_____ ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ____ РАСТВОРОВ

УДК 541.8:541.13

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ОПТИЧЕСКОЙ ИЗОМЕРИИ АЛИФАТИЧЕСКИХ ДИПЕПТИДОВ НА ЭНТАЛЬПИЙНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КСИЛИТОМ В ВОДЕ

© 2022 г. И. Н. Межевой^{*a*,*}, Н. М. Громова^{*b*}

^аИнститут химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия ^bИвановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

*e-mail: inm@isc-ras.ru Поступила в редакцию 15.04.2022 г. После доработки 13.05.2022 г. Принята к публикации 16.05.2022 г.

Методом калориметрии растворения получены энтальпии растворения $\Delta_{sol}H^m$ L- α -аланил–L- α -аланина, DL- α -аланил-DL- α -аланина и β -аланил- β -аланина в водных растворах с ксилитом при концентрации многоатомного спирта до 1 моль/кг р-ля. Рассчитаны стандартные значения энтальпий растворения ($\Delta_{sol}H^0$) и переноса ($\Delta_{tr}H^0$) дипептидов из воды в водные растворы ксилита. Рассчитанные энтальпийные коэффициенты парных взаимодействий дипептидов с молекулами многоатомного спирта имеют положительные и отрицательные значения. Обнаружено влияние изомерии пептидов на энтальпийные характеристики их взаимодействия с ксилитом в водных растворах. Проведен анализ влияния различных типов взаимодействий в растворах и структурных особенностей биомолекул на термохимические характеристики растворения олигопептидов.

Ключевые слова: дипептиды, ксилит, энтальпия растворения, водный раствор, гидрофобное взаимодействие

DOI: 10.31857/S0044453722120196

Известно, что многоатомные спирты помогают в стабилизации природных конформаций шаровидных белков и моделируют гидрофильную наружную часть клеточной мембраны [1–3]. "Сахарные" многоатомные спирты находят широкое применение как стабилизируюшие и безопасные добавки в пищевой и фармацевтической промышленностях, как заменители сахарозы при заболеваниях диабетом [4]. Комплексное изучение физико-химических и термодинамических параметров взаимодействия пептидов с биомолекулами необходимо для более глубокого понимания механизмов стабилизации белков в растворах и количественной оценки параметров энергии взаимодействия в трехкомпонентной системе [5, 6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Измерения энтальпий растворения дипептидов проводили на калориметре переменной температуры с изотермической оболочкой [7]. Объем калориметрической ячейки составил ~110 мл. Для оценки точности и надежности работы калориметрической установки были измерены тепловые эффекты растворения КСІ в воде при 298.15 К. Из десяти независимых измерений энтальпий растворения КСІ в H₂O получено значение стандартной $\Delta_{sol}H^0 = 17.23 \pm 0.06$ кДж/моль, которое хорошо согласуется с рекомендуемой величиной в литературе (17.22 ± 0.04 кДж/моль) [8, 9].

Навески пептидов тщательно растирались в ступке для уменьшения времени растворения и высушивалась до постоянной массы. Далее дипептид помещали в тонкостенную стеклянную ампулу, закрывали силиконовой пробкой и взвешивали на весах ВЛР-200 с точностью 1×10^{-4} г. После ампулу запаивали и помещали в ампулодержатель в реакционном стакане. Навески ксилита и растворитель взвешивали также на весах ВЛР-200 с точностью 1 \times 10⁻⁴ г. После сборки калориметрическую ячейку помещали в блок вторичного термостатирования и система термостатировалась при заданной температуре. Достижение термического равновесия определяли по горизонтальному ходу графопостроителя. После разбития ампулы записывался начальный и конечный период опытов. Затем система в зависимости от теплового эффекта нагревалась или охлаждалась и, после достижения равновесия, проводилась калибровка электрическим током. Калибровка проводилась таким образом, чтобы

