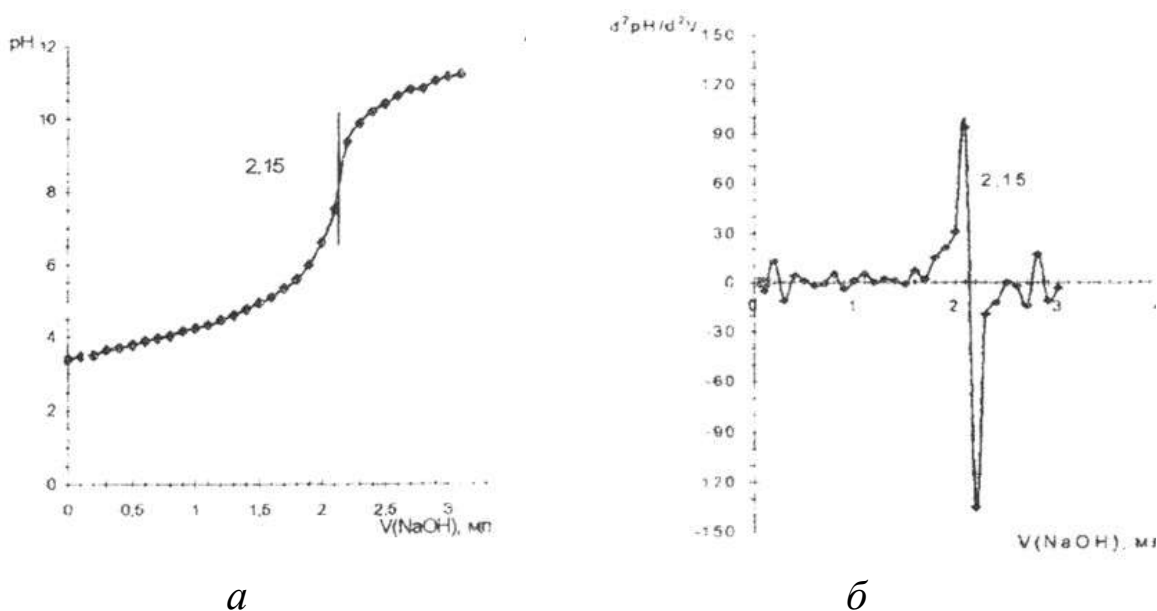


Рис. 8.7.2. *а* – интегральная и *б* – дифференциальная кривые потенциометрического титрования солевой (NH_4^+) формы пектиновой кислоты

Обработка экспериментальных данных 8.7.1 путем построения линий тренда с максимальным уровнем аппроксимации линейно участка левой части кривых титрования показала для солевой формы пектина:

$$Y = 1.9281x - 2.5693 \text{ при } R^2 = 0,998.$$

Таким образом, предложенный метод определения точки эквивалентности может быть использован при титровании солевых форм пектина.

Определение содержания функциональных групп пектина, содержащих сложноэфирные связи, приведено на рис. 8.8.3 (кондуктометрическое титрование) и на рис. 8.7.4 (потенциометрическое титрование) (общего содержания карбоксильных групп).

По уравнениям линий тренда (таблица 8.7.1) с максимальным уровнем аппроксимации находились точки эквивалентности, и рассчитывалось общее содержание карбоксильных групп в пектине. Полученные результаты подтверждаются данными потенциометрического титрования, представленными на рис. 8.7.4. Обращает на себя внимание разница в содержании общего количества карбоксильных групп при титровании солевой аммонийной и кислотной форм пектина. Пониженное их содержание для солевой формы связано с неполным гидролизом сложноэфирных связей вследствие недостатка свободных гидроксид-ионов в системе (из-за связывания их вытесняемыми из пектина аммония).

Таблица 8.7.1. Показатели кондуктометрического определения общего содержания карбоксильных групп.

№	Уравнение линии тренда	R^2_{max}	Содержание групп COOH , %
1	$Y = 7.8077x - 5.7115$	0.99	4,2
2	$Y = 0.2500x + 1.9417$	0.75	
3	$Y = 7.9266x - 6.3338$	0.99	5,0
4	$Y = 0.7500x + 2.6750$	0.75	

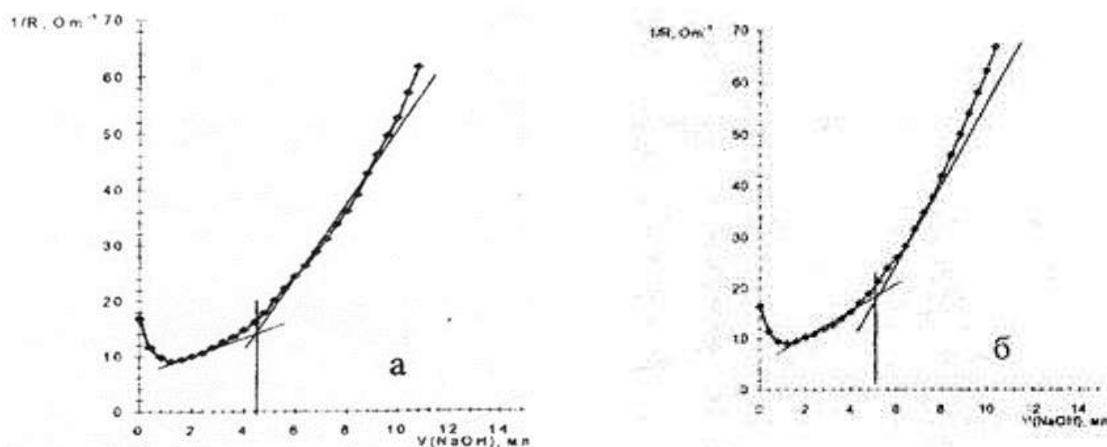


Рис. 8.7.3. Кривые кондуктометрического титрования общего содержания карбоксильных групп: *а* - солевая (NH_4^+) форма; *б* – кислотная (H^+) форма.

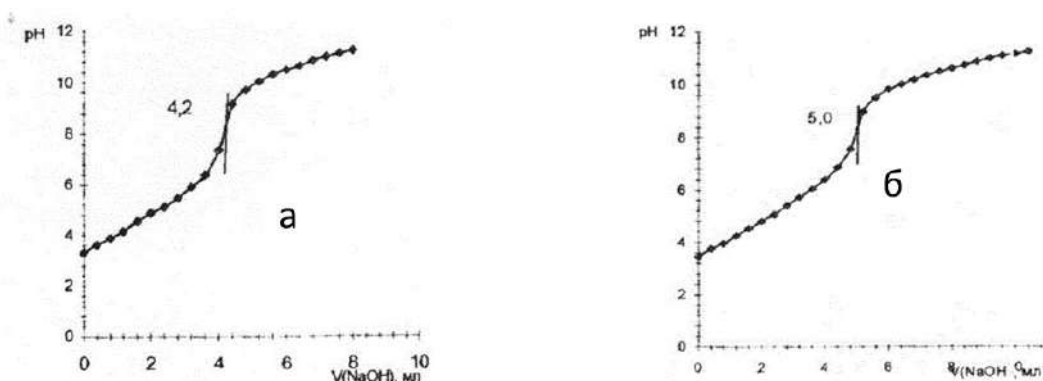


Рис. 8.7.4. Кривые потенциметрического титрования общего содержания карбоксильных групп: *а* - солевая (NH_4^+) форма; *б* – кислотная (H^+) форма.

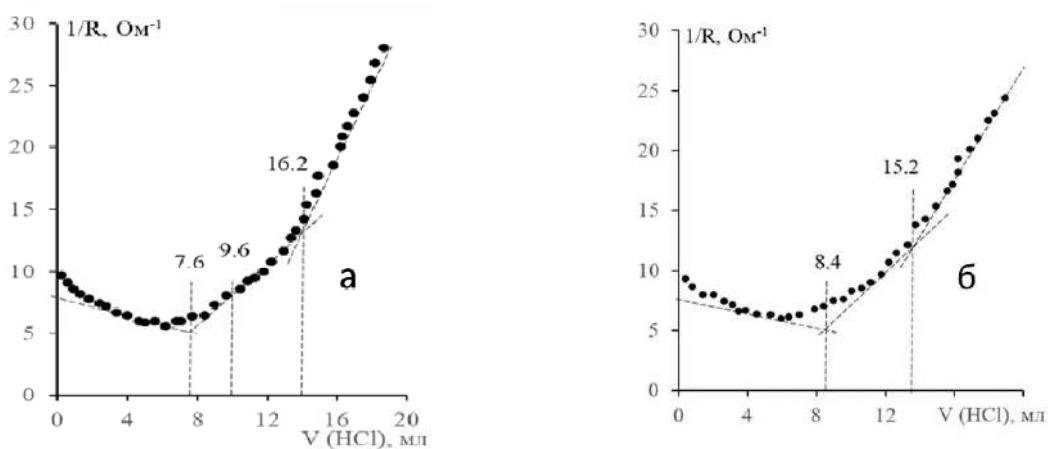


Рис. 8.7.5. Кривые кондуктометрического титрования при определении содержания общего количества функциональных групп пектина: *а* - солевая (NH_4^+) форма; *б* – кислотная (H^+) форма.

Молекула D-галактуроновой кислоты содержит, кроме того, ацетильные группы, связанные с атомами кислорода гидроксогрупп в положениях 2 и 3 пиранозного цикла. Степень ацетилирования пектиновой кислоты – важный показатель при формировании пространственной структуры. Кривая титрования пектина, первоначально находившегося в аммонийной форме (рис 8.7.5а), имеет четыре участка с различным наклоном относительно оси абсцисс. Первый, нисходящий участок соответствует нейтрализации свободной щелочи с заменой гидроксид-ионов менее подвижными хлорид-ионами. Второй, слабо выраженный участок характеризуется увеличением электропроводности за счет присутствия в растворе хлорида аммония, который гидролизуетс с образованием anomalно подвижных ионов гидроксония H_3O^+ .

Третий участок соответствует совместному титрованию солевой натриевой формы пектина и уксуснокислого натрия, образовавшихся при гидролитическом отщеплении ацетильных групп. Близость рК пектина (4,50) уксусной кислоты (4,73) не позволяет выявить участки, характеризующие титрование каждого из их компонентов смеси.

Четвертый, возрастающий участок кривой характеризуется накоплением в смеси избытка соляной кислоты (рис. 8.7.5а). Кривая титрования раствора пектина, находившегося первоначально в кислотной форме (рис. 8.7.5б), имеет только три участка, соответствующие титрованию свободной щелочи, смеси пектата и ацетата натрия, и избытку титранта.

В табл. 8.7.2 представлены уравнения линий тренда и объемы в точках эквивалентности при определении функциональных групп в молекуле пектина. Данные аналитических определений состава пектина свидетельствуют о перспективности его использования. Полученные данные (табл. 8.7.3) показывают, что пектин по содержанию галактуроновой кислоты, степени этерификации и ацетилирования отвечает требованиям, предъявляемым существующим стандартам (ОСТ III-3-82. Пектин).

Таблица 8.7.2. Показатели кондуктометрического определения точек эквивалентности.

Определение	№ линии	Уравнение линии тренда	R ² _{max}	Объем в точ- ке эквива- лентности, мл
Солевая форма (рисунок 9.11 а)				
Избытка NaOH	1	Y = -0.625x+2.6964	0.98	7.6
	2	Y = 0.25x + 1.0333	0.75	
Аммонийной формы пектина	2	Y = 0.2x + 1.17	0.80	9.6
	3	Y = 0.325x + 0.855	00.93	
Суммы ацетилированных гидроксогрупп и свободных карбоксильных групп	3	Y = 1.2x - 2.56	0.99	16.2
	4	Y = 0.25x + 1.1	0.98	
Кислотная форма (рисунок 9.11 б)				
Избытка NaOH	1	Y = -0.6786x + 2.7	0.99	8.4
	2	Y = 0.625x + .075	0.83	
Суммы ацетилированных гидроксо-групп и свободных карбоксильных групп	2	Y = 0.625x +0.075	0.83	15.2
	3	Y = 1.5643x–3.5014	0.99	

Таблица 8.7.3. Характеристики свекловичного пектина.

Метод определения - кондуктометрия							
	Кс	Кн	Кэ	Ко	Емет	Пч	Ац
Пектин, обработанный NH_4OH	-	9,4	9,0	18,4	48,9	74,9	0,04
Пектин, не обработанный NH_4OH	9,4	-	12,5	21,9	57,1	89,7	0,10

Содержание, %: Кс – свободных карбоксильных групп; Кн – карбоксильных групп, нейтрализованных аммиаком; Кэ – карбоксильных групп, этерифицированных метанолом; Ко – ее карбоксильных групп; Пч – галактуроновой кислоты. Емет – степень этерификации метанолом. Ац – ацетильная составляющая от массы пектинового порошка.

Таким образом, при определении содержания солевых форм и ацетилированных гидроксогрупп в свекловичном пектине так же, как и при определении свободных карбоксильных групп и их общего количества, повышение точности анализа может быть достигнуто методом построения линий тренда с максимальным уровнем аппроксимации к линейным участкам кривых кондуктометрического титрования.

Отмечаем повторно, что методика совместного кондукто- и потенциометрического титрования образцов пектина оригинальна, и позволяет распространить этот способ для анализа фосфатидилсерина, кардиолипина, ганглиозида $\text{G}_{\text{M}2}$, галактоцереброзида [1, 37, 55].

8.8. Определение аминокислот в препарате «Гидролизин» и «Нефрамин» [100]

Определения аминокислот проводили в лекарственных препаратах «Нефрамин» (Турция) и «Гидролизин» (Турция) методом ТСХ в циклодекстриновых подвижных фазах. Лекарственный препарат «Нефрамин» представляет собой раствор аминокислот для парентерального питания, применяемый преимущественно для лечения хронической почечной недостаточности. Препарат способствует снижению содержания мочевины в крови, выравниванию концентрации ионов электролитов и установлению положительного азотистого обмена, «Нефрамин» содержит также ионы калия, магния, фосфора. «Гидролизин» – белковый препарат, содержащий все незаменимые аминокислоты с добавлением глю-

козы, используется как полноценный продукт для парентерального питания.

Пробу анализируемого препарата объемом 1 мл растворяют в 10 мл этанола. Приготовленные растворы используют для дальнейших анализов. Содержащиеся в препарате «Нефрамин» ионы калия, магния, фосфора (как и глюкоза в препарате «Гидролизин») не мешают дальнейшему определению аминокислот.

Количественное определение триптофана и лейцина в препарате «Гидролизин»

Для количественного определения аминокислот в препарате «Гидролизин» методом тонкослойной хроматографии необходимо установить зависимость параметров хроматографической зоны от концентрации определяемого компонента.

В мерных колбах объемом 25 мл последовательным разбавлением стандартного раствора триптофана ($C_{три} = 1,0 \cdot 10^{-1}$ М) дистиллятом H_2O готовят рабочие растворы с концентрациями $1,0 \cdot 10^{-6}$ – $1,0 \cdot 10^{-2}$ М. Хроматографирование проводят на неподвижной фазе «Сорбфил» (Al) в подвижной фазе (ПФ) 2-ГП- β -ЦД (2-гидроксипропил- β -циклодекстрин) ($0,6 \cdot 10^{-2}$ М) – KCl ($I = 0,10$). Общий объем ПФ составлял 5 мл. На стартовую линию пластины наносят объем аликвоты 1 мкл (рис. 8.8.1).

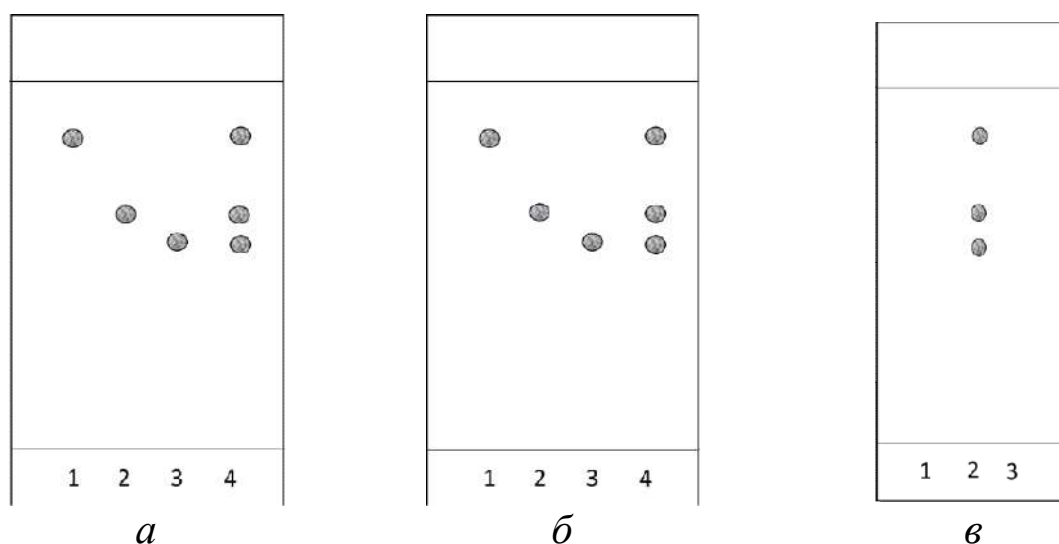


Рис. 8.8.1. Хроматограммы тирозина (1), лейцина (2), триптофана (3) на «Сорбфил» (Al): а - в отсутствие глюкозы, б - в присутствии глюкозы, в - в препарате «Гидролизин»; $C_{2-ГП-\beta-ЦД} = 0,08 \cdot 10^{-2}$ М; $C_{глюкозы} = 2,0\%$; $C_R = 5,0 \cdot 10^{-2}$ М.

Из рис. 8.8.1 следует, что хроматограммы тирозина, лейцина, триптофана в растворах свидетелей и в препарате «Гидролизин» соответствуют друг другу. Поэтому циклодекстриновые ПФ подходят для идентификации вышеназванных аминокислот в фармацевтических препаратах.

По полученным данным рассчитывают значения площадей хроматографических зон аминокислот ($S_{\text{отн}}$) для построения градуировочного графика в координатах $S_{\text{отн}}$ - $C_{\text{ак}}$, мг/л (рис. 8.8.2).

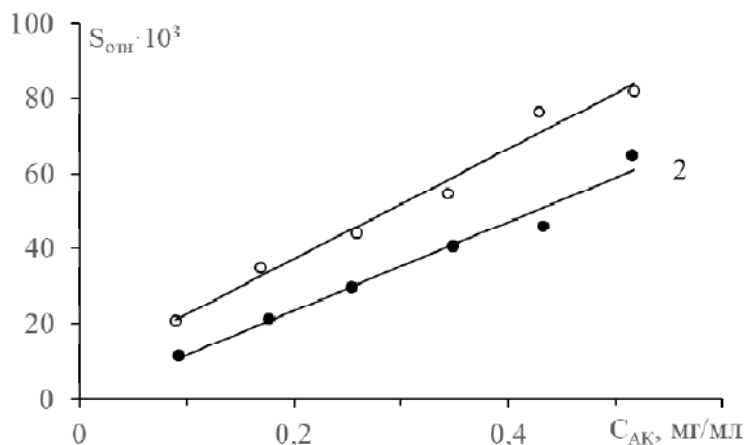


Рис. 8.8.2. Градуировочный график для определения тирозина (1) и триптофана в препарате «Гидролизин» на НФ «Сорбфил» (А1).

Результаты количественного определения тирозина, лейцина, триптофана представлены в табл.1.

Таблица 8.8.1. Определение тирозина, лейцина, триптофана в препарате «Гидролизин». НФ - «Сорбфил» (А1); ПФ - 2-ГП-β-ЦД ($0,6 \cdot 10^{-2}$ М) – КСI ($I = 0,10$); ($n = 3$; $P = ,95$; $F_{\text{табл}} = 19$; $t_{\text{табл}} = 2,78$).

№	Аминокислоты	Метод	Содержание: $x_{\text{ср}} \pm \Delta x$, мг/100мл	$S_{\text{г}}$	$F_{\text{эксп}}$	$t_{\text{эксп}}$	Содержание по пас- порту, мг/100мл
1	Тирозин	ТСХ	22 ± 1	0,08	4,86	2,84	> 18
		Спектрофотометрия	$22,9 \pm 0,8$	0,09			
2	Лейцин	ТСХ	20 ± 3	0,06	3,76	1,97	-
		Спектрофотометрия	$20,3 \pm 0,9$	0,08			
3	Триптофан	ТСХ	17 ± 1	0,04	4,21	2,52	>15
		Спектрофотометрия	$17,9 \pm 0,7$	0,05			

Обработка результатов двух методов определения аминокислот по F и t критериям установила отсутствие систематической ошибки:

$$F_{\text{эксн}} = 4,21 < F_{\text{табл}} = 19; t_{\text{эксн}} = 2,52 < t_{\text{табл}} = 2,78 \text{ (для триптофана)}.$$

Введение электролитов в циклодекстриновую подвижную фазу при определении тирозина, триптофана и лейцина (рис. 8.8.3) уменьшает подвижность изучаемых аминокислот. Однако, значения подвижностей индивидуальных веществ совпадают с их значениями в модельной искусственной смеси и в препарате «Нефрамин», что свидетельствует о правильной идентификации аминокислот и возможности их количественного определения в смеси «Нефрамин» (как и в случае препарата «Гидролизин»).

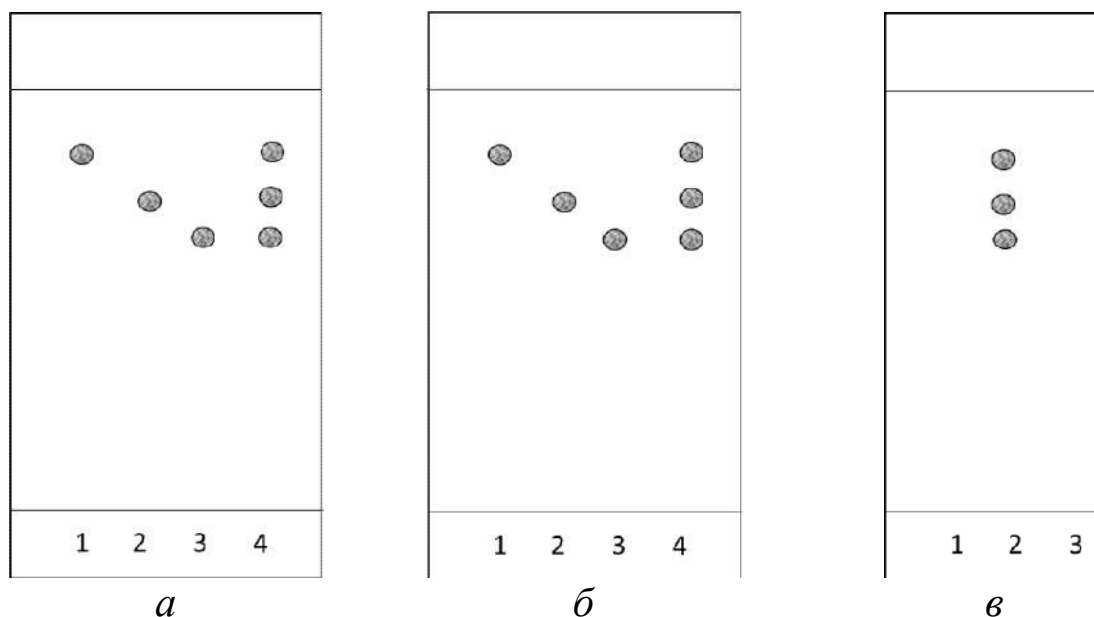


Рис. 8.8.3. Хроматограммы тирозина (1), лейцина (2), триптофана (3) на «Сорбфил» (Al): *а* - в отсутствие смеси электролитов в ЦД ПФ; *б* - в присутствии смеси электролитов в ЦД ПФ (модельный раствор); *в* - в препарате «Нефрамин»; $C_{2\text{-ГП-}\beta\text{-ЦД}} = 0,08 \cdot 10^{-2}$ М; $C_{\text{KCl}} = C_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = C_{\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0,5$ М; $C_{\text{R}} = 5,0 \cdot 10^{-2}$ М.

Выбор тирозина и триптофана для их количественного определения в препаратах, в продуктах питания не случаен. Дело в том, что эти две аминокислоты являются продуктами – антидепрессантами, которые в мозгу превращаются в «гормон счастья» - в серотонин. Наш настроение действительно зависит от этого вещества, функционирующего в нервных клетках мозга. Когда в нервных клетках мало серотонина, человек впадает в депрессию. Для увеличения концентрации «гормона счастья» в нервных клетках мозга недостаточно употреблять модные в наше время

БАДы и препараты типа «Прозак». Однако, подобные препараты от депрессии не избавят, так как они разрушаются полностью в пищеварительном тракте (задолго до того, как попадут в мозг) [1, 2, 55, 65]. Поэтому намного полезнее для людей являются продукты-антидепрессанты, которые содержат не сам «гормон счастья», а его полуфабрикат – аминокислоту триптофан. Подобно витаминам триптофан не синтезируется в организме, а получать цвиттерлит необходимо с пищей. Если его мало в рационе, то депрессии человеку избежать сложно.

Другой «полуфабрикат счастья» - аминокислота тирозин. Из него синтезируется набор веществ, поддерживающих нас в тонусе, (допамин, адреналин, норадреналин) и препятствующих развитию депрессии. При этом главным фактором не всегда является количество аминокислот. Главное – соотношение тирозина и триптофана в продуктах (табл. 8.8.2). Указанное соотношение устанавливают с помощью специального «коэффициента счастья». Если коэффициент превышает цифру 2 – продукт «очень счастливый»; если от 1 до 2 - «просто счастливый», а меньше 1 - «несчастливый».

Таблица 8.8.2. Соотношение тирозина и триптофана в продуктах (как «коэффициента счастья»).

Продукт	«Коэффициент счастья» - соотношение Тир : Три
Молоко	2,34
Яйца	1,33
Свинина	1,27
Пшеничная мука	1,23
Ягнятина	1,17
Белый рис	1,16
Курица	1,14
Семга	1,12
Говядина	1,12
Индейка	1,11
Картофель	0,84

Каждый из нас должен помнить, что для одного приема пищи лучше готовить блюда только из «счастливых» продуктов («несчастливые» могут их убить). Например, для предотвращения депрессии идеально подойдет классический завтрак из яичницы со

свиным беконом и пшеничным хлебом из муки грубого помола. Если же Вам хочется чего-то более (по Вашему мнению) приятного, сделайте йогурт с ягодами, орехами, злаками, тропическими фруктами (кроме бананов, для которых Тир:Три как 0,80).

8.9. Хроматографическое разделение и определение аминокислот в мицеллярных и циклодекстриновых фазах [98-101, 160, 208]

Результаты исследований по влиянию поверхностно-активных веществ (ПАВ), величины ионной силы раствора, природы и концентрации органического растворителя на разделение и определение цвиттерлитов в водных и мицеллярных подвижных фазах носят комплексный характер и позволяют предложить оригинальные и надежные методики анализа аминокислот в природных соединениях, пищевых продуктах и лекарственных препаратах. Объектами исследования были выбраны аланин (Ала), лейцин (Лей), фенилаланин (Фен), тирозин (Тир), триптофан (Три). В качестве ПАВ использовались додецилосульфат натрия (ДДС), бромид цетилтриметиламмония (ЦТА) и Тритон X-100 (ТХ-100). В хроматографических использованы циклодекстрины α -циклодекстрин (α -ЦД); β -циклодекстрин (β -ЦД); 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин (2-ГП- β -ЦД); гидропропил- γ -циклодекстрин (2-ГП- γ -ЦД) (Табл. 8.9.1).

Таблица 8.9.1. Физико-химические характеристики циклодекстринов.

Параметр	α -ЦД	β -ЦД	γ -ЦД
Молекулярная масса, г/моль	972,0	1135	1295
Диаметр внутримолекулярный, Å	5,7	7,8	9,5
Высота молекулы, Å	7,9	7,9	7,9
Объём внутренней полости, Å ³	17,6	34,6	51,0
Число молекул воды, способных разместиться во внутренней полости	6	11	17
Растворимость в воде при 25°С, г/100 мл.	14,5	1,85	23,2

Чистота препаратов циклодекстринов («Merck», Германия) составляла более 99%. Исходные растворы декстринов с концентрацией 0,1/0,2 М, готовят растворением точной навески в дистиллированной воде (λ -ЦД; 2-ГП- β -ЦД; ГП- γ -ЦД) или 4/8 М рас-

творе мочевины (β -ЦД) при нагревании до 40-50° с. Рабочие растворы получают разбавлением исходных непосредственно перед употреблением.

Для приготовления растворов и водно-органических подвижных фаз (ПФ) применялись следующие реактивы: ацетонитрил, «о.с.ч.», ТУ 6-09-4326-71; этанол «ректифицированный» ГОСТ 3789-89; пропанол-1, «ч.д.а.», ТУ. 6-09-783-76; пропанол-2, «ч.д.а.», ТУ 6-009-4922-77; бутанол-1, «х.ч.», ГОСТ 5208-81; бутанол-2, «ч.д.а.», ГОСТ-6016-77; этилацетат, «ч.д.а.», ГОСТ 22900-76; мочевины, «ч.», ГОСТ 6691-77; хлорид калия, «ч.», ГОСТ 4234-69; магний сернокислый 7-водный, «х.ч.», ГОСТ 4523-77; дигидрофосфат калия, «х.ч.», ГОСТ 4198-75; ацетат натрия, «ч.», ГОСТ199-78; уротропин, «ч.», ГОСТ 1381-73; уксусная кислота, «лед.», ГОСТ 61-75; серная кислота «ч.д.а.»; аммиак водный, «х.ч.», ГОСТ 3760; нингидрин, «ч.д.а.», ТУ 6-09-10-1384-79; тетразолевый синий, «ч.д.а.», ТУ 6-09-07-432-82; вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

В качестве неподвижной фазы (НВ) используются пластины ТСХ с закрепленным слоем сорбента: полярные – Сорбфил (на полимерной ПП) и алюминиевой (Al) подложке (АО «Сорбнолимер», Россия); неполярные – RP-18 («Merck», Германия); среднеполярные – Полиамид – 6 («Fluka», Германия) коммерческие пластины с УФ-индикатором. Перед хроматографированием пластины с полярным сорбентом активируют при 105°с в течение 7-10 минут.

Хроматографирование проводят методом восходящей ТСХ. При хроматографировании в водно-органических смесях хроматографические камеры предварительно насыщали парами подвижной фазы (ПФ) в течение 0.5-1.0 часа. При применении в качестве элюэтов мицеллярных и циклодекстриновых фаз хроматографирование проводят без предварительного насыщения камер. Идентификацию зон реагентов проводят по люминесценции в УФ-свете (254 и 365 нм) на видео-денситометре «Сорбфил» (АО «Сорбполимер», Россия), а также дополнительной обработкой (опрыскиванием) пластин 0,5%-ным этанольным раствором нингидрина.

Предварительными опытами устанавливают влияние природы и концентрации органического растворителя на хроматографическое поведение аминокислот, а также влияние природы неподвижной фазы (НФ) на разделение исследуемых аминокислот и на форму и размер их хроматографических зон (рис. 9.1):

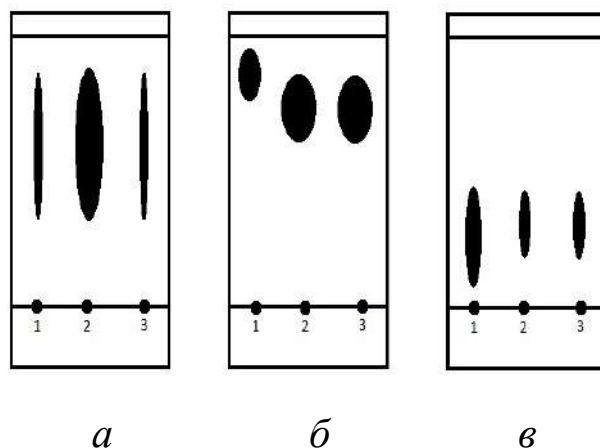


Рис. 8.9.1. Влияние природы неподвижной фазы на разделение аминокислот. ПФ: вода-этанол (40:60); НФ: *а* - Полиамид-6; *б*- Сорбфил (Al); *в* - RP-18; 1 - Тир; 2 - Три; 3 - Лей. $C_R=5 \cdot 10^{-2}M$.

Из рис. 8.9.1 следует, что на полярной неподвижной фазе (НФ) Сорбфил (Al) (рис. 8.9.1б) и неполярной НФ RP-18(рис. 8.9.1в) хроматографические зоны более компактны по форме чем на Полиамиде-6 (рис. 8.9.1а), поэтому дальнейшие исследования проводились на НФ Сорбфил (Al) и RP-18.

Хроматографическое поведение аминокислот в водно-спиртовых и ацетонитрильных подвижных фазах (ПФ) имеет ряд особенностей. Независимо от природы растворителя при его введении и увеличении концентрации в водной фазе подвижность исследуемых цвиттерлитов понижается (рис. 8.9.2).

Повышенное (более 50%) содержание органического растворителя ухудшает форму хроматографических зон, делая их более размытыми. Поэтому содержание органического растворителя в подвижной фазе не должно превышать 50% об. Оптимальной водно-органической подвижной фазой для разделения аминокислот является вода-ацетонитрил (табл. 8.9.2). Для указанной подвижной фазы при невысоких содержаниях органического растворителя (до 50% об.) селективность и эффективность разделения

исследуемых аминокислот максимальны. Наряду с этим улучшается воспроизводимость значений подвижности, что важно для количественного определения цвиттерлитов.

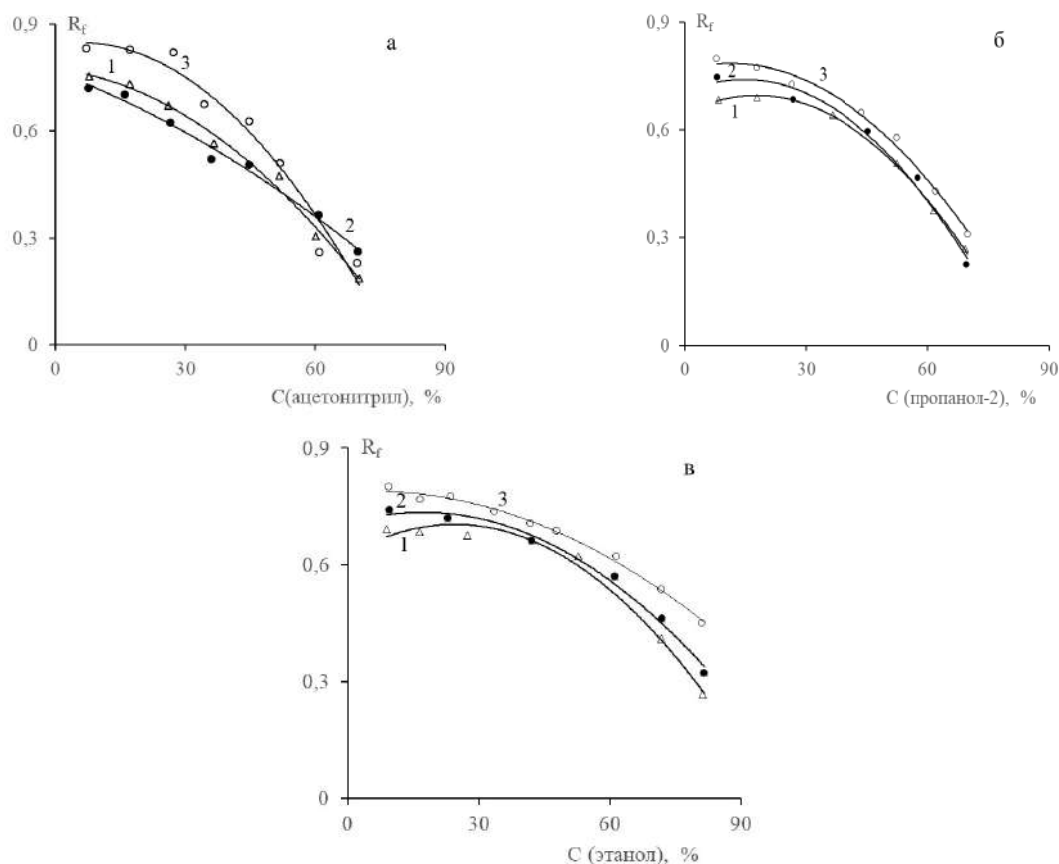


Рис 8.9.2. Подвижность аминокислот в органических растворителях. НФ: Сорбфил (Al); ПФ: а - ацетонитрил-вода; б - пропанол-2-вода; в - этанол-вода. 1 - лейцитин; 2 - триптофан; 3 - тирозин.

Таблица 8.9.2. Параметры эффективности и селективности разделения аминокислот в водно-органических ПФ («Сорбфил» (Al) $n=3$, $R=0,95$).

С об.% орг. Растворителя	Аминокислоты	Высота, экв. теор. тарелке, (H), мм	Число теор. тарелок ($N \cdot 10^{-3}$)	L*
1	2	3	4	5
ПФ:пропанол-2-вода				
10	Тирозин	0,01	9,40	-
	Лейцин	0,02	4,40	1,1
	Триптофан	0,02	6,50	1,4
50	Тирозин	0,04	2,30	-
	Лейцин	0,08	1,30	31
	Триптофан	0,17	0,60	21
80	Тирозин	0,36	0,52	-
	Лейцин	0,42	0,28	13
	Триптофан	0,42	0,24	12

Окончание табл. 8.9.2

1	2	3	4	5
ПФ: ацетонитрил-вода				
10	Тирозин	0,01	11,0	-
	Лейцин	0,01	8,5	1,3
	Триптофан	0,01	16,0	1,8
50	Тирозин	0,23	0,44	-
	Лейцин	0,21	0,48	17
	Триптофан	0,29	0,35	15
80	Тирозин	0,18	0,55	-
	Лейцин	0,10	1,00	28
	Триптофан	0,13	0,79	25

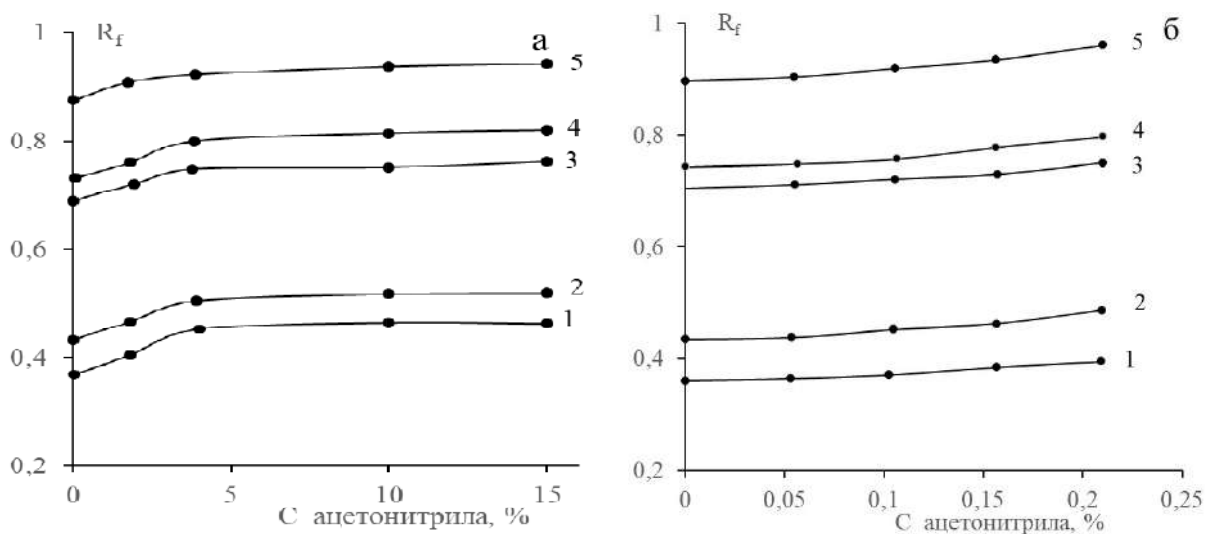


Рис. 8.9.3. Влияние концентр ($C_{об\%}$) ацетонитрила (а) и ионной силы раствора I (б) на хроматографическое поведение аминокислот. НФ: Сорбфил (Al). ПФ для 9.3а: ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – ацетонитрил (90:10); ПФ для 9.3б: ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – KCl; 1 - Тир; 2 - Ле; 3 - Три; 4 – Ala; 5 – Лиз ($C_R = 5,0 \cdot 10^{-2}$ М).

В мицеллярных подвижных фазах, содержащих ДДС с концентрацией $6,0 \cdot 10^{-2}$ М, с увеличением ионной силы подвижность всех аминокислот монотонно возрастает, хотя этот рост не превышает 0,1 значения R_f цвиттерлитов. Основным положительным фактором введения электролита в мицеллярные подвижные фазы является заметное улучшение формы зон сорбируемых аминокислот (рис.8.9.4), что подтверждается расчетами параметров эффективности и селективности разделения (табл. 8.9.3). Для мицеллярных подвижных фаз, модифицированных сильным электролитом, эффективность и селективность разделения аминокислот

значительно улучшаются. При $I = 0,10-0,15$ для всех цвиттерли-тов величина числа теоретических тарелок N увеличивается почти в 5 раз, а значения высот H теоретических тарелок (ВЭТТ) уменьшается в 5 раз. Наибольшая компактность и разрешенность зон наблюдаются для ПФ: ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – КСI ($I=0,15$).