L-α-аланил-L-α-аланин		DL-α-аланил-DL-α-аланина		β-аланил-β-аланин	
m	$-\Delta_{\rm sol}H^0$	т	$-\Delta_{\rm sol}H^0$	т	$\Delta_{ m sol} H^0$
0	10.79 ± 0.06	0	7.29 ± 0.05	0	5.67 ± 0.04
0.1	10.37 ± 0.06	0.1	7.04 ± 0.05	0.1	5.34 ± 0.04
0.2	9.99 ± 0.06	0.2	6.81 ± 0.05	0.2	5.01 ± 0.04
0.3	9.71 ± 0.06	0.3	6.61 ± 0.05	0.3	4.73 ± 0.04
0.4	9.47 ± 0.06	0.4	6.47 ± 0.05	0.4	4.51 ± 0.04
0.5	9.33 ± 0.06	0.5	6.34 ± 0.05	0.5	4.33 ± 0.03
0.6	9.18 ± 0.06	0.6	6.21 ± 0.05	0.6	4.15 ± 0.03
0.7	9.14 ± 0.06	0.7	6.13 ± 0.05	0.7	4.07 ± 0.03
0.8	9.13 ± 0.06	0.8	6.09 ± 0.04	0.8	3.99 ± 0.03
0.9	9.24 ± 0.06	0.9	6.08 ± 0.04	0.9	3.94 ± 0.03
1.0	9.39 ± 0.06	1.0	6.10 ± 0.04	1.0	3.90 ± 0.03

Таблица 1. Стандартные энтальпии растворения $\Delta_{sol}H^0$ (кДж/моль) дипептидов в смешанном растворителе водаксилит при 298.15 К

Обозначения: *т* – моляльность ксилита (моль/кг).

ход графопостроителя был как можно ближе к ходу во время опыта ($\Delta l_{on} \sim \Delta l_{\kappa}$). При этом сила тока выбиралась так, чтобы время калибровки составляло не менее 100 с. Полученные кривые изменения температуры во времени $t = f(\tau)$ обрабатывались графическим методом [10] и вычислялся тепловой эффект растворения дипептида.

Концентрация дипептидов варьировалась в интервале 0.006-0.007 моль/кг. Средние арифметические значения из 2-3 полученных величин энтальпий растворения $\Delta_{
m sol} H^m$ дипептида в исследованной концентрационной области при моляльностях до 0.01 моль/кг можно принять за стандартные значения $\Delta_{sol}H^0$ ввиду низких концентраций биомолекулы и отсутствием концентрационной зависимости [11–13]. Все дипептиды (Reanal, 98+%) перед экспериментом подвергали перекристаллизации из смеси вода-этанол, сушили под вакуумом при 343 К в течение 48 ч. В экспериментах использовали дважды дистиллированную воду. Ксилит (Acros Organics, 99+%) использовали без дополнительной очистки. Растворы готовили весовым методом с точностью до 0.0001 г.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитанные стандартные энтальпии растворения по $\Delta_{sol}H^0$ L- α -аланил-L- α -аланина (Ala-Ala), DL- α -аланил-DL- α -аланина (DL-Ala-DL-Ala) и β -аланил- β -аланин (β -Ala- β -Ala) в растворах воды с ксилитом (Xyl) представлены в табл. 1. Энтальпии переноса дипептидов рассчитывали по формуле:

$$\Delta_{\rm tr} H^0({\rm w} \to {\rm w} + {\rm y}) = \Delta_{\rm sol} H^0({\rm x} \to {\rm w} + {\rm y}) - - \Delta_{\rm sol} H^0({\rm x} \to {\rm w}),$$
(1)

где $\Delta_{tr} H^0(w \to w + y)$ – стандартные энтальпии переноса дипептидов из воды в водные растворы ксилита, $\Delta_{sol} H^0(x \to w + y)$ – стандартные энтальпии растворения дипептидов в водном растворе ксилита, $\Delta_{sol} H^0(x \to w)$ – стандартные энтальпии растворения дипептидов в воде.

Зависимости энтальпий переноса $\Delta_{tr}H^0$ L-аланина [14] и изученных дипептидов из воды в водные растворы многоатомного спирта от мольной доли ксилита (X_2) представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, полученные зависимости для L-Ala и дипептидов $\Delta_{tr} H^0$ от мольной доли сорастворителя имеют экстремальный характер поведения в исследованном интервале концентраций многоатомных спиртов. Энтальпии переноса определяются различными вкладами с противоположными знаками от конкурирующих в растворе взаимодействий различной природы и процессов гидратации. Для анализа построенных графических зависимостей был использован подход, основанный на анализе модели взаимодействий растворенного вещества и сорастворителя [15]. В трехкомпонентных системах дипептид – ксилит – вода молекулы гидратированных растворенных вешеств находятся в непосредственной близости в процессе взаимодействия. В результате происходит частичная дегидратация веществ, что приводит к изменению природы и характера межмолекулярных взаимодействий в трехкомпонентных растворах. Рассчитанные энтальпии переноса для дипептидов будут определяться суммой вкладов теплот растворения с противоположными знаками. Происходящие изменения термохимических величин в многокомпонентной системе можно описать уравнением с несколькими слагаемыми с различными знаками:

$$\Delta_{\rm tr}H^0 = -\Delta H_1 - \Delta H_2 + \Delta H_3 + \Delta H_4, \qquad (2)$$