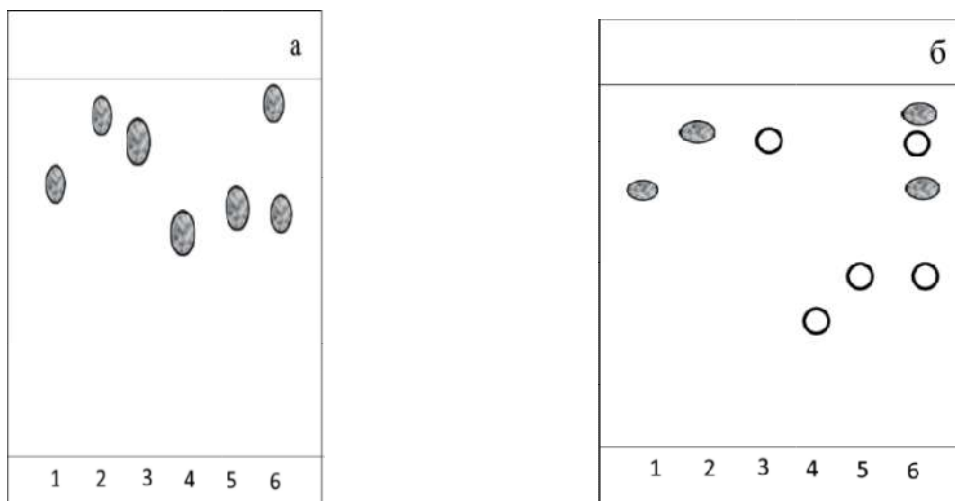


Рис. 8.9.4. ТСХ хроматограммы аминокислот: НФ Сорбфил (Al). а: ПФ ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – ацетонитрил (90:10); б: ПФ ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – КСI ($I=0,15$); 1 - Три; 2 – Лей; 3 – Ала; 4 – Тир; 5 – Лиз; 6 – смесь АК ($C_R = 5,0 \cdot 10^{-2}$ М).

Представленные результаты использованы для описания равновесных процессов, происходящих на поверхности сорбента и в растворе в мицеллярной тонкослойной хроматографии (МТСХ) согласно модели, предложенной Армстронгом и Ноумом [100, 222]. В соответствии с этой моделью и в МТСХ, и в ТСХ с циклодекстриновыми подвижными фазами (ПФ) молекулы аминокислот распределяются не только между неподвижной и подвижной фазами, но и дополнительно внутри самой ПФ (т.е. между водой и мицеллами ПАВ (рис. 8.9.5). Существование этого второго равновесия отличается от жидкостной хроматографии с водно-органическими элюентами и характеризуется в МТСХ тремя коэффициентами распределения K_{MW} (вода-мицелла); K_{SW} (вода-неподвижная фаза); K_{SM} (мицелла-неподвижная фаза):

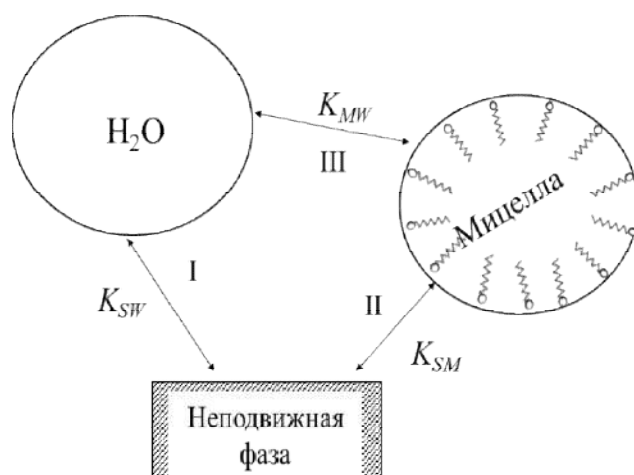


Рис. 8.9.5. Трехфазная модель мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ) [222].

Таблица 8.9.3. Параметры эффективности (N , H , R_s) и селективности (α) разделения аминокислот в мицеллярных подвижных фазах (МПФ), модифицированных сильным электролитом. НФ: Сорбфил (Al); ПФ: ДДС ($6,0 \cdot 10^{-2}$ М) – KCl ($n=3$; $P=0,95$).

№	Аминокислота	Ч. т. т., $N \cdot 10^3$	Высота эквив. теор. тарелке, H , мм	R_s^*	α
1	2	3	4	5	6
В отсутствие хлорида калия					
1	Тирозин	1,2	0,029	48	0,23
	Лейцин	1,8	0,023	63	0,32
	Триптофан	4,6	0,015	-	-
	Аланин	5,3	0,014	156	2,78
	Лизин	7,7	0,011	166	0,26
Ионная сила 0,05					
2	Тирозин	8,9	0,008	137	0,23
	Лейцин	3,3	0,013	88	0,29
	Триптофан	5,0	0,014	-	-
	Аланин	5,6	0,013	160	0,81
	Лизин	8,3	0,011	175	0,21
Ионная сила 0,10					
2	Тирозин	6,1	0,006	116	0,22
	Лейцин	8,5	0,005	143	0,26
	Триптофан	22,0	0,003	-	-
	Аланин	25,0	0,003	261	0,75
	Лизин	35,0	0,002	340	0,25
Ионная сила 0,15					
2	Тирозин	6,4	0,005	121	0,21
	Лейцин	9,2	0,005	156	0,27
	Триптофан	23,0	0,003	-	-
	Аланин	26,0	0,003	201	0,77
	Лизин	36,0	0,002	321	0,16

Окончание табл. 8.9.2

1	2	3	4	5	6
Ионная сила 0,20					
2	Тирозин	6,2	0,006	119	0,19
	Лейцин	9,0	0,006	145	0,24
	Триптофан	22,0	0,004	-	-
	Аланин	24,0	0,004	195	0,19
	Лизин	34,0	0,003	315	0,24

*Значения R_s и α аминокислот рассчитаны по отношению к триптофану.

Расчет коэффициентов распределения в системах вода-мицелла ПАВ-НФ (K_{MW} ; K_{SW} ; K_{SM}) и вода-циклодекстрин-НФ ($K_{(CD)W}$; K_{SW} ; $K_{S(CD)}$) проводят по формуле [222, 235]:

$$\frac{V_s}{V_l - V_m} = \frac{v(K_{(M/CD)W} - 1)}{K_{SW}} \cdot C_{(M/CD)} + \frac{1}{K_{S(M/CD)}}; \quad (8.9.1)$$

где V_s – объем неподвижной фазы; V_l – элюиционный объем раствора; V_m – объем подвижной фазы; v – парциальный удельный объем, мл/г; Для ДДС $v = 0,862$ мл/г; ЦПХ $v = 0,912$ мл/г; ТХ-100 $v = 0,960$ мл/г; α -ЦД $v = 1,07$ мл/г; β -ЦД $v = 1,12$ мл/г; 2-ГП- β -ЦД $v = 1,35$ мл/г, $K_{(M/CD)W}$ – коэффициент распределения аминокислоты между мицеллярной (или ЦД) подвижной фазой и водой; K_{SW} – коэффициент распределения аминокислоты между неподвижной фазой и водой; $C_{M/CD}$ – концентрация мицеллы (или ЦД) в НФ.

Для идеального хроматографического разделения выполняют соотношения:

$$K' = (V_l - V_m) / V_m \quad (2); \quad R_f = 1 / (1 + K'), \quad (8.9.2)$$

где K' – соотношение разделения (фактор удерживания).

Комбинируя (8.9.1) и (8.9.2) получают:

$$\begin{aligned} V_m(1 - R_f) &= R_f V_l - R_f V_m; \\ V_l &= V_m(1 - R_f) / R_f + R_f V_m / R_f; \\ V_l &= V_m(1 - R_f) / R_f + V_m. \end{aligned} \quad (8.9.3)$$

Выражение для V_l подставляют в (8.9.1) и получают уравнение (8.9.4) для расчета коэффициента распределения $K_{(M/CD)W}$ методом ТСХ:

$$\begin{aligned} \frac{V_S}{\left[\frac{V_M(1-R_f)}{R_f} + V_m \right] - V_m} &= \frac{v(K_{(M/CD)W} - 1)}{K_{SW}} + \frac{1}{K_{SW}}; \\ \frac{V_S}{V_m} \cdot \frac{R_f}{1-R_f} &= \frac{v(K_{(M/CD)W} - 1)}{K_{SW}} \cdot C_{(M/CD)} + \frac{1}{K_{SW}}; \\ \frac{R_f}{1-R_f} &= \frac{V_M}{V_S} \left(\frac{v(K_{(M/CD)W} - 1)}{K_{SW}} \right) \cdot C_{(M/CD)} + \frac{V_M}{V_S} \frac{1}{K_{SW}}; \end{aligned} \quad (8.9.4)$$

Уравнение (8.9.4) представляют в виде прямой $y=ax+b$, где:

$$a = \frac{V_M}{V_S} \left[\frac{(K_{(M/CD)W} - 1)v}{K_{SW}} \right]; \quad b = \frac{V_M}{V_S} \cdot \frac{1}{K_{SW}}. \quad (8.9.5)$$

При этом коэффициент a соответствует тангенсу угла наклона прямой (если график строится в координатах) $R_f/(1 - R_f) = f(C_{(M/CD)})$; а коэффициент b – равен отрезку, отсекаемому на оси ординат этой прямой (рис. 8.9.6).

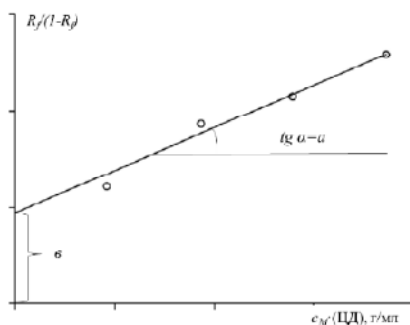


Рис. 8.9.6. Пример графической зависимости $R_f/(1 - R_f)$ от концентрации ПАВ (или ЦД в ПФ).

Из отношения коэффициентов a и b (8.9.5) получают уравнения (8.9.6) и (8.9.7); позволяющие определить коэффициенты распределения аминокислот между водой и мицеллярной (или циклодекстриновой) фазой.

$$\frac{a}{b} = \frac{V_M \cdot (K_{(M/CD)W} - 1) \cdot v \cdot K_{SW} \cdot V_S}{V_S \cdot K_{SW} \cdot V_M} = (K_{(M/CD)W} - 1) \cdot v \quad (8.9.6)$$

$$K_{(M/CD)W} = \frac{a}{bv} + 1 \quad (8.9.7)$$

Используя соотношения (8.9.5) рассчитывают коэффициенты распределения аминокислот между водой и неподвижной фазой

K_{SW} . При этом коэффициент $K_{S(M/CD)}$ определяется как соотношении двух предыдущих коэффициентов:

$$K_{(M/CD)W} = \frac{K_{SW}}{K_{(M/CD)W}} \quad (8.9.8)$$

Определение фазового отношения (V_m/V_s) проводят методом гравиметрии [225], который дает достоверные результаты для малолетучих и нелетучих подвижных фаз (каковыми являются водные растворы ПАВ или ЦД) и основан на взвешивании хроматографической пластинки до и после прохождения чистой мицеллярной (циклодекстриновой) подвижной фазы в условиях полного насыщения неподвижной фазы молекулами ПАВ или ЦД.

Для расчета коэффициента K_{SW} используют полученные значения фазового соотношения:

1) ДДС = $1,1 \pm 0,01$; ЦТА = $0,80 \pm 0,02$; ТХ-100 = $0,82 \pm 0,04$; α -ЦД = $0,81 \pm 0,02$; β -ЦД = $0,80 \pm 0,01$; 2-ГП- β -ЦД = $0,83 \pm 0,01$; (все на НФ: RP-18; $n=3$; $P=0,95$);

2) ДДС = $0,89 \pm 0,01$; ЦПХ = $0,78 \pm 0,01$; ТХ-100 = $0,85 \pm 0,04$; α -ЦД = $0,731 \pm 0,02$; β -ЦД = $0,75 \pm 0,01$; 2-ГП- β -ЦД = $0,80 \pm 0,01$; (все на НФ: Сорбфил (А1); $n=3$; $P=0,95$).

Энергии переноса аминокислот в мицеллы ПАВ (или циклодекстрины) и энергии их сорбции рассчитывают по формулам:

$$\Delta G_{пер} = -RT \ln K_{(M/CD)W} \quad (8.9.9)$$

$$\Delta G_{адс} = 2,3 \cdot RT \lg (A_s/A_m) - 2,3RT \lg [(1-R_f)/R_f] \quad (8.9.10)$$

где A_s/A_m – отношение фаз в сечении слоя («фазовое отношение»), численно равное величине V_s/V_m .

Природа и концентрация органического растворителя на хроматографическое поведение аминокислот в ТСХ систему – очень важные факторы при разделении цвиттерлитов, а также влияющие на форму и размер их хроматографических зон.

Селективность разделения аминокислот с использованием циклодекстриновых подвижных фаз (ЦД) зависит от особенностей их распределения между неподвижной фазой (НФ) и водой (K_{SW}); НФ и молекулами ЦД (K_{SCD}); распределения цвиттерлитов внутри самой ПФ (K_{CDW}), то есть в системе вода – ЦД. Аналогич-

ные процессы происходят и в мицеллярной ТСХ (табл. 8.9.3, рис. 8.9.5). Количественная оценка распределения аминокислот в циклодекстриновых подвижных фазах проводится на основе трехфазной модели по Армстронгу [222], что позволяет установить процесс, оказывающий основное влияние на подвижность цвиттерлитов в ТСХ с циклодекстриновыми подвижными фазами (рис. 8.9.7) [100, 222]:

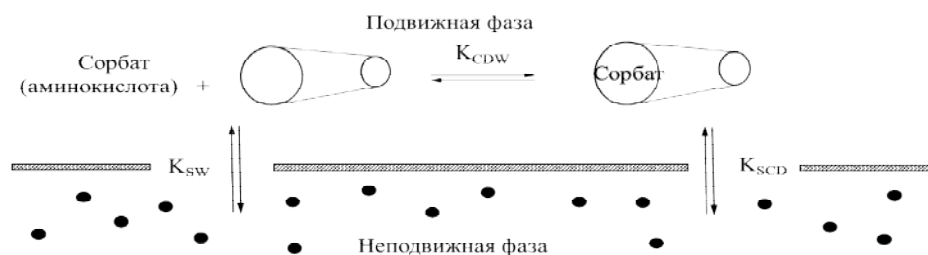


Рис. 8.9.7. Схема распределения аминокислот между неподвижной (НФ) и циклодекстриновой подвижной (ПФ) фазами.

Выявление каждого процесса, влияющего на распределение аминокислот (рис. 8.9.7) в циклодекстриновой ТСХ, проводится в соответствии с уравнениями (8.9.1-9.9.10). На основании полученных зависимостей подвижности аминокислот от концентрации циклодекстринов в подвижной фазе (рис. 8.9.8) по формулам 8.9.8-8.9.10) рассчитывают величины K_{CDW} ; K_{SW} в ЦДПФ (табл. 8.9.4).

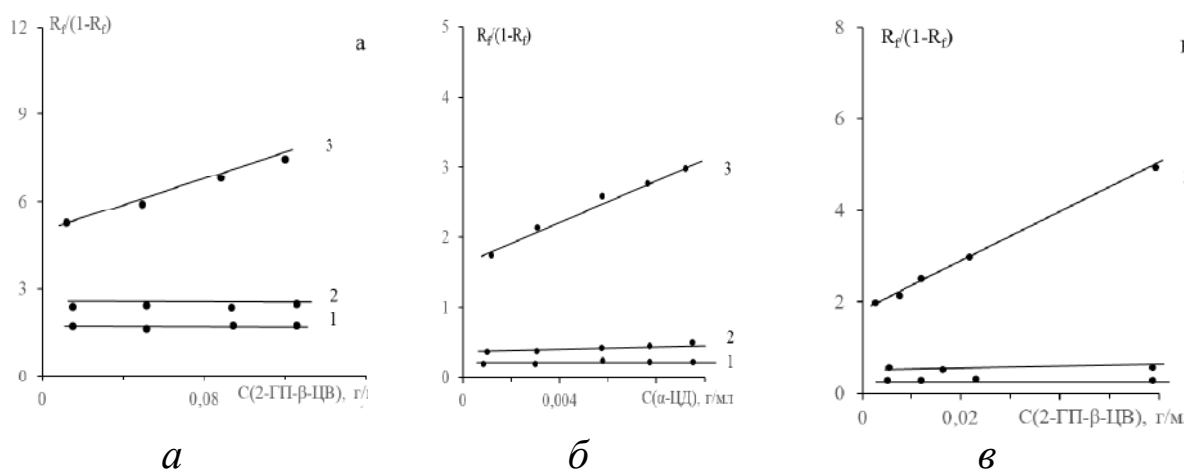


Рис. 8.9.8. Зависимость $R_f/(1-R_f)$ от концентрации $C(2\text{-ГП-}\beta\text{-ЦД})$ с НФ «Сорбфил» (а), от концентрации $C(\alpha\text{-ЦД})$ с НФ «Полиамид-6» (б); от концентрации $C(2\text{-ГП-}\beta\text{-ЦД})$ с НФ «Полиамид-6» (в).

1-а – аланин; 2-а – триптофан; 3-а – тирозин; 1-а – аланин, 2-а – триптофан; 3-а – фенилаланин; 1-а – аланин, 2-а – триптофан; 3-а – фенилаланин.

Таблица 8.9.4. Уравнения зависимостей $R_f/(1-R_f)_m$ – С(ЦД) для аминокислот.

№	Аминокислота	Уравнение	Коэффициент корреляции
НФ «Полиамид-6». ПФ – водный р-р 2-ГП-β-ЦД			
1	Аланин	$Y=2.5x+0.6$	0.97
	Триптофан	$Y=2.8x+0.4$	0.86
	Фенилаланин	$Y=5.1x+3.0$	0.98
НФ «Полиамид-6». ПФ – водный р-р α-ЦД			
2	Аланин	$Y=8.2x+0.3$	0.97
	Триптофан	$Y=29x+0.4$	0.96
	Фенилаланин	$Y=156x+2.0$	0.97
НФ «Сорбфил». ПФ – водный р-р 2-ГП-β-ЦД			
3	Аланин	$Y=2.5x+2.1$	0.97
	Триптофан	$Y=3.9x+2.6$	0.98
	Фенилаланин	$Y=26x+5.0$	0.99

Сравнение величин $\lg P$; K_{CDW} ; K_{SW} ; ΔG_{nep} и ΔG_{adc} (табл. 8.9.5) показывает, что процесс переноса аминокислот в полость циклодекстринов превышает их адсорбцию на неподвижной фазе. При этом величины констант распределения и вклад каждой константы в процесс распределения аминокислот зависит от природы циклодекстрина и гидрофобности сорбата.

Таблица 8.9.5. Коэффициенты распределения K_{CDW} ; K_{SW} ; энергия переноса ΔG_{nep} аминокислот из воды в полость циклодекстрина и энергия адсорбции ΔG_{adc} аминокислот на неподвижную фазу ($T=298K$, кДж/моль); ($n=3$; $p=0,95$).

№	Аминокислота	$\lg P$	$K_{CDW} \cdot 10^{-2}$	K_{SW}	$-\Delta G_{nep}$	$-\Delta G_{adc}$
НФ «Полиамид-6». ПФ – водный р-р 2-ГП-β-ЦД						
1	Аланин	-0,40	0,047	1,50	3,90	-4,10
	Триптофан	0,50	0,080	2,30	5,10	-3,60
	Фенилаланин	1,90	0,180	1,31	7,10	-2,10
НФ «Полиамид-6». ПФ – водный р-р α-ЦД						
2	Аланин	-0,40	0,280	3,20	8,20	-1,70
	Триптофан	0,50	0,620	1,80	10,00	0,23
	Фенилаланин	1,90	0,740	0,20	12,00	0,98
НФ «Сорбфил». ПФ – водный р-р 2-ГП-β-ЦД						
3	Аланин	0,50	0,012	0,39	0,23	0,10
	Триптофан	1,20	0,022	0,37	0,76	-0,06
	Фенилаланин	1,70	0,450	0,15	9,30	-0,91

Данные табл. 8.9.5 показывают, что процесс переноса аминокислот в полость циклодекстрина преобладает над их адсорбцией на неподвижной фазе. Результаты расчета свидетельствуют также о том, что величина константы распределения и вклад той или иной константы в процесс распределения цвиттерлитов зависят от природы циклодекстрина и гидрофобности сорбата.

Константа K_{CDW} для аминокислот в α -ЦД ПФ выше, чем в 2-ГП- β -ЦД подвижных фазах. Это может быть связано с максимальным соответствием размеров молекул аминокислот и полости α -ЦД. Как следствие, образуются более прочные комплексы включения. Константа распределения триптофана между НФ и водой на полярной НФ «Сорбфил» меньше K_{SW} на сорбенте средней полярности «Полиамид-6», что может быть связано с образованием Н-связей между триптофаном и полярными группами неподвижной фазы.

Глава 9. Химические сенсоры и мультисенсорные системы

9.1. Общие сведения о химических и биологических сенсорах

Химические сенсоры – небольшие устройства, способные непрерывно определять концентрацию химических составляющих в газах или жидкостях и превращать эту информацию в режиме реального времени в электрический или оптический сигнал.

Различают следующие функциональные элементы сенсора [154,180]:

- рецептор-элемент (функциональный материал), свойства которого изменяет определяемое вещество (электропроводность, масса, диэлектрическая константа вещества). Конструктивно рецептор представляет собой тонкую газосорбирующую пленку, оболочку оптического волокна, миниатюрную электрическую ячейку, реагирующую на определяемое вещество;

- преобразователь (транзьюсер) трансформирует отклик рецептора в электрический или оптический сигнал. Это миниатюрные устройства, работающие на различных принципах (оптические волокна, акустические приборы);

- электронное устройство «считывает» поступающий с преобразователя сигнал и обрабатывает его до необходимой формы (цифровой или пороговый сигнал).

В качестве примера (рис. 9.1.1) для ион селективного электрода химически чувствительным слоем (рецептором) служит твердая или жидкая мембрана, а преобразователь основан на электрохимическом потенциале, измеряемом с помощью вольтметра.

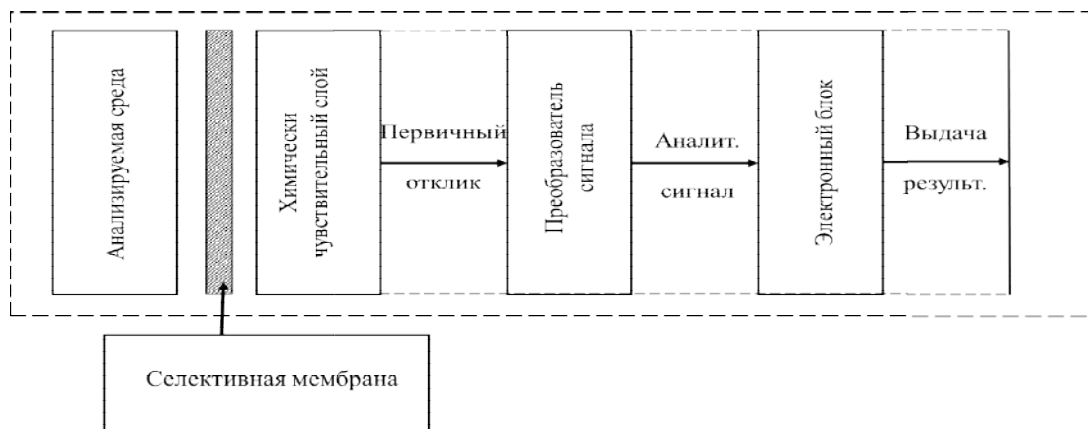


Рис. 9.1.1. Схема работы химического сенсора [154, 180, 221]

Универсального принципа создания сенсоров не существует. Каждая практическая задача требует своего подхода. Известны сенсоры, основанные на электрических, оптических, гравиметрических. Термических, механических принципах [7, 62, 48, 87]. Типичные характеристики химических сенсоров: предел обнаружения; рабочий диапазон; селективность (специфичность); дрейф сигнала; воспроизводимость; миниатюризация; механическая устойчивость; время отклика; долговременная стабильность; совместимость с меняющимися условиями (давлением, температурой, взрывоопасностью, радиоактивностью, биологическими условиями, стерилизацией).

К химическим сенсорам необходимо отнести и биосенсоры [221, 264]. Биосенсоры отличаются от химических сенсоров лишь тем, что концентрация определяемого вещества измеряется в них с помощью материала биологической природы (ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, органеллы, липосомы, рецепторы, ДНК, везикулы), генерирующие сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Для иллюстрации высокоселективных реакций, протекающих между биологическими молекулами, используется механизм, получивший название «ключ-замок».

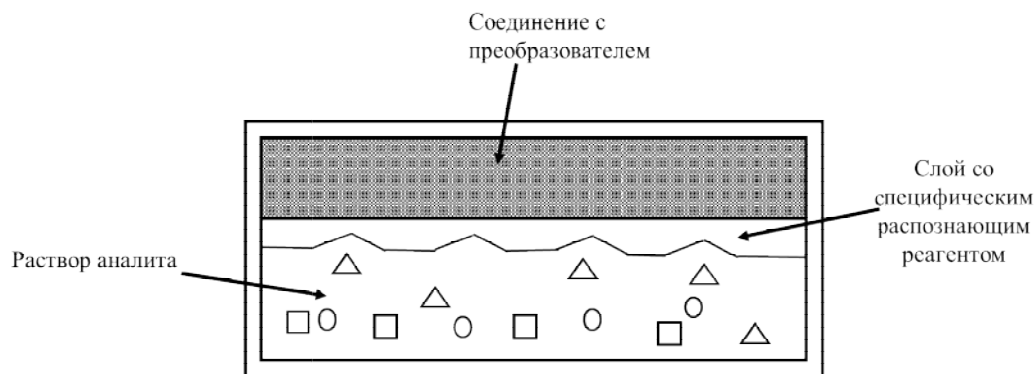


Рис. 9.1.2. Схема биосенсора.

В биосенсорах «узнающим реагентом» является макромолекула, иммобилизованная внутри мембраны, или химически связанная с поверхностью, контактирующей с раствором определяемого вещества. Между реагентом (рис.9.1.2) и определяемым веществом проходит специфическая химическая реакция (либо прямое взаимодействие иммобилизованного фермента с опреде-

ляемым веществом с образованием продукта, легко фиксируемого материалом биологической природы) [48, 62, 87, 221, 264].

Неизменность успеха и быстрое внедрение в практику сенсорных методик вызвана не только оригинальностью, но и комбинацией их с нейронными сетями. Архитектура нейронной сети (рис.9.1.3) основана для минимизации целевой функции ошибки НС, которая находится по методу наименьших квадратов:

$$E(W) = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^P (Y_j - d_j)^2 \quad (9.1.1)$$

где Y_j – реальное значение j выхода нейросети; d_j – целевое (желаемое) значение j выхода; P – число нейронов в выходном слое.

Связи между нейронами характеризуются силами связей или весами. Сети предлагаются различные данные, а весовые коэффициенты подстраиваются согласно выбранной математической схеме. После «обучения» сеть должна уметь распознавать входные данные. Информация о полученном вовремя обучения опыте хранится в виде весовых коэффициентов связей, на манер того, как это происходит в человеческом мозге.

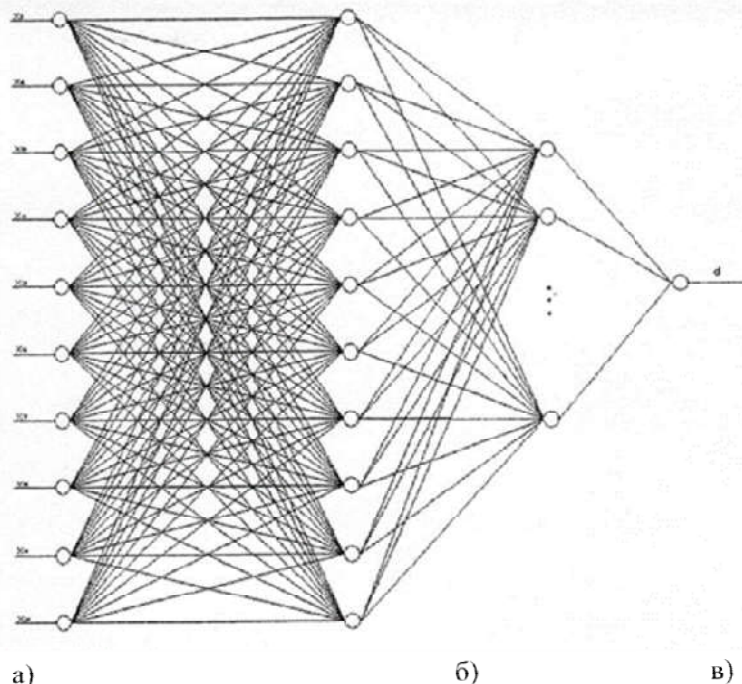


Рис. 9.1.3. Архитектура нейронной сети: *а* – входной слой, *б* – промежуточные (скрытые слои), *в* – выходной слой.

9.2. Определение глицина и глицил-глицина в водных и спиртовых растворах с применением пьезорезонансного сенсора [221]

В качестве объектов анализа выбраны глицин и глицил-глицин. Все препараты были квалификации «х.ч.». Такой выбор обусловлен тем, что глицин входит в состав большинства растительных и животных белков, а также образуется при ферментном и химическом гидролизе фосфолипидов [1, 100] относится к заменимым аминокислотам; в организме участвует в передаче нервных импульсов, очень важен для создания соединительных тканей. Успехи нейрохимии определили новые подходы использования при различных видах гипоксии аминокислот, которые являются не только предшественниками нейротрансмиттеров, но и источником энергии при гипоксии головного мозга, а также обладают многими другими функциями. В частности, глицил-глицин, содержащий аминокислотные группировки, может использоваться для анализа сфинголипидов.

При выполнении эксперимента использовании кварцевый резонатор АТ-среза (угол $35^{\circ}25'$) с серебряными электродами диаметром 5 мм и толщиной 0,3 мм (производство ОАО «Пьезокварц», Москва) с номинальной резонансной частотой колебаний 8-10 МГц.

Устройство пьезорезонансного сенсора (рис. 9.2.1) представляет собой корпус 1, выполненный из стекла с подвижным колпачком 2 (позволяющим легко и экспрессно проводить замену и модификацию сенсора), изготовленным из стекла и снабженным теплоизоляционным слоем, держателя для пьезорезонансного сенсора 3, расположенного под колпачком, пьезорезонансного сенсора 4, провода питания и передачи сигнала 5 сенсора в анализатор, например, частотомер) и крышки 6 для герметизации корпуса сенсора. Наличие подвижного колпачка 2 позволяет приводить в действие сенсор при установившемся фазовом равновесии, что существенно расширяет возможности использования устройства во время анализа. Для снижения помехи при передаче сигнала сенсора в ЭВМ, автогенератор колебаний, работающий

на частоте первой гармоники последовательного резонанса, располагали в непосредственной близости к пьезорезонатору.

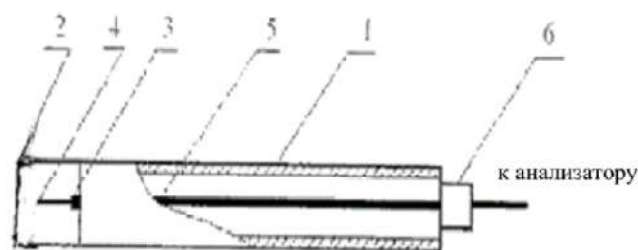


Рис. 9.2.1. Устройство пьезорезонансного сенсора.

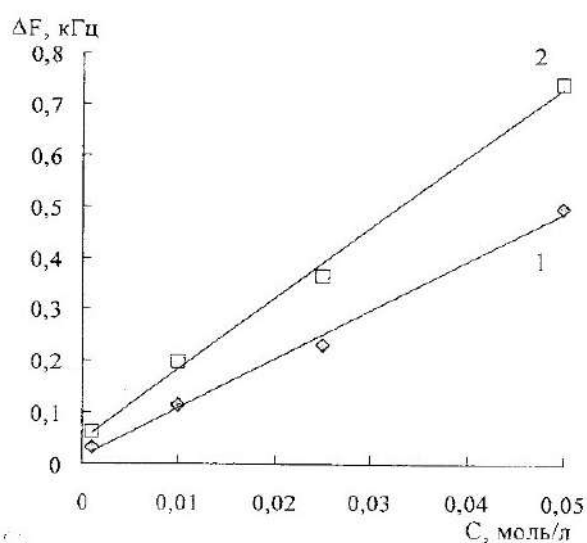


Рис. 9.2.2. Градуировочный график для определения глицина (1) и глицина-глицина (2) в водных растворах с применением пьезорезонансного сенсора.

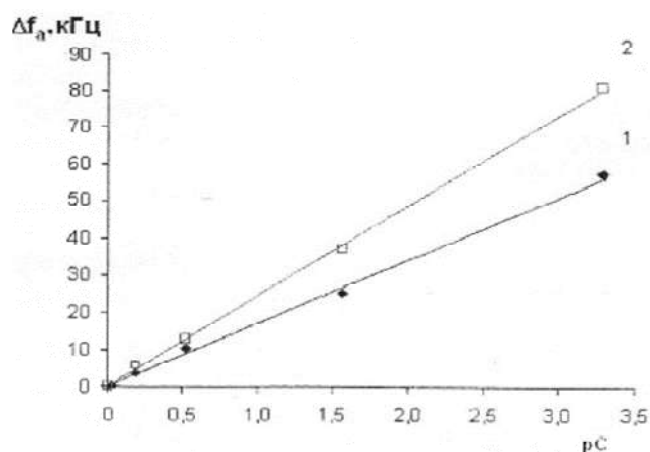


Рис. 9.2.3. Градуировочный график для определения глицина (1) и глицина-глицина (2) в спиртовых растворах с применением пьезорезонансного сенсора.

С повышением содержания аналита в пробе снижается повторяемость определений. Правильность определений контролируется методом капиллярного электрофореза. Для этого предварительно на глицин действуют раствором Na_2CO_3 и фенилизотиоцианата (ФТК) для дериватизации. Затем полученную смесь выпаривают при температуре 30-35 °С, а сухой остаток растворяют в 500 мм³ дистиллированной воды. Полученные таким образом ФТК-производные аминокислоты помещают в пробирку «Eppendorf», центрифугируют (п-6000 об/мин) и помещают во входной карусели автосемплера прибора «Капель-105». В качестве электролита применяют фосфатный буферный раствор (рН=9,13), ввод пробы осуществляют при давлении $p = 30$ мбар, длина волны $\lambda = 254$ нм, температура анализа 30°С. В этих условиях продолжительность анализа составляет 15-20 мин [7].

В таблице 9.2.1 приведена сравнительная характеристика предлагаемого способа и метода капиллярного электрофореза при определении глицина.

Таблица 9.2.1. Сравнительная характеристика метода капиллярного электрофореза и способа определения глицина с применением пьезорезонансного сенсора.

Характеристики метода	Капиллярный электрофорез	С применением пьезорезонансного сенсора
диапазон определяемых содержаний $D \cdot 10^3$, моль/дм	4-1500	30-500
Погрешность анализа ε , %	5	<10
Продолжительность анализа τ , мин	15-20	2-3
Вспомогательные реагенты	Необходимы	Отсутствуют
Температура анализа t , °С	30	20±2

9.3. Определение углеводов в водных растворах с использованием пьезорезонансного сенсора [221]

Определение углеводов проводят методом ВЭЖХ в изократическом режиме с использованием силикагелевых и полимерных композитов с привитыми аминопропильными группами или ка-

тиообменников. Детекторами в этих методиках служат рефрактометры или УФ-спектрометры. Количественное определение углеводов возможно также методом тонкослойной хроматографии [19,46, 74, 89, 135,146, 22]. Достойным дополнением вышеназванным методам определения углеводов является анализ использованием сенсоров различного типа.

В качестве объектов анализа выбраны глюкоза и сахароза (как компонент ферментативного или химического распада сфинголипидов, фосфолипидов, ДНК в биологических мембранах). Все препараты были квалифицированы как «х.ч.» В работе использованы пьезорезонаторы АТ-среза с номинальной частотой колебаний 8 МГц, способные функционировать в широком диапазоне температур (производитель ОАО «Пьезо», Москва).

Устройство пьезорезонансного сенсора (рис. 9.3.1) представляет собой корпус 1, выполненный из стекла с подвижным колпачком 2 (позволяющим легко и экспрессно проводить замену и модификацию сенсора), изготовленным из стекла и снабженным теплоизоляционным слоем, держателя для пьезорезонансного сенсора 3, расположенного под колпачком, пьезорезонансного сенсора 4, провода питания и передачи сигнала 5 сенсора в анализатор, например, частотомер) и крышки 6 для герметизации корпуса сенсора.

Устройство работает по следующей схеме. Анализируемую жидкую пробу шприцем закачивают в измерительную ячейку, в которой расположен подготовленный пьезорезонансный сенсор (предварительно сенсор выдерживают в дистиллированной воде несколько минут до получения стабильного аналитического сигнала и измеряют показания). Секундомером отсчитывают время, по истечении которого сигнал пьезокварцевого сенсора не изменяется. Проводят несколько параллельных измерений. Разность между сигналами пьезосенсора до и после контакта с аналитом, содержащей исследуемый компонент, служит характеристикой количественных определений.

По окончании анализа из измерительной ячейки удаляют исследуемую пробу, регенерируют дистиллированной водой до выхода сигнала сенсора на начальный уровень. После этого сенсор готов для проведения следующего (измерения) анализа.

Особенностью конструкции применяемого пьезорезонансного сенсора является наличие измерительной ячейки вместимостью 3 см³, а также возможность проведения измерения с использованием ЭВМ. Генератор колебаний ПрС содержит преобразователь, позволяющий заводить сигналы сенсора на ЭВМ и проводить дальнейшую обработку полученных данных.

На рисунке 9.3.2 приведена сенсограмма определения глюкозы в водном растворе с использованием пьезорезонансного сенсора. Градуировочные графики (сенсограммы) носят нелинейный характер, что может быть обусловлено влиянием на сигнал сенсора не только содержания аналита, но и вязкостью и плотностью растворов глюкозы и сахарозы.

На рис. 9.3.2 и 9.3.3 четко проявляются характерные максимумы, приходящиеся на содержание глюкозы 0,12 моль/дм³ и 0,10 моль/дм³ для сахарозы.

Безусловно, метод требует дальнейших доработок, однако даже полученные результаты уже позволяют рекомендовать пьезорезонансный сенсор для экспрессного контроля содержания углеводов (например, глюкозы, сахарозы) в водных растворах.

К сожалению, экспериментальная зависимость сигналов ПрС от содержания аналитов в пробе носит нелинейный характер (рис. 9.17 и 9.18) этот факт, конечно же, существенно снижает достоинства разработанного метода по сравнению с существующими методиками.

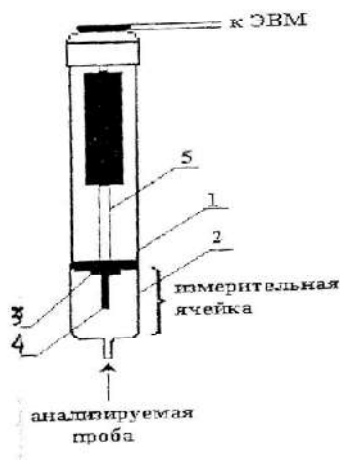


Рис. 9.3.1. Устройство пьезорезонансного сенсора.

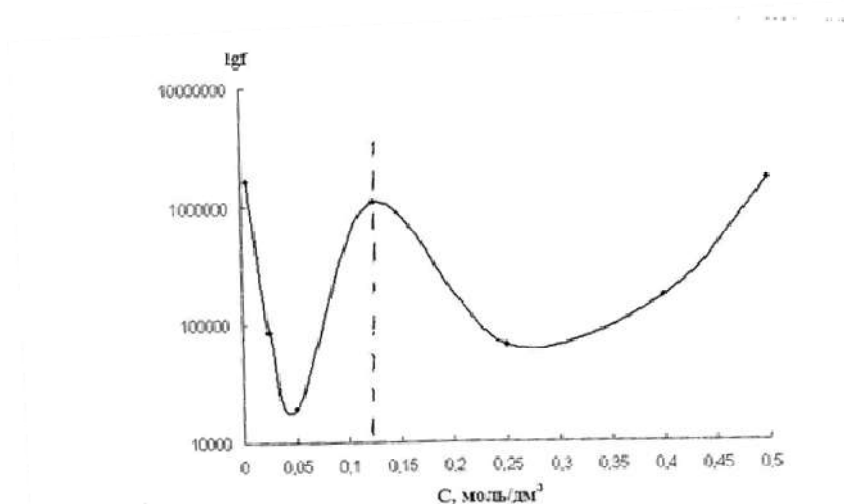


Рис. 9.3.2. Сенсограмма определения глюкозы в водном растворе с использованием предлагаемого сенсора.