где ΔH_1 — ион-биполярные взаимодействия, происходящие между цвиттерионными центрами дипептидов и аминокислоты и ОН-группами многоатомного спирта; ΔH_2 – гидрофильно-гидрофильные групповые взаимодействия между пептидными группами олигопептидов C=O-NH и – ОН-группой полиспиртов, происходящие через образование водородной связи; ΔH_3 – гидрофобно-гидрофильные взаимодействия между неполярными областями дипептидов и L-аланина или ксилита и ОН-группами многоатомного спирта или цвиттерионных центров дипептидов и аминокислоты; ΔH_4 — гидрофобно-гидрофобные взаимодействия между неполярными областями дипептидов (аминокислоты) и многоатомного спирта.

Первые два типа взаимодействия вносят отрицательный, а третий и четвертый типы – положительные вклады в $\Delta_{
m tr} H^0$ дипептидов из воды в раствор ксилита с водой. Положительные значения $\Delta_{tr} H^0$ для DL- α -Ala-DL- α -Ala и L- α -Ala-L- α -Ala во всем интервале составов в растворах ксилита (рис. 1), указывают на преобладание третьего (ΔH_3) и четвертого (ΔH_4) типов взаимодействий. После прохождения максимума энтальпии переноса плавно уменьшаются, что означает доминирование ион-биполярных и гидрофильно-гидрофильных групповых взаимодействий. Преобладание данных типов взаимодействий особенно проявляется для линейного изомера диаланина с наиболее отрицательными энтальпиями переноса во всем интервале концентраций ксилита. При увеличении концентраций ксилита взаимодействия между полярными группами многоатомного спирта и цвиттер-ионными центрами дипептида становятся более сильными, что приводит к увеличению доли экзо-эффектов в трехкомпонентном растворе. Экстремумы на графиках зависимостей энтальпий переноса дипептидов и L-аланина при различных мольных долях многоатомного спирта означают, что вклады от гидрофобно-гидрофильных и гидрофобно-гидрофобных групповых взаимодействиях максимальны при соответствующих концентрациях ксилита.

Для количественной оценки межмолекулярных взаимодействий в водных растворах проведен регрессионный анализ в рамках теории Мак-Миллана—Майера [16] путем расчета энтальпийных коэффициентов парных взаимодействий (h_{xy}) олигопептида с молекулами многоатомных спиртов. Концентрационные зависимости $\Delta_{sol}H^0 =$



Рис. 1. Зависимости энтальпий переноса ($\Delta_{tr}H^0$) аминокислоты и дипептидов из воды в ее смеси с ксилитом от мольной доли многоатомного спирта (X_2) при 298.15 К: I - L-Ala-L-Ala, 2 - DL-Ala-DL-Ala, 3 - L-Ala [7], $4 - \beta$ -Ala- β -Ala.

 $= f(m_y)$ дипептидов в растворах ксилита были обработаны полиномом второй степени:

$$\Delta_{\rm sol}H^0 = a_0 + a_1 m_{\rm v} + a_2 m_{\rm v}^2, \tag{3}$$

где m_y — моляльная концентрация многоатомного спирта, a_0 , a_1 , a_2 — коэффициенты аппроксимации, рассчитываемые методом наименьших квадратов.

В результате проведенного расчета были получены регрессионные уравнения для L- α -аланил-L- α -аланина (3), DL- α -аланил-DL- α -аланина (4) и β -аланил- β -аланин (5) в водных растворах ксилита

$$\Delta_{\rm sol}H^0 = (-10.79 \pm 0.02) + (4.56 \pm 0.09)m_y - \dots,$$
(4)
$$R = 0.998, \quad N = 10.$$

$$\Delta_{\rm sol}H^0 = (-7.29 \pm 0.01) + (2.68 \pm 0.06)m_y - \dots,$$
(5)
$$R = 0.999, \quad N = 10,$$

$$\Delta_{\rm sol} H^0 = (5.67 \pm 0.02) - (3.62 \pm 0.09) m_y - \dots, R = 0.999, N = 10.$$
(6)