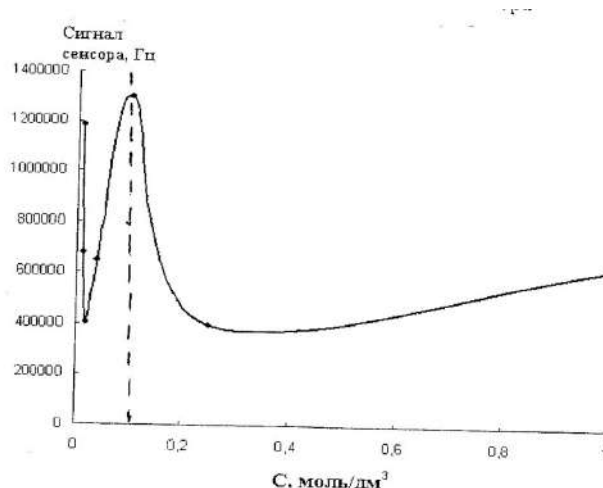


Рис. 9.3.3. Сенсограмма определения сахарозы в водном растворе с использованием предлагаемого сенсора.

9.4. Экспресс-оценка качества бензинов пьезорезонансными сенсорами [76, 221]

Данная оценка проведена на примере товарных бензинов А-76 и АИ-92. Исследования осуществляли с помощью кварцевых резонаторов АТ-среза (с номинальной частотой колебаний 8-10 МГц). Модификаторами-сорбентами пьезорезонансных сенсоров (ПрС) служили полиметилфенилсиликон (ПМФС) и сквален (Ск), которые стабильны при получении аналитического сигнала ПрС.

Снижение рабочей частоты колебаний ПрС рассчитывается по уравнению Зауэрбрея:

$$\Delta f = -2,3 \cdot 10^{-6} \cdot f_o^2 \cdot \Delta m / A \quad (9.4.1)$$

где Δf – изменение частоты резонатора, Гц; f_o – резонансная частота пьезосенсора, МГц; Δm – масса модификатора, г; A – площадь поверхности модификатора (принята равной площади электродов), см².

При разработке экспресс-оценки реального качества товарных бензинов учитывалась большая привлекательность методов, позволяющих оценивать обобщенные (интегральные) показатели анализируемого образца. Очевидно, что из определенного каким-либо методом октанового числа (которое используется для получения фальсифицированного бензина), (например, если оно будет равно 76), совершенно не следует, что анализируемый бензин соответствует марке А-76. Результаты анализа показывают лишь его октановое число и, соответственно, такой вариант оценки качества товарного бензина может привести к ошибочным выводам. В связи с этим предложена экспресс-оценка соответствия продукта реальной товарной марки конкретному стандарту, в основе которой используется мультисенсорная система, сформированная из неселективных сенсоров.

Разработанный способ основан на применении мультисенсорной системы [221], сформированной из шести пьезорезонансных сенсоров, модифицированных скваленом и ПМФС, что позволяет в течение 3-х минут провести экспресс-оценку качества товарных бензинов. Для построения суммарного сигнала системы в виде «визуального отпечатка» применяется профильный анализ, который основан на объединении отдельных обонятельных и других параметров бензина для получения качественно новой характеристики продукта. Полученные результаты (после статобработки) представлены графически в виде профилей полной окружности (рисунок 9.4.1). Из рисунка следует, что товарные бензины марок А-76 и АИ-92 на двух различных автозаправочных станциях (образцы А, Б, В, Г), к сожалению, существенно отличаются по «визуальным отпечаткам», что может быть обусловлено не только различной технологией их получения.

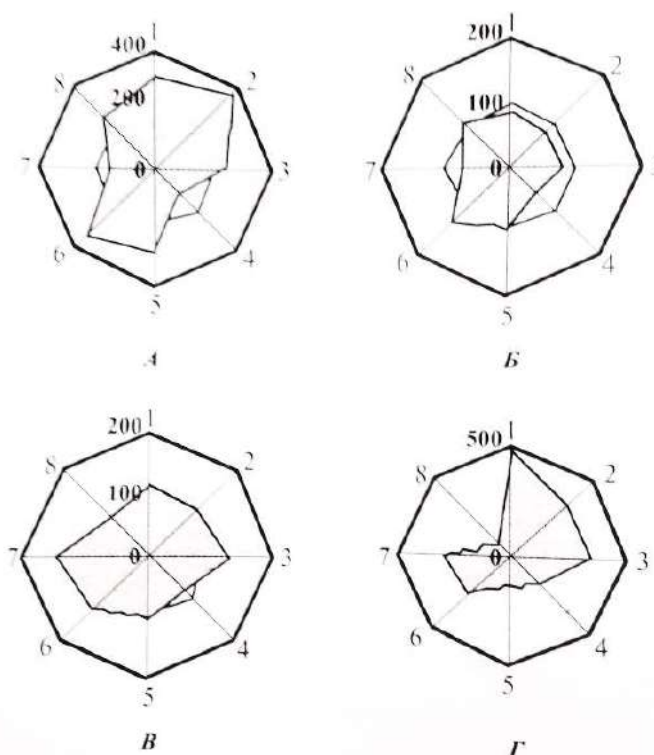


Рис. 9.4.1. «Визуальные отпечатки» образцов бензина, приобретенных на двух АЗС Тюменской нефтяной компании: А, В – А-76; Б, Г – АИ-92.

Выделены наиболее информативные пьезорезонансные сенсоры и алгоритмы фиксирования их сигналов в парах анализируемых бензинов, обеспечивающие получение различных «визуальных отпечатков» продуктов. На основании сигналов пьезорезонансных сенсоров, выбранных для максимального распознавания аналитов по суммарному отклику («визуальному образу»), составлена мультисенсорная система для анализа исследуемых бензинов [76, 221]. Оптимизация алгоритма формирования откликов матрицы из шести и более сенсоров позволяет получить «визуальные отпечатки аналитов», значительно отличающихся друг от друга. Сопоставляя эти отпечатки можно выделить, во-первых, для всех исследуемых товарных бензинов характерные геометрические образы («визуальные отпечатки») и во-вторых, осуществить быстрое ранжирование сенсоров с максимальной и минимальной чувствительностью к парам исследуемых бензинов [76, 221].

9.5. Определение глицина в модельных растворах и лекарственном препарате [221]

Высокая чувствительность и развитая теория пьезокварцевого микровзвешивания способствовали широкому применению кварцевых резонаторов: при исследовании механизма сорбционных процессов, при изучении химических реакций, происходящих на поверхности электродов-резонаторов; при анализе газовых смесей. По сравнению с исследованиями для газовых фаз изучению процессов пьезокварцевого микровзвешивания в жидких средах посвящено сравнительно небольшое число работ. Между тем, высокая чувствительность метода; применение биополимеров для модификации поверхности электродов пьезокварцевого резонатора; теоретические разработки для ансамблей поверхностно-активных веществ как супрамолекулярных структур позволяют распространить пьезокварцевую сенсорику на систему «жидкость – твердое тело».

Конструирование из измерительной ячейки для пьезокварцевого резонатора (ПКР) в жидких средах является важной задачей. Необходимо при проектировании ячейки исключить все радиотехнические наводки, действующие на тонкую пластинку пьезокварцевого резонатора (при рабочей частоте 5-10 МГц), погруженную в жидкость. Плоскость резонатора располагается под углом к уровню жидкости так, чтобы при перемешивании раствора воздушные пузырьки не скапливались у поверхности резонатора (рис. 9.5.1). Классическая схема их измерения частоты пьезокварцевого резонатора состоит из частотомера, генератора сигналов и самого пьезорезонатора (ПЗР).

В работе используется модифицированный автогенератор для пьезокварцевого микровзвешивания в жидкости, работающий на частоте первой гармоники последовательного резонанса пьезокварцевого резонатора с номинальной частотой 5 МГц. В жидкости (наряду с собственной резонансной, зависящей от массы и толщины кристалла, частотой, которая уменьшается пропорционально массе адсорбированного вещества в газовой фазе) на частоту кварцевого резонатора влияют также вязкость и плотность раствора. Поэтому в работе используется дополнительно (к схеме

на рис. 9.5.2) активный элемент, построенный на транзисторно-транзисторной логике (ТТЛ) и выполнены по ТТЛ-микросхеме. Кроме того, этот активный элемент дополнен резистором R2 и третьим элементом микросхемы (инвентором) (рис. 9.5.2). Резистор R2 исключает возможность паразитного самовозбуждения; снижает мощность, рассеиваемую на кварцевом резонаторе, что обеспечивает стабильную частоту. Сам инвентор является буферным элементом, способствующим стабильности частоты (генератор имеет нестабильность частоты не более $\pm 0,1 \dots 0,2 \cdot 10^{-6}$ Гц) [221].

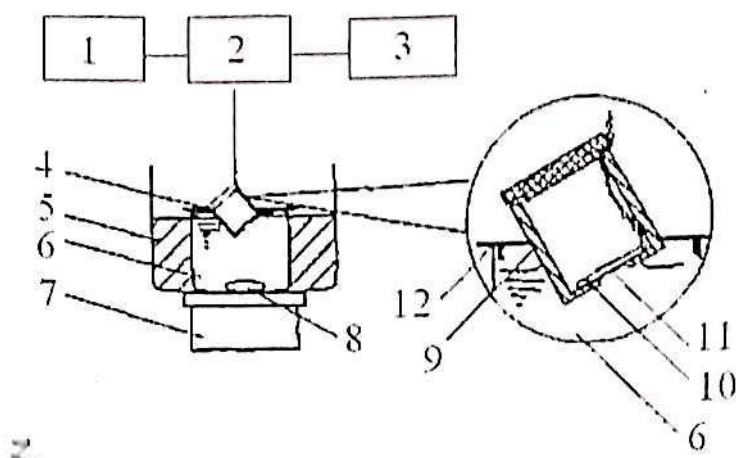


Рис.9.5.1. Блок-схема установки и конструкция ячейка для работы пьезокварцевого резонатора в жидкости:

1 – частотомер; 2 – генератор; 3 – источник питания; 4 – ячейка; 5 – термостат; 6 – сосуд с измеряемой жидкостью; 7 – нагреватель; 8 – магнитная мешалка; 9 – корпус ячейки; 10 – резонатор; 11 – электрод; 12 – крышка.

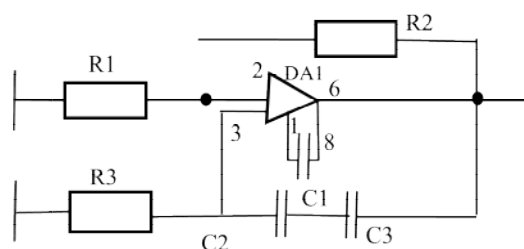


Рис. 9.5.2. Элемент схемы автогенератора, работающего на частоте первой гармоники последовательного резонанса для ПЗР с номинальной частотой 5 МГц [221].

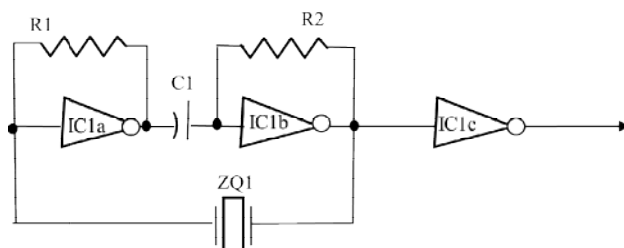


Рис. 9.5.3. Принципиальная схема высокочастотного генератора IC a...c – микросхема; R1, R2 – резисторы; C1 – конденсатор; ZQ1 – пьезокварцевый резонатор.

В методике для определения глицина используется способ создания искусственных рецептов на пьезоподложке, способных к распознаванию и связыванию молекул – мишеней с высокой специфичностью (получивших название «полимеры с молекулярными отпечатками») (ПМО). Полимеры с молекулярными отпечатками (или синтетические молекулярно-импринтированные полимеры (МИП) получаются в результате молекулярного импринтинга – сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов (templatt – траффарет) или импринт-молекул (imprint-отпечаток) [213, 214].

При полимеризации (рис. 9.5.4) комплекса мономеров с шаблонами фиксируется в определенных позициях жесткой полимерной структуры. Последующее удаление шаблона путем экстракции или химического разрушения связей «шаблон-сополимер» приводит к возникновению в полимере молекулярных отпечатков – полостей, комплементарных шаблону по размеру, форме и расположению функциональных групп. Благодаря «молекулярной памяти», заложенной в сверхсшитой полимерной решетке, эти участки способны к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом [221, 264].

В работе используются сенсоры, модифицированные полимером на основе частично имидизированной полиаминокислоты с молекулярным отпечатком глицина. Для этого сенсор закрепляют в горизонтальном положении.

Определение глицина проводят на установке, приведенной на рис. 9.5.5 В начале включают прибор и регистрируют показания сенсора без нагрузки «на воздухе». Затем на поверхность электрода микрошприцем ($V=10$ мкл) наносят дистиллированную во-

ду и регистрируют сигнал f_1 . Воду удаляют полоской фильтровальной бумаги. Когда через 5-10 сек показания сенсора вернуться к исходному значению «на воздухе», наносят такой же объем анализируемого раствора и записывают сигнал f_2 . Считывание сигнала проводят через каждую секунду, регистрируя 10 значений. После этого раствор удаляют полоской фильтровальной бумаги. Относительный сдвиг частоты Δf вычисляют по уравнению:

$$\Delta f = f_1 - f_2$$

где f_1 – частота колебаний сенсора в дистиллированной воде, кГц; f_2 – частота колебаний сенсора в анализируемом растворе, кГц.

По полученным результатам строятся графики зависимости разности частот колебаний пьезорезонатора в воде и в растворах глицина (рис. 9.5.6) от концентрации аминокислоты.

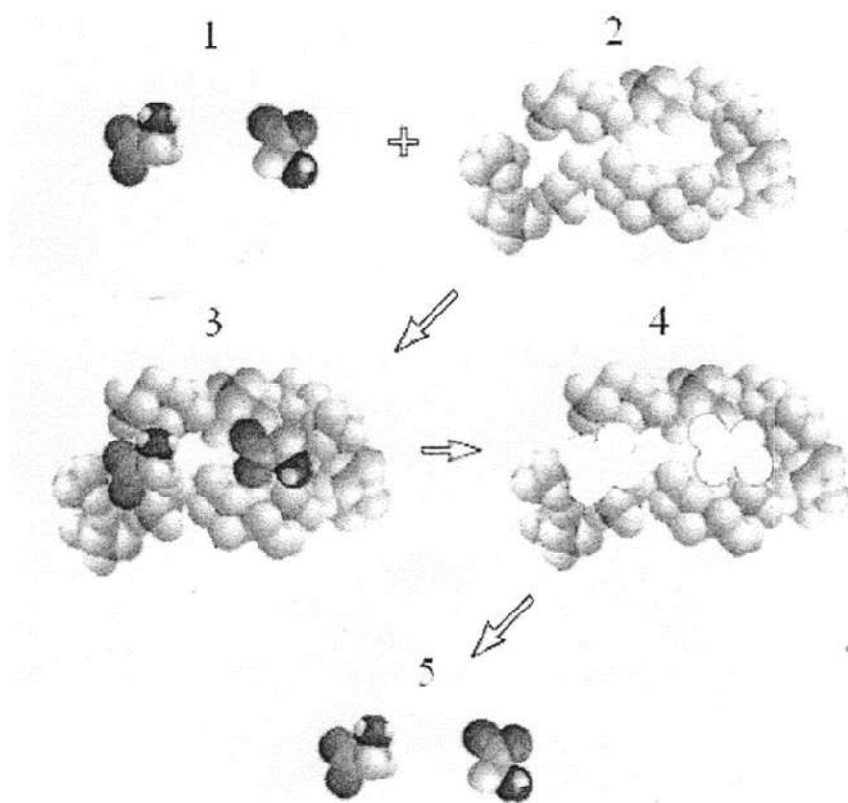


Рис. 9.5.4. Схема синтеза полимерных материалов с молекулярными отпечатками: 1 – молекулы шаблоны; 2 – мономер; 3 – полимер, содержащий молекулы-шаблоны; 4 – полимер, содержащий молекулярный отпечаток; 5 – молекулы-шаблоны экстрагированные из полимера.

Стандартные растворы аминокислот с концентрацией 0,1 моль/л готовят по навеске, взятой на аналитических весах с точностью до $2 \cdot 10^{-4}$ г. Методом последовательного разбавления готовят серию растворов с концентрациями от 0,1 до 10^{-7} моль/л. После эксперимента сенсор помещали в сушильный шкаф на 1 час при температуре 50°C для возвращения частоты колебаний кварца к нормальной.

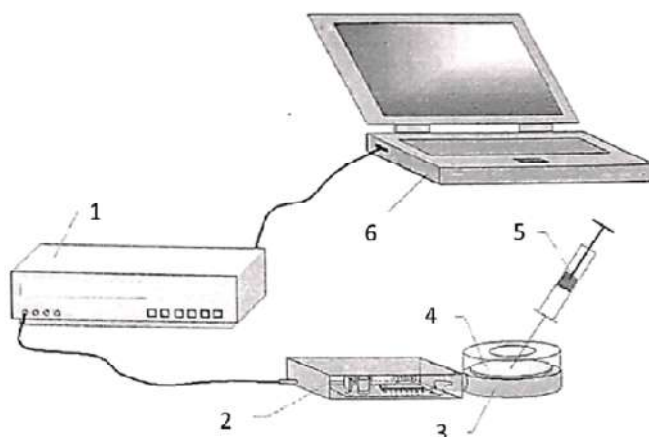


Рис. 9.5.5. Схема установки для определения аминокислот с пьезокварцевым детектором: 1 – частотометр; 2 – генератор; 3 – петлевой кран-дозатор; 4 – пьезосенсор; 5 – шприц для ввода пробы; 6 – компьютер.

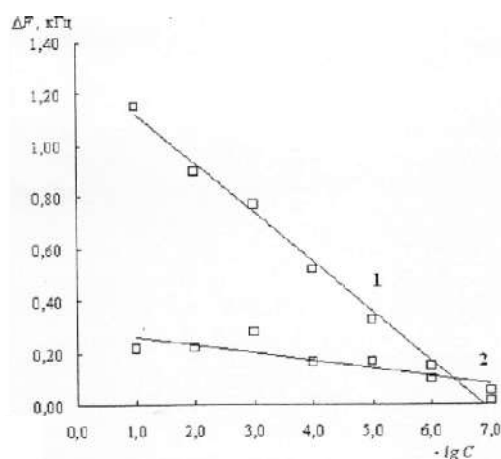


Рис. 9.5.6. График зависимости аналитического сигнала модифицированного пьезосенсора от концентрации растворов глицина.

1 – сенсор, модифицированный полимером с молекулярным отпечатком глицина; 2 – сенсор, модифицированный полимером сравнения.

Сенсоры, модифицированные полимером с молекулярным отпечатком глицина, получают по методике, представленной в

[192]. В аналогичных условиях, но без шаблона-глицина готовят полимер сравнения.

Экспериментально определенный предел обнаружения составил 10^{-6} моль/дм³. Для глицина частота колебаний пьезорезонатора в растворе с концентрацией 10^{-7} моль/дм³ была близка к частоте колебаний пьезорезонатора в дистиллированной воде.

Проведенный анализ позволил утверждать, что пьезосенсор, модифицированный ПМО применим для определения глицина в водных растворах. Градуировочный график глицина описывается уравнением прямой ряда $\Delta F = -0,1907C_{\text{Gly}} + 1,3078$, $R^2 = 0,99$.

Детектирование глицина с применением пьезорезонансного сенсора проводили в модельных растворах и лекарственном препарате «Глицин». Проверку правильности определения глицина с помощью пьезорезонансного сенсора выполняли методом «введено – найдено» (табл. 9.5.1).

Таблица 9.5.1. Определение аминокислот в водных растворах с использованием модифицированного пьезорезонансного сенсора.