Значения свободных членов уравнений (4)— (6) соответствуют стандартной энтальпии растворения дипептидов в чистой воде, которые хорошо согласуются с нашими и литературными значениями, например: $\Delta_{sol}H^0$ (L-Ala-L-Ala) = = -10.79 (кДж/моль) [17]; $\Delta_{sol}H^0$ (L-Ala-L-Ala) = = -11.00 (кДж/моль) [18]; $\Delta_{sol}H^0$ (DL-Ala-DL-Ala) = = -7.59 (кДж/моль) [19]; $\Delta_{sol}H^0$ (DL-Ala-DL-Ala) = = -7.29 (кДж/моль) [20]; $\Delta_{sol}H^0$ (β-Ala-β-Ala) =

Таблица 2. Энтальпийные коэффициенты парных взаимодействий h_{xy} (Дж кг моль⁻²) аминокислоты и дипептидов с ксилитом в водных растворах при 298.15 К

L-аланин	β-аланил– β-аланин	L-α-аланил- L-α-аланин	DL-α- аланил-DL- α-аланин
-216 ± 18 [14]	-1810 ± 47	2280 ± 44	1341 ± 28

5.67 (кДж/моль) [17, 21]. Энтальпийные коэффициенты парных взаимодействий h_{xy} были рассчитаны по уравнению: $h_{xy} = a_1/2$ [22]. Рассчитанные для дипептидов и полученные нами ранее значения для L-аланина [14] в растворах ксилита представлены в табл. 2.

Полученные энтальпийные коэффициенты парного взаимодействия h_{xy} имеют отрицательные значения, за исключением стереоизомеров диаланина. Это означает, что прямые гидрофильно-гидрофильные групповые взаимодействия между цвиттерионами биомолекул и ксилитом преобладают над дегидратацией компонентов раствора. Гидрофобная гидратация и гидрофобные взаимодействия существенно влияют на получаемые термодинамические характеристики растворения и играют важнейшую роль в системах с аминокислотами, олигопептидами и белками [23, 24]. Вокруг неполярных метильных групп молекулы воды более сильно связаны друг с другом и энергии для разрыва межмолекулярных связей при взаимодействии биомолекул требуется несколько больше [25]. Цвиттер-ионные молекулы за счет электростатических взаимодействий различной природы усиливают гидрофобные взаимодействия в трехкомпонентном водном растворе. Из табл. 2 видно, что положительные значения h_{xy} для стереоизомеров диаланина и существенная разница по абсолютной величине по сравнению со значением для линейной структурой β-Ala-β-Ala, указывает на вклад эффектов гидрофобных взаимодействий боковых метильных СН₃-групп пептида. В результате происходит уменьшение степени упорядоченности раствора при взаимодействии гидратированных молекул, увеличение доли эндотермичности растворения и росту величин энтальпийных коэффициентов парного взаимодействия.

Энтальпийные коэффициенты парного взаимодействия h_{xy} исследованных L-аланина и дипептидов с различным расположением углеводородных радикалов с лиофобными свойствами увеличиваются в ряду: β -Ala- β -Ala < L-Ala < < DL-Ala-DL-Ala < L-Ala-L-Ala. Более высокий h_{xy} для L-Ala-L-Ala по сравнению с β -Ala- β -Ala связан с наличием в молекуле двух боковых метильных групп, что способствует гидрофобной гидратации, проявляющейся в упрочнении водородных связей воды вокруг CH_3 -групп. Кроме того, метильные группы могут стерически препятствовать электростатическим и донорно-акцепторным взаимодействиям пептидной группы CONH с полярными OH-группами ксилита. В результате экзотермичность растворения β -аланил— β -аланина растет и h_{xy} для системы дипептид-ксилит становится отрицательным. Частичное замещение L-стереоизомера на D-форму приводит к более отрицательным значениям для рацемической смеси двух энантиомеров по сравнению с одной структурой дипептида. Это означает, что пространственное расположение метильной группы также влияет на получаемые термохимические характеристики взаимодействия.

В молекуле L-α-аланил-L-α-аланина по сравнению с L-аланином появляются одна дополнительная пептидная группа CONH, способная к донорно-акцепторным взаимодействиям, что вносит значительный энтальпийный экзотермический эффект в трехкомпонентную систему. С другой стороны, молекула дипептида содержит дополнительные метиленовую и метильную группы, что способствует увеличению степени дегидратации и гидрофобного взаимодействия при растворении L-α-аланил-L-α-аланина и росту эндотермических эффектов. Анализ величин h_{xy} показывает, что основной вклад в термодинамику растворения вносят прямые взаимодействия пептидной группы и цвиттерионных центров L-αаланил-L-α-аланина с полярными ОН-группами ксилита, что отражается в более отрицательном значении.