Концентрация аналита, г/л		S _r , %
введено	найдено	
Глицин		
7,5	7,4	8,8
0,8	0,8	5,7
0,1	0,09	4,9
Лекарственный препарат «Глицин»		
7,5*	7,5	5,2
7,5**	7,4	9,6

Примечание:

- пробоподготовка проводилась по ГОСТу
- таблетка растворялась в дистиллированной воде

По графикам видно, что чувствительность модифицированного пьезосенсора выше чувствительности сенсора сравнения. Кроме того низкая величина тангенса угла наклона и коэффициент детерминации не позволяют использовать эту градуировочную зависимость для определения глицина в водных растворах.

9.6. Определение степени свежести мяса прудовой рыбы [221]

Сразу после «засыпания» рыбы в тушке концентрируется триметиламин, содержание которого растет по мере снижения свежести. Поэтому для характеристики свежести рыбной продук-

ции используется показатель содержания триметиламина в паровой фазе над рыбой.

На рис. 9.6.1 приведены типичные сигналы пьезосенсора по отношению к различным концентрациям триметиламина, из которого следует, что сигнал пьезосенсора возрастает с увеличением концентрации триметиламина вплоть до его содержания 250 ppm. Полученная градуировочная зависимость нелинейна до содержания триметиламина в пробе 250 ppm, что обусловило построение в логарифмических координатах (рис. 9.6.2).

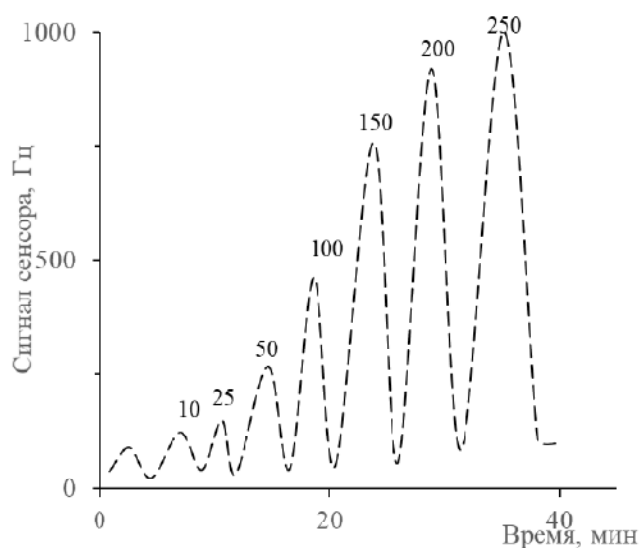


Рис. 9.6.1. Сигналы пьезосенсора по отношению к различным концентрациям триметиламина (концентрация в ppm).

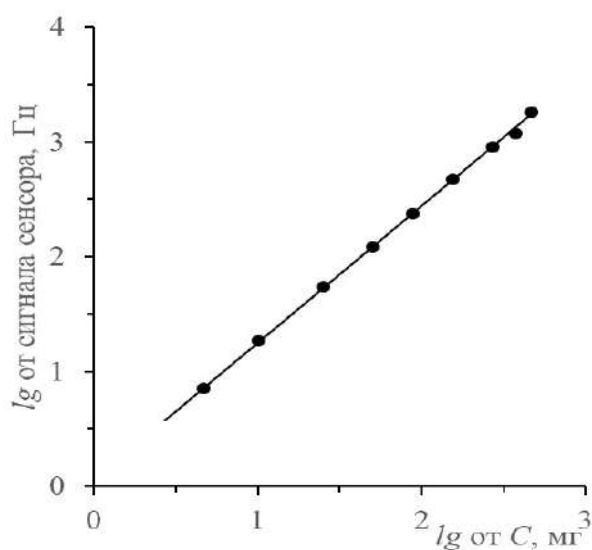


Рис. 9.6.2. Градуировочный график зависимости концентрации триметиламина.

Зависимость степени свежести рыбы носит экспериментальный характер и описывается уравнением:

$$C = a (b - \exp(-d\tau)), \quad (9.6.1)$$

что позволяет определить время хранения рыбы по выражению:

$$t = (\lg C/ab) / \alpha \quad (9.6.2)$$

где C – концентрация, млн^{-1} ; a , b , α – коэффициенты, зависящие от химической природы рыбы. Например, для анализируемого мяса щуки $a = 6,74$, $b = 0,16$, $\alpha = 0,075$. При этом коэффициент детерминации $r^2 = 0,99$.

Список использованной литературы

1. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки / А. Ленинджер; под ред. А.А. Баева и Я.М. Варшавского. - Москва: Мир, 1976. – 957 с.
2. Щербаков В.Г. Технология получения растительных масел / В.Г. Щербаков. – Москва: Колос., 1992. – 207 с.
3. Арутюнян Н.С., Корнена Е.П. Фосфолипиды растительных масел / Н.С. Арутюнян, Е.П. Корнена. – Москва: Агропромиздат, 1986. - 256 с.
4. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Л.В., Молотковский Ю.Г. Препаративная биохимия липидов / Л.Д. Бергельсон, Л.В. Дятловицкая, Ю.Г. Молотковский. – Москва: Наука, 1981. – 256 с.
5. Технология производства растительных масел / под ред. проф. В.М. Копийского и доц. С.И. Данильчук. - Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1982. - 416 с.
6. Пчелкин В.П. Количественная оценка результатов обращенно-фазового фракционирования природных фосфатидилхолинов и продуктов их гидролиза // Журнал аналит. хим. - 1997. - Т.52. №2. – С. 118-125.
7. Мясоедов Б.Ф. Химические сенсоры: возможности и перспективы / Б.Ф. Мясоедов, А.В. Давыдов // Журн. аналит. химии. - 1990. - Т.45. №7. - С. 1959-1978.
8. Селеменев В.Ф. Энергетические и спектральные характеристики Н-связей фосфолипидов // В.Ф. Селеменев, Г.Ю. Орос, С.А. Железной, А.С. Шестаков, Т.А. Железная, Е.Ф. Сафонова, В.Н. Болотов, О.Б. Рудаков // Журн. физич. химии. - 2001. - Т.75. №4. - С. 735-741.
9. Щипунов Ю.А. ^{31}P - ЯМР-Исследования взаимодействия лецитина с полярными растворителями/ Ю.А. Щипунов, Е.В. Шумилина, В.В. Коньшин, Б.Н. Чернышов // Журн. физич. химии. – 1997. – Т.71 - №3. – С. 564-568.
10. Васильев В.П. Термодинамика кислотно-основного взаимодействия в водном растворе 1-аминоэтилен-1,1-дифосфоновой кислоты/ В.П. Васильев, Л.А. Кочергина, В.В. Черников, С.Г. Грошева, М.М. Григорович // Журн. физич. химии. – 1997. - Т.71. №3. - С. 443-446.

11. Пчелкин В.П. Оценка чистоты фракций после разделения методом адсорбционной тонкослойной хроматографии ненасыщенных полярных липидов в присутствии ионов серебра // Журн. аналит. химии. – 1997. - Т.54. №4. - С. 342-347.

12. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи К. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / под ред. В.И. Розенгарта. - Москва: Мир, 1982. - 446 с.

13. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии/ под ред. А. Хенмен и др. - Москва: Мир, 1988. - 688 с.

14. Хайс И.М., Мацек К. Хроматография на бумаге / И.М. Хайс, К. Мацек. - Москва: ИЛ, 1962. - 851 с.

15. Беленький Б.Г. Тонкослойная хроматография в России / Б.Г. Беленький, Е.А. Гурковская, Ю.Д. Коган, В.Д. Красиков // 100 лет хроматографии. - Москва: Наука. - 2003. - С. 61-99.

16. Ларионов О.Г. Применение и перспективы использования хроматографии физико-химических исследованиях / О.Г. Ларионов, Л.Д. Белякова, А.К. Буряк, О.Г. Татаурова // 100 лет хроматографии. - Москва: Наука. - 2003. - С.439-477.

17. Ревельский И.А. Идентификация компонентов сложных смесей. Количественный анализ без градуировки. Новые подходы к контролю качества химической продукции и эколого-аналитическому контролю/ И.А. Ревельский, В.Г. Караваева, Ю.С. Яшин, Х.Э. Аавик, Б.Н. Белов, Б.И. Зирко, Е.Н. Капинус, Э.Д. Вирюс, И.Н. Глазков, Д.Ю. Полухин, П.П. Вулык, О.В. Напалкова, А.И. Ревельский // 100 лет хроматографии. - Москва: Наука. - 2003. - С. 529-545.

18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: В 3 т. / М. Диксон, Э. Уэбб; пер. с англ. Л.М. Гинодмана, М. И. Левянт; под ред. В.К. Антонова, А.Е. Браунштейна. - Москва: Мир, 1982. - 1120 с.

19. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюэнт в жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменев. – Воронеж: ВГУ, 2003. - 300 с.

20. Рудаков О.Б. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии/ О.Б. Рудаков, И.А. Востров, С.В. Федоров, А.А. Филиппов, В.Ф. Селеменев, А.А. Приданцев. – Воронеж: Водолей, 2004. - 528 с.

21. Сафонова Е.Ф. Изучение сорбции фосфатидилхолина с сорбентами различного типа / Е.Ф. Сафонова, В.Ф. Селеменев, А.И. Сливкин, Е.Н. Порядная, Т.А. Брежнева // Хим. фарм. журн. - 2004. - Т.38. №7. – С. 38-40.

22. Назарова А.А. Идентификация и определение чистоты и структуры фосфатидилхолина фосфатидилэтаноламина методом ИК-спектроскопии / А.А. Назарова, С.И. Карпов, Е.Ф. Сафонова, В.Ф. Селеменев, О.Б. Рудаков // Сорбционные и хроматограф. процессы. - 2005. - Т.5. №3. - С. 390-397.

23. Селеменев В.Ф. Безреагентные ионообменные методы выделения физиологически активных веществ //Ведущие научно-педагогические коллективы, под ред. А.С. Сидоркина. - Воронеж: ВГУ. - 2003. - С. 317-334.

24. Рудаков О.Б. Тетрагидрофуран – универсальный растворитель для жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, М.И. Соколов, В.Ф. Селеменев, Л.В. Рудакова // Вестн. ВГУ. Серия «Химия, биология, фармация». – 2003. - №2. - С. 56-65.

25. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Фракционирование фосфолипидов на неионогенном сорбенте // Масла и жиры. - 2003. - №6, вып. 26. - С. 1-3.

26. Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б. Фракционирование растительных фосфолипидов и строение их ионных форм // Масла и жиры. - 2003. - №5, вып. 27. - С. 4-6.

27. Zagorodni A.A., Kotova D.L., Selemenев V.F. Infrared spectroscopy of in exchange resins : chemical deterioration of the resins / A.A. Zagorodni, D.L. Kotova, V.F. Selemenев // Reactive D Functional Polymers. – 2002 - №53. - P. 157-171.

28. Жаркова И.М., Рудаков О.Б., Полянский К.К., Росляков Ю.Ф. Лецитины в технологиях продуктов питания / И.М. Жаркова, О.Б. Рудаков, К.К. Полянский, Ю.Ф. Росляков. – Воронеж:ВГУИТ, 2015. - 256 с.

29. Рудаков О.Б. Разделение фосфолипидов на неионогенном сорбенте/ О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменев, Т.А. Железная, Е.Ф. Сафонова // Хранение и переработка с/х сырья. - 2002. - № 7. – С. 18-19.

30. Сафонов Е.Ф. Выбор оптимальных параметров разделения фосфолипидов в тонком слое сорбента/ Е.Ф. Сафо-

нова, А.А. Назарова, В.Ф. Селеменев, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Хим. фарм. жур. - 2002. - Т. 36. - С. 41-43.

31. Рудаков О.Б. Препаративная жидкостная хроматография фосфолипидов / О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменев, Т.А. Железная, Г.Ю. Орос, Е.Ф. Сафонова // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2002. -Т.2, № 2. - .С. 203-208.

32. Сафонова Е.Ф. Физико-химические основы хроматографического выделения фосфолипидов из растительных объектов / Е.Ф. Сафонова, В.Ф. Селеменев, О.Н. Ермошевич, А.В. Гречко-сей, А.М. Макеев // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2001. –Т.1, вып. 3. – С. 544-545.

33. Рудаков О.Б. Рейтинг растворителей для экстракции каротиноидов из растительного сырья / О.Б. Рудаков, В.М. Болотов, Л.И. Перикова, В.В. Коновалов, В.Ф. Селеменев // Проблемы химии и химической технологии: материалы 9 Региональной научно-технической конференции. - Тамбов. - 2001. - С. 155-158.

34. Лурье А.А. Хроматографические материалы / А.А. Лурье. - Москва: Химия, 1978. - 440 с.

35. Рудаков О.Б. Оптимизация условий определения массовой доли эвгенола методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, Е.А. Подолина, Я.И. Коренман, В.Ф. Селеменев, Л.Н. Плотникова // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2001. -Т.1, №1. – С. 46-52.

36. Селеменев В.Ф. Физико-химические основы фракционирования и идентификации фосфолипидов семян подсолнечника / О.Б. Рудаков, В.М. Болотов, С.А. Железной, В.В. Коновалов, Е.Ф. Сафонова // Хранение и переработка с/х продукции. - 2000. - №12. - С. 66-77.

37. Патент №2169734 Российская Федерация, МКИ 7 С 07 F 9/09. Способ разделения фосфолипидов: № 99125174: заявл. 30.11.1999: опубл. 27.06.2001 / Селеменев В.Ф., Орос Г.Ю., Железной С.А., Рудаков О.Б., Шестаков А.В., Сафонова Е.Ф., Мануковская А.Н., Сливкин А.И., заявитель ВГУ. – 6 с.

38. Selemenев V.F. Interionic and Intermolecular Interaction in Ion-Exchange and Sorption Systems Involving Physiologically Active Substances / V.F. Selemenев, G.A. Chikin, V.Iu. Khokhlov // Ion Exchange. - Marcel Dekker. - New-York. - 2000. - V.1. - P. 615-689.

39. Рудаков О.Б. Показатель преломления бинарных подвижных фаз высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, В.Ф.Селеменев // Журн. физич. химии. - 1999. - Т.73, №12. - С. 2233-2236.

40. Железной С.А. Количественный ТСХ – анализ фосфолипидов в отходах масло-экстракционных заводов // С.А. Железной, В.М. Болотов, О.Б. Рудаков, А.С. Шестаков, Г.Ю. Орос, В.Ф. Селеменев // Вестн. Тамб. ГУ. - 1999. - Т.4, №2. –С. 264.

41. Рудаков О.Б. Рейтинг растворителей для микроколоночной ВЭЖХ / О.Б. Рудаков, В.В. Хрипушин, В.Ф. Селеменев, В.В.Коновалов, Л.В. Рудакова, О.Н. Бочарова // Теория и практика сорбционных процессов. – Воронеж: ВГУ, 1999. -Вып. 24. – С. 45-47.

42. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В. Аддитивность объемных свойств бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Проблемы химии и хим. Технологии: Тр. 4 регионал. конф. – Воронеж:ВГУ. - 1998. - Т.1. - С. 33-37.

43. Железной С.А. Выделение и разделение фосфолипидов из сточных вод экстракционными методами // С.А. Железной, В.Ф. Селеменев, Г.Ю. Орос, О.Б. Рудаков, А.С. Шестаков, В.В. Манешин, А.И. Сливкин, Ю.И. Киселев // Проблемы химии и хим. Технологии: Тр. 4 регионал. конф. – Воронеж:ВГУ. - 1998. - С. 116-119.

44. Рудаков О.Б. Рациональная шкала полярности растворителей для жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменев, Л.В. Рудакова // Теория и практика сорбцион. процессов. - Воронеж. - ВГУ. - 1998. - №23. - С. 242-251.

45. Рудаков О.Б. Количественные критерии выбора оптимальных растворителей для ВЭЖХ / О.Б. Рудаков, Л.В. Рудакова, В.Ф. Селеменев // Теория и практика сорбцион. процессов. - №23. – С. 251-258.

46. Selemenев V.F. Infrared Spectroscopy of Ion Exchange Resins. Determination of Amino Acids ionic Form in the Resine Phase / V.F. Selemenев, A.A. Zagorodni // Reactive and Functional Polymers. - 1999. - V. 39. - p. 53-62.

47. Калмыкова Е.Н. Оценка возможности использования пьезокварцевого раствора в качестве иммунсенса / Е.Н. Калмыкова, М.В. Струкова, С.А. Еремин, Т.Н. Ермолова // Проблемы химии и химич. технологии. - 2001. - С. 140-142.

48. Назарова А.А. Определение сквалена методом тонкослойной хроматографии / А.А. Назарова., Е.Ф. Сафонова., В.Ф. Селеменев., А.В. Сергеева. // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования: мат. 2 Всероссийской научно-метод. конф. - Воронеж.: ВГУ, 2005. - С. 369-370.

49. Дмитриенко С.Г. Использование полимеров с молекулярными отпечатками в процессах разделения и концентрирования органических соединений / С.Г. Дмитриенко и др. // Журн. аналит. химии. - 2004. - Т.59, №9. - С. 902-913.

50. Ионнообменные методы очистки веществ. Учебное пособие // под редакцией Г.А. Чикина, О.Н. Мягкого. – Воронеж: Изд. ВГУ, 1984. - 372с.

51. Назарова А.А. Исследование фосфолипидов методами высоковольтного электрофореза и тонкослойной хроматографии / А.А. Назарова, Е.Ф. Сафонова, В.Ф. Селеменев // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: материалы III международ. симп. (к юбилею акад. Б.Ф. Мясоедова). – Краснодар, 2005. - С. 378.

52. Рудаков О.Б. Новые способы концентрирования и разделения нативных фосфолипидов из подсолнечного масла / О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменев, А.Г. Баканов, Л.В. Рудакова // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: материалы III международ. симп. (к юбилею акад. Б.Ф. Мясоедова). – Краснодар, 2005. - С. 75-76.

53. Селеменев В.Ф. Практикум по ионному обмену / В.Ф. Селеменев, Г.В. Славинская, В.Ю. Хохлов, В.А. Иванов, В.И. Горшков, В.Д. Тимофеевская. – Воронеж: ВГУ, 2004. - 195 с.

54. Селеменев В.Ф. Меланоидины / В.Ф. Селеменев // Воронеж: ВГУ, 2004. - 195 с.

55. Жеребцов Н.А. Биохимия/ Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. – Воронеж: ВГУ, 2002. - 696 с.

56. Полянский К.К. Дифференциальный термический анализ пищевых жиров / К.К. Полянский, С.А. Снегирев, О.Б. Рудаков. - Москва: Дели принт, 2004. – 85 с.

57. Лукин А.Л. Свекольный пектин: от поля до конечного продукта / А.Л. Лукин, В.В. Котов, Н.Г. Мязин. – Воронеж: Истоки, 2005. - 176 с.

58. Григорьева В.Н. Факторы, определяющие биологическую полноценность жировых продуктов / В.Н. Григорьев, А.Н. Лисицын // Масложировая промышленность. - 2002. - №4. - С. 14-17.

59. Денисова С.А. Пищевые жиры / С.А. Денисова, Т.В. Пилипенко. - Москва: Экономика, 1998. - 79 с.

60. Джи М. Современные средства анализа жиров и масел / М. Джи // Масложировая промышленность. - 2001. - №1. - С. 19-20.

61. Котова Д.Л., Селеменев В.Ф. Термический анализ ионообменных материалов/ Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев. - Москва: Наука. - 2002. - 156 с.

62. Кучменко Т.А. Применение метода пьезокварцевого микровзвешивания в аналитической химии / Т.А. Кучменко. – Воронеж: Воронежский гос. техн. Академ, 2001. - 280 с.

63. Егунов В.П. Введение в термический анализ / В.П. Егунов. –Самара, 1996. - 270 с.

64. Вышемирский Ф.А. Маслоделие в России (история, состояние, перспективы) / Ф.А. Вышемирский. – Углич: Рыбинский дом печати, 1998. - 589 с.

65. Переработка продуктов растительного и животного происхождения / под редакцией А.В. Богомолова, Ф.В. Перцевой. - СПб.:ГИОРД, 2001. - 336 с.

66. Орчел Л. Введение в химию переходных металлов/ Л. Орчел. - Москва: Мир, 1964. - 266 с.

67. Майорова А.Ф. Термоаналитические методы исследования / А.Ф. Майорова // Соросовский образовательный журнал. - 1998. -№10. - С. 50-54.

68. Рудаков О.Б., Полянский К.К. Проверка натуральности молочного жира по многокритериальной идентификационной зоне / О.Б. Рудаков, К.К. Полянский // Сыроделие и маслоделие. - 2002. --№1. – С. 10-12.

69. Рудаков О.Б., Полянский К.К. Хроматографическая идентификация растительных масел / О.Б. Рудаков, К.К. Полянский // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2001. - №10. – С. 37-40.

70. Рудаков О.Б. Оценка качества натуральных и комбинированных жиров / О.Б. Рудаков, К.К. Полянский, Т.В. Дубинина, О.В. Плотникова, О.В. Парамонова // Сыроделие и маслоделие. - 2002. - №4. – С. 20-21.

71. Рудаков О.Б. Дифференциальный термический анализ спредов / О.Б. Рудаков, С.А. Снегирев, К.К. Полянский // Масла и жиры. - 2003. - №8. - С. 8-10.

72. Снегирев С.А. Возможности тандема дифференциального термического анализа и газовой хроматографии в изучении пищевых жиров / С.А. Снегирев, О.Б. Рудаков, К.К. Полянский // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2003. - Т.3, №4. – С. 432-440.

73. Тютюников Б.Н. Химия жиров / Б.Н. Тютюников, З.И. Бухштаб, Ф.Ф. Гладких. - Москва: Колос, 1992. – 448 с.

74. Сумина Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, Т.В. Тюрина. – Саратов: СГУ, 2002. - 108 с.

75. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс // Пер.с англ. В.Л. Друцы, О.Н. Королёвой - Москва: Мир, 1991. - 543 с.

76. Калач А.В., Селеменев В.Ф. Система пьезорезонансных сенсоров для экспресс-оценки качества бензинов / А.В. Калач, В.Ф. Селеменев // Химия и технология топлив и масел (ХТТМ). - 2007. - №1. – С. 44-45.

77. Селеменев, В.Ф. Обменные процессы и межмолекулярные взаимодействия в системе ионит-вода-аминокислота: таия диссертация на соискание уч. ст. докт. хим. Наук / Селеменев Владимир Федорович; Воронежский государственный университет. – Воронеж, 1993. - 596 с.

78. Рудаков, О.Б. Экспертная система для жидкостной хроматографии: принципы построения и применение в химическом анализе: диссертация . д-ра хим. наук : 02.00.02 / О.Б. Рудаков Олег Борисович; Воронеж. гос. технол. акад., Фак. экологии и хим. технологии, Каф. орг. химии. – ВГУ, 2004. - 412 с.

79. Бальхаузен К. Введение в теорию поля лигандов / К. Бальхаузен. – Москва: Мир, 1964. - 209 с.

80. Сумина, Е.Г. Гидрофобные и солевые эффекты в растворах ПАВ в спектрофотометрическом анализе и жидкостной хроматографии: диссертация на соиск. уч. ст. докт. хим наук. – Саратов, 2004. - 464 с.

81. Сафонова, Е.Ф. Выделение и изучение фосфолипидов масла семян амаранта: диссертация на соиск. уч. ст. канд. хим. наук : 15.00.02 / Сафонова Елена Федоровна; Воронеж. гос. ун-т. - Москва, 2004. - 149 с.

82. Рудаков О.Б. Количественная тонкослойная хроматография фосфолипидов / О.Б. Рудаков, В.В. Хрипушин, Е.Ф. Сафонова, Т.А. Железная // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2002. - Т.2, №2. - С. 209-212.

83. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков. – Воронеж: ВГУ, 2003. - 300 с.

84. Рудаков О.Б. Диэлектрическая проницаемость как мера полярности бинарных подвижных фаз, используемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков // Журн. аналит. химии. - 1998. - Т.53, №9. - С. 952-957.

85. Рудаков О.Б., Седишев И.П. Обобщенный критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом / О.Б. Рудаков, И.П. Седишев // Изв. РАН. Серия химич. - 2003. - №1. – С. 52-59.

86. Рудаков О.Б. Диэлектрическая проницаемость двух- и трехкомпонентных подвижных фаз, используемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков // Журн. физич. химии. - 1997. - Т.71, №12. – С. 2245-2248.

87. Платонов И.А. Разработка методики анализа летучих органических соединений в почве с использованием портативного хроматографа на основе микрофлюидных систем / И.А. Платонов, В.И. Платонов, В.И. Платонов, С.В. Ворон // Сорбцион. и хроматогр. процессы. - 2019. - Т.19, №2. - С. 168-173.

88. Рудаков О.Б., Бочарова О.Н. Температура кипения бинарных подвижных фаз, применяемых для высокоэффективной жид-

костной хроматографии / О.Б. Рудаков, О.Н. Бочарова // Журн. физич. химии. - 2000. - Т.74, №6. - С. 1093-1098.

89. Рудаков О.Б. Влияние состава на элюирующую способность бинарных подвижных фаз в нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков // Журн. физич. химии. - 2003. - Т.77, №12. - С. 2230-2235.

90. Рудаков О.Б. Описание элюирующей способности бинарных подвижных фаз в нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков // Журн. физич. химии. - 2004. - Т.78, №9. - С. 1674-1677.

91. Рудаков О.Б. Оценка полярности хроматографических растворителей по обобщенным критериям / О. Б. Рудаков // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2002. - Т.2, №5-6. - С. 596-608.

92. Рудаков О.Б. Хроматографическое определение натуральных и искусственных каротиноидов в пищевых продуктах / О.Б. Рудаков, Л.И. Перикова, В.М. Болотов, Г.А. Сташина // Вестник ВГУ. Сер. Химия, биология, фармация. - 2004. - №1. - С.78-84.

93. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. - Москва: Мир, 1975. - 322 с.

94. Гордон А., Форд Р. Спутник химика/ пер. с англ. Е.Л. Розенберга, С.И. Коппеля. - Москва: Мир - 1976. - 541 с.

95. Днепровский А.С., Темникова Т.И. Теоретические основы органической химии. - Ленинград: Химия, 1979. - 520 с.

96. Каррер П. Курс органической химии / П Каррер. - Ленинград: Химическая литература, 1962. - 1216 с.

97. Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК-и ЯМР- спектроскопии в органической химии / Л.А. Казицына, Н.Б. Куплетская. - Москва: Высшая школа, 1971. - 264 с.

98. Штыков С.Н. Синергизм и антагонизм в системах электролиты – мицеллы неионных поверхностных поверхностно активных веществ и их влияние на фотометрические и аналитические характеристики хелатов хромазуrola S / С.Н. Штыков, Е.Г. Сумина, М.И. Малова // Журн. Аналит. Химии. - 1997. - Т.52, №7. - С. 707-712.

99. Сумина Е.Г., Ермолаева Е.В., Тюрина Н.В., Штыков С.Н. Применение поверхностно-активных веществ для модификации

подвижных и неподвижных фаз при определении пищевых красителей методом ТСХ / Е.Г. Сумина, Е.В. Ермолаева, Н.В. Тюрина, С.Н. Штыков // Заводск. лаб. - 2001. - Т.67, №5. - С. 5-8.

100. Сорокина, О.Н. Хроматографическое разделение и определение стероидных гормонов, флавоноидов, сапонинов и аминокислот в мицеллярных и циклодекстриновых подвижных фазах: диссертация на соискание уч. ст. канд. хим наук / Сорокина Ольга Николаевна; Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского. – Саратов, 2013. - 185 с.

101. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение / Учебно-метод. Пособие (Допущено Советом по химии УМО по класс. Универ. Образованию). – Саратов: СГУ, 2002. - 108 с.

102. Кудрин А.Н. Лечение нестабильной стенокардии α-токоферолом / А.Н. Кудрин, В.С. Смоленский // Сов. Мед. – 1988. - № 2. - С. 78-80.

103. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов / Л.В. Донченко. - Москва: Дели, 2000. - 256 с.

104. Мосян А.К. Гидратация фосфолипидов из подсолнечных мисцелл / А.К. Мосян, Е.А. Аришева, Е.П. Корнена, Т.А. Заднепрянская // Изв. Вузов. пищевая технология. - 1985. - №2. - С. 118-121.

105. Основы аналитической химии. (В 2х-кн.) кн. 1. Методы разделения / под ред. Ю.А. Золотова. - Москва: Высш. Школа, 1999. - 351 с.

106. Селеменев В.Ф. Содержание сквалена в растительных маслах / В.Ф. Селеменев, А.А.Назарова, О.Б Рудаков // Жиры и масла. - 2005. - №11. - С. 14-15.

107. Bull H.B. Protein Hydration. I. Binding Sites / H.B. Bull, K. Breese // Arch. Biochem. And Biophys. - 1968. – Vol. 128. - pp. 488-496.

108. Сидорова Д.Р. Исследование гидратации аминокислот методом ИКС: автореф. дисс. на соиск. ст. канд. физ-мат. наук / Сидорова Д.Р.; КГУ – Казань, 1973. - 14 с.

109. Гусев Ю.А. Диэлектрическая релаксация в растворах некоторых аминокислот: автореф. дисс. на соиск. ст. канд. физ.-мат. Наук / Гусев Юрий Александрович; КГУ. - Казань, 1975. - 15 с.

110. Углянская В.А. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов / В.А. Углянская, Г.А. Чикинин, В.Ф. Селеменев, Т.А. Завьялова // Воронеж. – ВГУ, 1989. - 207 с.

111. Кайфман Т.М. О взаимодействии фосфорной кислоты с фосфолипидами льняного масла / Т.М. Кайфман, С.Н. Волотовская, Е.И. Фальк // Масло-жировая пром-сть. - 1978. - №3. – С. 20-23.

112. Шишкин А.Ф. Новые известковые удобрения: эффективность и безопасность применения / А.Ф. Шишкин. – Воронеж: ВГАУ, 2001. - 316 с.

113. Арутюнян Н.С. Состав и свойства фосфолипидов подсолнечного масла / Н.С. Арутюнян // Масло-жировая пром-сть. - 1974. - №3. – С. 11-15.

114. Рахимов М.М. Изменение фосфолипидного состава семян хлопчатника / М.М. Рахимов, М.У. Бабаев, В.Р. Раджапова // Масло-жировая пром-сть. - 1982. - №1. – С. 9-13.

115. Данилова Т.А. О составе и некоторых свойствах фосфолипидов формпрессовых подсолнечных масел / Т.А. Данилова, А.Н. Миронова, Ф.Б. Эстрина и др. // Труды ВНИИЖ. – 1974. - Вып. 32. - С. 13-15.

116. Казаджан З.М. Состав и выход экстрагируемых липидов и фосфолипидов семян сои, подвергнутых влаготепловой обработке / З.М. Казаджан, В.В. Ключкин, Э.И. Зуев и др. // Труды ВНИИЖ. – 1974. - Вып. 32. - С. 112-116.

117. Стонский В.С. Влияние рН среды на гидратацию и гидролиз оксифосфатов триглицеридов / В.С. Стонский, А.И. Аскинази, Н.А. Калашева // ВНИИЖ. – 1980. - Вып. 32. – С. 20-25.

118. Шелухина Н.П. Исследование свеклы / Н.П. Шелухина, З.Р. Ногойбекова, Г.Б. Аймухамедова. – Фрунзе: Илим, 1980. – 100 с.

119. Щербаков В.Г. Биохимия и товароведение масличного сырья / В.Г. Щербаков. - Москва: Пищевая пром-сть, 1979. - 336 с.

120. Lejac M., Niewiadomski H. Composition of lipids in the rapeseed oil hydration sludges / M. Lejac, H. Niewiadomski // Acta Alimentaria Polonica. - 1975.- V. 1, №1. - pp.63-70.

121. Persmark U. Main Constituents of Rapeseed Lectithin / U. Persmark // Y.Amer. Oil Chem. Soc. - 1968. - Vol. 45, №11. - pp.742-743.

122. Синяева, Л.А. Сорбция фосфатидилхолина наноструктурированными полистиролами и кремнийсодержащими метериалами: диссертация на соис. уч. ст. канд. хим. наук / Синяева Лилия Александровна; ФГБОУ ВПО ВГУ. – Воронеж, 2016. - 217 с.

123. Корнена Е.П. Современное представление о структуре фосфолипидов растительных масел / Е.П. Корнена, Н.С. Арутюнян // Масло-жировая пром-сть. - 1985. - №8. - С. 14-18.

124. Арутюнян Н.С. Лабораторный практикум по технологии переработки жиров / Н.С. Арутюнян, Е.А. Аришева, Л.И. Янова, М.А. Камышан. - Москва: Легкая и пищевая про-сть, 1983. – 307 с.

125. Попова В.Н. К изучению фракционного и жирнокислотного состава фосфолипидов хлопкового масла / В.Н. Попова, И.У. Юсупова, В.П. Ржехин // Масло-жировая пром-сть. - 1966. - №6. – С. 17-19.

126. Пономарева Н.А. Состав и свойства фосфолипидов соевых масел / Н.А. Пономарева, Е.П. Корнена, Н.С. Арутюнян, Ц.Т. Хаджийски // Изв. ВУЗов. Пищевая технология. - 1981. - №5. – С. 34-36.

127. Пономарева Н.А. Некоторые характеристики и состав фосфолипидов соевых масел / Н.А. Пономарева // Труды ВНИИЖ. - 1980. - С. 32-36.

128. Сикорская А.С. Дисс.... магистра по программе 02010068.02 Аналит. Химия. – Воронеж: ВГУ, 2010. – 95 с.

129. Nielsen K. The composition of the difficulty extractable phosphatides / K. Nielsen // Y.Amer. Oil Chem. Soc. - 1960. -Vol. 37, №1. - pp. 217-221.

130. Корнена Е.П. Лабораторный практикум по химии жиров / Е.П. Корнена, Н.С. Арутюнян. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2004. - 264 с.

131. Корнена Е.П. Характеристика жирowych кислот и неомыляемых веществ фосфолипидов растительных масел / Е.П. Корнена, Н.А. Пономарева // Изв. ВУЗов. Пищевая технология, 1984. - №2. - С. 19-21.

132. Брайент Р. Взаимодействие воды с белками. Результаты изучения гидратированного мезоцима методом ядерного магнитного резонанса / Р. Брайент, У. Ширли // Вода в полимерах. - Москва: Мир. - 1984. – С. 149-158.

133. Кенинг С. Динамика взаимодействий в системе вода-белок. Результаты, полученные из измерений дисперсии ядерной магнитной релаксации / С. Кенинг // Вода в полимерах. - Москва: Мир. - 1984. – С. 159-182.

134. Лиллфорд П., Кларк А., Джонс Д. Распределение воды в гетерогенных пищевых продуктах и модельных системах / П. Лиллфорд, А. Кларк, Д. Джонс // Вода в полимерах. - Москва: Мир, 1984. – С. 183-200.

135. Блюм Т. Новое понимание гидратации кристаллической структуры полисахаридов / Блюм Т., Десланде И., Маршесо Р., Сундарарайан П. // Вода в полимерах. - Москва: Мир. - 1984. - С. 255-273.

136. Силин П.М. Технология сахара / П.М. Силин. - Москва: Пищевая пром-сть, 1967. - 625 с.

137. Цундель Г. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие / Г. Цундель. - Москва: Мир, 1972. - 404 с.

138. Умланд Ф. Комплексные соединения в аналитической химии / Умланд Ф., Янсен А., Тириг Д., Вюнш Г. // Москва: Мир, 1975. - 531 с.

139. Пиментелл Д., Мак-Клеллан О. Водородная связь / Пиментелл Д., Мак-Клеллан О. - Москва: Мир, 1964. - С. 462 с.

140. Эфендиев О.Ф. Влияние веществ, сопутствующих растительному маслу, на электропроводность мисцелл / О.Ф. Эфендиев, Т.В. Мибришвили, В.Т. Золочевский и др. // Масложировая пром-сть. - 1976. - №12. – С. 9-12.

141. Минкин В.И., Осипов О.А., Жданов Ю.А. Дипольные моменты в органической химии / В.И. Минкин, О.А. Осипов, Ю.А. Жданов. - Ленинград: Химия, 1968. - 248 с.

142. Даниэльс Ф., Олберти Р. Физическая химия / Ф. Даниэльс, Р. Олберти. - Москва: Мир, 1978. - 645 с.

143. Штыков С.Н. Люминесцентный анализ в организованных средах / С.Н. Штыков // Люминесцентный анализ. Т. 19. - Москва: Наука, 2015. - С. 121-154.

144. Смирнова Т.Д., Штыков С.Н. Перенос энергии в наносистемах: применение в люминесцентном анализе / Т.Д. Смирнова, С.Н. Штыков // Нанообъекты и нанотехнологии в химическом анализе. - Москва: Наука, 2015. - Т.20. - С. 123-150.

145. Бретшнайдер С. Свойства газов и жидкостей. Инженерные методы расчета / пер. с польск. под ред. чл.-корр. А.Н. СССР Романкова П.Г. - Москва-Ленинград: Химия, 1996. - 536 с.

146. Davankov V.A., Tsyrupe M.P. Hypercrosslinked Polymeric Networks and Adsorbing Materials / V.A. Davankov, M.P. Tsyrupe // Comprehensive Analytical Chemistry. Vol.56. - New York.-Elsevier. -2011. - 640 p.

147. Цюрюпа М.П. Поиск возможных каталитических систем для синтеза сверхсшитых полистирольных сорбентов / М.П. Цюрюпа, З.К. Блиникова, Ю.А. Давидович, В.А. Даванков // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2019. - Т.19, №4. - С. 382-389.

148. Патент 299165, 1969 СССР, Pat.USA № 3729457 США (11.10.70). Способ получения макросетчатых полимеров стирола / Даванков В.А., Рогожин С.В., Цюрюпа М.П. – 4 с.

149. Рогожин С.В. Изучение реакции L – цистеиновой кислоты с хлорметилированным сополимером стирола. Хроматография рацематов на полученном сорбенте / С.В. Рогожин, В.А. Даванков, И.А. Ямсков, В.П. Кабанов // Высокомол. Соед. – 1972. – С. 148-472.

150. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах / С.С. Танчев. - Москва: Пищепром, 1980. - 304 с.

151. Паронян В.Х., Скрябина Н.М. Аналитический контроль и оценка качества масложировой продукции / В.Х. Паронян, Н.М. Скрябина. - Москва: Дели принт, 2007. - 312 с.

152. Ипатова Л.Г., Кочеткова А.А., Нечаев А.П., Тутельян В.Г. Жировые продукты для здорового питания. - М.:Дели принт, 2009.-396 с.

153. Фиалков Ю.А. Растворитель как средство управления химическим процессом / Ю.А. Фиалков. - Ленинград.:Химия, 1990. - 240 с.

154. Будников Г.К. Основы современного электрохимического анализа / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев. - Москва: Мир: Бином, 2003. - 592 с.

155. Мищенко К.П. Термодинамика и строение водных и неводных растворов электролитов / К.П. Мищенко, Г.М. Полторацкий. - Ленинград: Химия, 1976. - 238 с.

156. Карякин А.В. Состояние воды в органических и неорганических соединениях / А.В. Карякин, Г.А. Кривенцова. - Москва: Наука, 1973. - 174 с.

157. Иогансен А.В. Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи / А.В. Иогансен // Водородная связь. - Москва: Наука, 1981. - С. 112-155.

158. Юхневич Г.В. Инфракрасная спектроскопия воды / Г.В. Юхневич. - Москва: Наука, 1973. - 116 с.

159. Дёмин А.А., Чернова И.А., Шатаева Л.К. Ионообменная сорбция биологически активных веществ / А.А. Дёмин, И.А. Чернова, Л.К. Шатаева. - С.-Пб.: С.-ПБУ, 2008. - 154 с.

160. Тиного И. Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках / Тиного И., Зауэр К., Вэнг Дж., Паглиси Дж. - Москва: Техносфера, 2005. - 744 с.

161. Селеменев В.Ф. Пигменты пищевых производств меланоидины / Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. - Москва: ДеЛи Принт, 2008. - 246 с.

162. Патент № 2335767 Российская Федерация. Способ определения качественного состава фосфолипидного комплекса. от 10.10.2008 / Жигулина О.В., Сафонова Е.Ф., Назарова А.А., Чупандина Е.Е., Селеменев В.Ф., Сливкин А.И. - 5 с.

163. Патент №2335769 Российская Федерация. Способ определения количественного содержания фосфатидилхолина в фосфолипидных комплексах: от 10.10.2008 / Жигулина О.В., Сафонова Е.Ф., Назарова А.А., Чупандина Е.Е., Селеменев В.Ф., Сливкин А.И. - 5 с.

164. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зоны в исследовании клеточек, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. - Москва: Наука, 1989. - 276 с.

165. Угай Я.А. Общая и неорганическая химия. Учеб. Для вузов. 2е изд.,испр / Я.А. Угай. - Москва: Высш.шк, 2000. - 527 с.

166. Gusakova G.V. Hydrogen Bond and Proton Transfer in Carboxylic Acid - Amine Systems. Spectroscopic Study of Equilibrium Between Molecular Complex and Ionic Pair / G. V. Gusakova, G. S. Denisov, A. L. Smolyansky, V. M. Schreiber // *Doklady Akademii Nauk.* – 1970. – Vol. 193, № 5. – pp. 577-579.