Таким образом, проведенное исследование показало существенное влияние структурной и стереоизомерии, гидрофобных взаимодействий молекул дипептидов и ксилита на термохимические характеристики растворения биомолекул. Обнаружено более сильное взаимодействие рацемической смеси энантиомеров по сравнению с Lpcтереоизомером алифатического дипептида и экранирование прямых взаимодействий L(DL)- α -аланил-L(DL)- α -аланина с ксилитом через пептидную CONH-группу разветвленных форм диаланина по сравнению с линейной β -формой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания № АААА-А21-121011490059-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barone G., Castronuovo G., Elia V., Srassinopoulou K. //* J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1984. V. 80. № 11. P. 3095.

https://doi.org/10.1039/F19848003095

2. *Dill K.A.* // Biochemistry. 1990. V. 29. № 31. P. 7133. https://doi.org/10.1021/bi00483a001 Timasheff S.N. // Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1993. V. 22. P. 67.

https://doi.org/10.1146/annurev.bb.22.060193.000435

- Granström, T.B., Izumori, K., Leisola, M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 277. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0761-3
- Tyunina E.Yu., Mezhevoi I.N., Dunaeva V.V. // J. Chem. Thermodyn. 2020. V. 150. 106206. https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106206
- Tyunina E.Yu., Mezhevoi I.N., Stavnova A.A. // J. Mol. Liquids. 2021. V. 329. 115568. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115568
- 7. Баделин В.Г., Тюнина Е.Ю., Межевой И.Н. // Журн. прикл. химии. 2007. Т. 80. Вып. 5. С. 732. [Badelin V.G., Tyunina E.Yu., Mezhevoi I.N. // Russ. J. Appl. Chem. 2007. V. 80. P. 711. https://doi.org 10.1134/S1070427207050047].
- Wadsö I., Goldberg R.N. // Pure Appl. Chem. 2001. V. 73, P. 1625. https://doi.org/10.1351/pac200173101625
- 9. *Archer D.G.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1999. V. 28. P. 1. https://doi.org/10.1063/1.556034
- 10. *Wadso I.* // 7 Science Tools the LKB Instrument J. 1966. V. 13. P. 33.
- 11. *Межевой И.Н., Баделин В.Г. //* Изв. акад. наук. Сер. химич. 2008. № 12. С. 2402.
- Kustov A.V., Antonova O.A., Smirnova N.L. // J. Mol. Liquids. 2017. V. 232. P. 214. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.065
- Kustov A.V., Antonova O.A., Smirnova N.L. // J. Ther. Anal. Calorim. 2017. V. 129. P. 461. https://doi.org/10.1007/s10973-017-6172-0

- Межевой И.Н., Баделин В.Г. // Журн. физ. химии. 2013. Т. 87. № 4. С. 610.
- Lilley T.H. // Pure Appl. Chem. 1993. V. 65. P. 2551. https://doi.org/10.1351/pac199365122551
- McMillan W.G., Mayer J.E. // J. Chem. Phys. 1945. V. 13. P. 276. https://doi.org/10.1063/1.1724036
- 17. Barannikov V.P., Kurbatova M.S., Mezhevoi I.N. // Thermochim. Acta. 2020. V. 689. 178647. https://doi.org/10.1016/j.tca.2020.178647
- Matsumoto M., Amaya K. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1983.
 V. 56. № 8. P. 2521. https://doi.org/10.1246/bcsj.56.2521
- Nowicka B., Piekarski H. // J. Mol. Liquids 2002. V. 95. P. 323.

https://doi.org/10.1016/S0167-7322(01)00297-5

- 20. Баделин В.Г., Межевой И.Н. // Журн. орган. химии. 2017. Т. 87. С. 1357.
- Smirnov V.I., Badelin V.G. // Thermochim. Acta. 2011. V. 524. P. 35. https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.06.008
- Desnoyers J.E., Perron G., Avedikian L. et al. // J. Solution Chem. 1976. V. 5. P. 631. https://doi.org/10.1007/BF00648221
- Makhatadze G.I., Privalov P.L. // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 375. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80197-4
- 24. *Межевой И.Н., Баделин В.Г. //* Журн. орган. химии. 2014. Т. 84. Вып. 2. С. 229.
- Ide M., Maeda Y., Kitano H. // J. Phys. Chem. B. 1997. V. 101. P. 7022. https://doi.org/10.1021/jp971334m