167. Рейн Р. Исследование биомолекулярных взаимодействий. Зависимость структура-функция для нуклеиновых кислот с учетом взаимодействия их компонентов / Р. Рейн // *Межмолекулярные взаимодействия: от двухатомных молекул до биополимеров.* - Москва: Мир, 1981. - С. 414-488.

168. Селеменев В.Ф. 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. - Москва: Стелайт, 2002. - 298 с.

169. Отто М. Современные методы аналитической химии (в 2х томах). Том 2.-М / М. Отто. - Москва: Техносфера, 2004. - 288 с.

170. Zagorodni A.A. Yon Exchange Materials. Properties and Applications / A.A. Zagorodni. - Elsevier B.V, 2007. - 477 p.

171. Полянский К.К., Снегирев С.А., Рудаков О.Б. Дифференциальный термический анализ пищевых жиров / К.К. Полянский, С.А. Снегирев, О.Б. Рудаков. - Москва: ДеЛи принт, 2004. – 85 с.

172. Селеменев В.Ф. Хроматография низкого давления физиологически активных веществ / В.Ф. Селеменев, Д.Л. Котова, Г.Ю. Орос, А.А. Загородний // 100 лет хроматографии. - Москва: Наука, 2003. - 546-568.

173. Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер: открытие тонкослойной хроматографии / составитель и научный редактор В.Г. Березкин. - Москва: ГЕОС, 2007. - 128 с.

174. Копылова В.Д. Фосфорсодержащие иониты / В.Д. Копылова, Т.В. Меквабишвили, Е.Л. Гефтер. – Воронеж: Изд. ВГУ, 1992. -192 с.

175. Туркова Я. Аффинная хроматография / пер. с англ. к.х.н. Л.В. Козлова // Москва: Мир, 1980. - 471 с.

176. Салдадзе К.М. Комплексообразующие иониты (комплекситы) / К.М. Салдадзе, В.Д. Копылова-Валова. - Москва: Химия, 1980. - 336 с.

177. Шатаева Л.К. Карбоксильные компоненты в биологии / Шатаева Л.К., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Э. - Ленинград: Наука, 1979. - 286 с.

178. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. Абсорбция протяженных лигандов на полимерах, подобных ДНК / А.С. Заседателев, Г.В. Гурский, М.В. Волькенштейн // Конформационные изменения биополимеров в растворах, под ред. Л.Н. Кузьмина. - Москва: Наука, 1973. - С. 52-56.

179. Сырников Ю.П. О фазовом переходе воды в системах с большой концентрацией растворенного вещества / Ю.П. Сырников // Конформационные изменения биополимеров в растворах, под ред. Л.Н. Кузьмина. - Москва: Наука, 1973. - С. 144-148.

180. Евтюшин Г.А. Биохимические тесты на основе стабилизированных препаратов холинэстераз-новые подходы / Г.А. Евтюшин, Г.К. Будников, Е.Б. Никольская // Журн. аналит. хим. - 2002. - Т. 57, №10. - С. 1127-1132.

181. Салдадзе К.М. Применение комплекситов в хроматографии / Салдадзе К.М., Копылова В.Д., Каргман В.Б. // Прикладная хроматография. - Москва: Наука, 1984. - С. 32-42.

182. Маторина Н.Н. Применение процессов комплексообразования в ионообменной хроматографии / Н.Н. Маторина // Прикладная хроматография. - Москва: Наука, 1984. - С. 43-53.

183. Гаврилюк И.И. Тонкослойная хроматография некоторых растительных объектов / И.И. Гаврюк // Прикладная хроматография. - Москва: Наука, 1984. - С. 294-302.

184. Либинсон Г.С. Проблемы стандартизации антибиотиков. Кислотно-основные свойства. Растворимость / Г.С. Либинсон // Антибиотики, 1982. - №3. - С. 47-60.

185. Попова Т.Н. Свободнорадикальные процессы в биосистемах / Т.Н. Попова, А.Н. Пашков, А.В. Семенихина, С.С. Попов, Т.И. Рахманова. - Ст.Оскол: Кириллица, 2008. - 192 с.

186. Копылова В.Д., Астанина А.Н. Ионитные комплексы в катализе / В.Д. Копылова, А.Н. Астанина. - Москва: Химия, 1987. - 191 с.

187. Тулупов П.Е. Стойкость ионообменных материалов / П.Е. Тулупов. - Москва: Химия, 1984. - 232 с.

188. Даванков В.А. Лигандообменная хроматография / В.А. Даванков, Дж. Навратил, Х. Уолтон. - Москва: Мир, 1989. - 294 с.
189. Восканян О.С. Классификация биологически активных веществ растительного происхождения / О.С. Восканян, В.Х. Паронян, М.А. Игнатенко // Масла и жиры. - 2008. - №11. - С. 9-10.
190. Рубин А.Б. Биофизика: Биофизика клеточных процессов. Т.2 / А.Б. Рубин. - Москва: Университет, 1998. - С. 10-17.
191. Самойлов О.Я. Структура водных растворов электролитов и гидротация ионов / О.Я. Самойлов. - Москва: Изд. АН СССР, 1957. - С. 28-59.
192. Зяблов А.Н. Определение глицина в водных растворах пьезосенсором, модифицированным полимером с молекулярным отпечатком / А.Н. Зяблов, А.В. Калач, Ю.А. Жиброва [и др.] // Журн. аналит. химии. - 2010. - Т. 65, №1. - С. 93-95.
193. Лайтинен Г.А., Харрис В.Е. Химический анализ / Г.А. Лайтинен, В.Е. Харрис. - Москва: Химия, 1979. - 624 с.
194. Молочников Л.С. Исследование комплексообразующей способности низкоосновных анионитов методом ЭПР / Л.С. Молочников, Г.П. Вишневская, Р.Ш. Сафин и др. // Координ. химия. - 1984. - Т. 10, № 7. - С. 926-930.
195. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Пер. с англ. - Москва: Мир, 1997. - 624 с.
196. Корнена Е.П. Поведение фосфорсодержащих веществ рафинированных масел в процессе гидрирования / Е.П. Корнена, Е.Д. Литвинова, Н.С. Арутюнян // Масло-жировая пром-сть. - 1978. - №4. - С. 18-21.
197. Корнена Е.Н. Исследования в области количественного выведения фосфорсодержащих веществ / Е.Н. Корнена, Н.С. Арутюнян // Труды ВНИИЖ. - 1980. - С. 57-63.
198. Корнена Е.П. Сложные соединения фосфолипидов подсолнечного масла с металлами / Е.П. Корнена, Е.Д. Литвинова, Н.С. Арутюнян // Масло-жировая пром-сть. - 1978. - №5. - С. 16-19.
199. Hendrickson H.S. Stabilities metal complex of phospholipids; Ca(II), Mg(II), Ni(II) complex of phosphatidylserine and triphosphoinositide / H.S. Hendrickson, Y.C. Fullington // Biochemistry. - 1965. - Vol. 4, №8. - pp.1599-1605.

200. Котов В.В. Химия и микробиология воды / В.В. Котов, Г.А. Нетесова. – Воронеж: ФГОУ ВПО ВГАУ, 2008. - 320 с.
201. Хохлов А.Р., Дормидонтова Е.Е. Самоорганизация в ион-содержащих полимерных системах / А.Р. Хохлов, Е.Е. Дормидонтова // Успехи физич. наук. - 1997. - Т. 167, № 2. – С. 113-128.
202. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем / Б. Нолтинг. - Москва: Техносфера, 2005. - 256 с.
203. Рудаков О.Б. Жиры. Химический состав и экспертиза качества / О.Б. Рудаков, А.Н. Пономарев, К.К. Полянский, А.В. Любарь. - Москва: ДеЛи Принт, 2005. - 312 с.
204. Потемкин И.И. Статистическая физика растворов ассоциирующих полиэлектролитов / И.И. Потемкин, К.Б. Зельдович, А.Р. Хохлов // Высокомол. соединения. – 2000 - Сер.С. -Т.42. – С. 2265-2280.
205. Бончев П.В. Введение в аналитическую химию / П.В. Бончев. - Ленинград:Химия, 1978. - 496 с.
206. Рудаков О.Б. / О.Б. Рудаков, Н.В. Королькова, К.К. Полянский, О.А. Котик, Л.В. Рудакова. Технохимический контроль жиров и жирозаменителей. - Краснодар:Лань, 2011. - 576 с.
207. Ипатова Л.Г. Жировые продукты для здорового питания. Современный взгляд / Л.Г. Ипатова, А.А. Кочеткова, А.П. Нечаев, В.А. Тутельян. - Москва: ДеЛи принт, 2009. - 396 с.
208. Сумина Е.Г. Основы модифиц. действия поверхностно-активных веществ в жидкостной хроматографии / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, Н.В. Тюрина. – Саратов: СГУ, 2008. - 136 с.
209. Смирнова Н.А. Фазовое поведение и формы самоорганизации растворов смесей поверхностно-активных веществ / Н.А. Симонова // Успехи химии. - 2005. - Т. 74, №2. – С. 138-154.
210. Крысанова Т.А. Физико-химические методы анализа природных соединений: хроматография и спектроскопия / Т.А. Крысанова, Д.Л. Котова, В.А. Крысанов, А.Н. Зяблов, В.Ф. Селемев. – Воронеж: Научная книга, 2016. -62 с.
211. Паронян В.Х., Скрыбина Н.М. Аналитический контроль и оценка качества масложир. Продукции / В.Х. Паронян, Н.М. Скрыбина. - Москва: ДеЛи принт, 2007. - 312 с.
212. Солдатенков А.Т. Основы органической химии пищевых; кормовых и биологически активных добавок / А.Т. Солдатенков,

Н.М. Колядина, Ле Туан Ань, В.Н. Буянов. - Москва: Химия, 2006. - 278 с.

213. Лисичкин Г.В. Химия привитых поверхностных соединений / Г.В. Лисичкин, А.Ю. Фадеев, А.А. Сердан, П.Н. Нестеренко, П.Г. Мингалев, Д.Б. Фурман. - Москва: Физмат., 2003. - 592 с.

214. Хёльте Х.-Д. Молекулярное моделирование: теория и практика / Х.-Д. Хёльте, В. Зиппль, Д. Роньян, Г. Фолькерс. - Москва: БИНОМ. Лабор. Знаний, 2010. - 318 с.

215. Пул Ч., Оуэнс Ф. Нанотехнологии / Ч. Пул, Ф. Оуэнс. - Москва: Техносфера, 2004. - 28 с.

216. Финч А. Применение длинноволновой ИК-спектроскопии в химии / А. Финч, П. Гейтс, К. Редклиф, Ф. Диксон, Ф. Бентли. - Москва: Мир, 1973. - 284 с.

217. Дейнека В.И. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии для идентификации и обнаружения фальсификации масел / В.И. Дейнека, О.Б. Рудаков // Масла и жиры. - 2005. - №9 (55). - С. 4-5.

218. Селеменев В.Ф. Содержание сквалена в растительных маслах / В.Ф. Селеменев, А.А. Назарова, О.Б. Рудаков // Масла и жиры. - 2005. - №11(57). - С. 14-15.

219. Меламуд Н.Л. Кислотно-активированные отбельные земли / Н.Л. Меламуд // Масла и жиры. - 2005. - №11 (57). - С. 6-7.

220. Рыжкина И.С. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ / И.С. Рыжкина, Л.М. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов // Доклады РАН. - 2009. - Т. 428, №2. - С. 487-491.

221. Калач А.В. Сенсоры в анализе газов и жидкостей / А.В. Калач, А.Н. Зяблов, В.Ф. Селеменев. – Воронеж: ВИ ГПС МЧС России, 2011. - 40 с.

222. Armstrang D.W. Partitioning Behavior of Solutes Fluted with Mobile Phases En Liquid Chromatography / D.W. Armstrang, F. Home // Anal. Chem. - 1981. - Vol. 53, №14. - pp. 1662-1666.

223. Дунин С.А. Исследование жирнокислотного состава масложировой продукции / С.А. Дунин, Ю.В. Пивоваров, В.А. Зенин // Масла и жиры. - №8 (90). - С. 20-25.

224. Климаков И. Тропические масла-2008 / И. Климаков // Масла и жиры. - 2008. - №10(92). - С. 6-9.

225. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография) / Ф. Гейсс. - Москва: Химия, 1999. – 348 с.

226. Мухамедиев Ш.А. Эмульсии и пены: строение, получение, устойчивость / Ш.А. Мухамедиев, В.А. Васькин // Масла и жиры. - 2008. - №10(92). – С. 22-26.

227. Рудаков О.Б. Стевия и стевиозид / О.Б. Рудаков, Л.В. Рудакова // Масла и жиры. - 2008. - №11(93). - С. 6-8.

228. Рудаков О.Б. Цветометрия растительных масел / О.Б. Рудаков, В.В. Хрипушин, Л.В. Рудакова // Масла и жиры. - 2008. - №12(94). - С. 18-21.

229. Сарафанова Л.А. Антиокислители двойного действия / Л.А. Сарафанова // Масла и жиры. - 2008. - №11(93). - С. 28-30.

230. Золочевский В.Т. Окисление масла при переработке маслосемян и хранение масла / В.Т. Золочевский // Масла и жиры. - 2008. - №11(93). - С. 22-23.

231. Hielscher R. Monitoring Redox-Dependent Contribution of Lipids in Fourier Transform Infrared Difference Spectra of Complex I from *Escherichia coli* / R. Hielscher, T. Wenz, S. Stolpe, C. Hunte, T. Friedrich, P. Hellwig // J. Biopolymers. - 2006. - Vol. 82. – pp. 291-294.

232. Szydlowska-Czerniak A. MIR Spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process / A. Szydlowska-Czerniak. // J. Food Chemistry. - 2007. - Vol. 105. - pp.1179-1187.

233. Szydlowska-Czerniak A. Spectrophotometric determination of total phosphorus in rape seeds and oils at various stages of technological process: calculation of phospholipids and non-hydratable phospholipids contents in rapeseed oil / A. Szydlowska-Czerniak, E. Szlyk. // J. Food Chemistry. - 2003. - Vol. 81. - pp. 613-619.

234. Cserhati T. Interaction of phospholipids with proteins and peptides. New advances IV / T. Cserhati, M. Szogyi. // J. Biorhem. - 1994. - Vol. 26. - pp. 1-18.

235. Armstrong D.W. Evaluation of partition coefficients to micelles and cyclodextrins via planar chromatography / D.W. Arm-

strong, G.Y. Stine // Y. Amer. Chem.Soc. - 1983. - Vol. 105, №10. - pp. 2962-2964.

236. Fang J. Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography / electrospray ionization / mass spectrometry / J. Fang, M.J. Barcelona // Journal of Microbiological Methods. - 1998. - Vol. 33. – pp. 23-35.

237. Avalli A. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD / A Avalli, G. Contarini // Journal of Chromatography A. - 2005. - Vol. 1071. - pp. 185-190.

238. Istarova T.A. Effect of pH on the interactions of sodium caseinate with soy phospholipids in relation to the foaming ability of their mixtures / T.A. Istarova, M.G. Semenova, G.M Sorokoumova, A.A. Selishcheva, L.E. Belyakova, Y.N. Polikarpov, M.S. Anokhina // J. Food Hydrocolloids. - 2005. - Vol. 19. - pp. 429-440.

239. Li Y. Process parameters and morphology in puerarin, phospholipids and their complex microparticles generation by supercritical antisolvent precipitation / Y. Li, D.-J. Yang, S.-L. Chen, S.-B. Chen, A.S.-C. Chan. // International Journal of Pharmaceutics. - 2008. - Vol. 359. - pp. 35-45.

240. Wang Y. Derivatization of phospholipids / Y. Wang, I. S. Krull, C. Liu, J.D. Orr // Journal of Chromatography B. - 2003. - Vol. 793. - pp. 3-14.

241. Велдкамп Ф. Новые технологии фильтрации отбеленного масла / Ф. Велдкамп, С. Долина // Масла и жиры. - 2008. - №9(91). – С. 16-18.

242. Дискина Д.Е. Хроматографические и термоаналитические исследования масел и рабочих жидкостей / Д.Е. дискина, Т.Н. Шабалина, И.И. Занозина, В.А. Тыщенко. - Самара: ОФОРТ, 2011. - 160 с.

243. Рудаков О.Б. Технохимический контроль жиров и жирозаменителей / О.Б. Рудаков, Н.В. Королькова, К.К. Полянский, О.А. Котик, Л.В. Рудакова. - СПб.: Лань, 2011. - 576 с.

244. Итог науки: Химия и технология высокомолекулярных соединений / под ред. В.В. Коршака. - М.: Изд-во АН СССР, 1971. - Т.3. – С. 86-173.

245. Dippy J.F.Y. Обзор участия групп с – НвН- Связи. / J.F.Y. Dippy // Chem. Revs. - 1939. - № 25. – pp. 151-162.

246. Эпштейн Л.М. Водородные связи и химические свойства органических соединений / Л.М. Эпштейн // Водородная связь. - Москва: Наука, 1981. - с.255-271.

247. Грагеров И.П. Водородная связь и быстрый протонный обмен / И.П. Грагеров, В.К. Погорелый, И.Ф. Франчук. – Киев: Наукова думка, 1978. - 216 с.

248. Билобров В.М. Водородная связь. Внутримолекулярные взаимодействия / В.М. Билобров. – Киев: Наукова думка, 1991. - 20 с.

249. Нечаева Л.С. Структурный анализ катионообменников / Л.С. Нечаева, Е.В. Бутырская, В.А. Шапошник, В.Ф. Селеменев.- Воронеж: Научная книга. - 2012. - 164 с.

250. Долгоносков А.М. Неспецифическая селективность в проблеме моделирования высокоэффективной хроматографии / А.М. Долгоносков. - Москва: ЛИБРОКОМ, 2012. - 256 с.

251. Вдовенко В.М., Суглобов Д.Н. Журн. физ. химии. - 1960. - Т.34, №4. - С. 51-56.

252. Dippy Y.F.Y. Константы диссоциации амефатических кислот / Y.F.Y. Dippy // Y.Chem.Soc. - 1938. - pp. 1222-1226.

253. Lord R. ИКС. Интенсивность V_s $CDCl_3$ в простых и сложных эфирах, ацетоне, пиридине / R. Lord, B. Nolin, H.D. Stidham // Y.Avtr.Chem.Soc. - 1955. - №77. - pp. 1365-1372.

254. Синяева Л.А. Сорбционное концентрирование фосфотидилхолина наноструктурированными мезопористыми материалами в динамических условиях / Л.А. Синяева, Н.А. Беланова, С.И. Карпов, В.Ф. Селеменев, F. Roessner // Журн. аналит. химии. - 2018. - Т.71, №9. - С. 663-670.

255. Луцкий А.Е. Плотность, поверхностное натяжение, вязкость, дипольные моменты: нитроанилины / А.Е. Луцкий // Журн. общей химии. - 1955. - №26. – С. 2295-2301.

256. Селеменев В.Ф. Процессы взаимодействия с участием высших карбоновых кислот / В.Ф. Селеменев, А.А. Назарова, Л.А. Синяева, А.Н. Зяблов, В.Н. Попов // Сорбц. и хроматограф. процессы. - 2013. - Т.13, №3. - С. 307-312.

257. Рудаков О.Б., Менеджмент качества жировых товаров / О.Б. Рудаков, Э.П. Лесникова, И.Н. Семенова, К.К. Полянский – Воронеж: Воронежский ГАСУ, 2014. – 328 с.

Научное издание

Селеменев Владимир Федорович
Рудакова Людмила Васильевна
Рудаков Олег Борисович
Беланова Наталья Анатольевна
Назарова Александра Александровна

ФОСФОЛИПИДЫ НА ФОНЕ ПРИРОДНЫХ МАТРИЦ

Монография

Издание публикуется в авторской редакции
и авторском наборе

Подписано в печать 11.12.2020. Формат 60×84/16
Усл. печ. л. 18,48. Тираж 500 экз. Заказ 262

ООО Издательско-полиграфический центр «Научная книга»
394018, г. Воронеж, ул. Никитинская, 38, оф. 308
Тел.: +7 (473) 200-81-02, 200-81-04
<http://www.n-kniga.ru> E-mail: zakaz@n-kniga.ru

Отпечатано в типографии ООО ИПЦ «Научная книга»
394026, г. Воронеж, Московский пр-т, 11/5
Тел.: +7 (473) 220-57-15, 296-90-83
<http://www.n-kniga.ru> E-mail: typ@n-kniga.ru