

6. Лебедев, В.И. Функциональный анализ и вычислительная математика / В.И. Лебедев. - М.: Физматлит. - 1994. - 296 с.
7. Данфорд, Н. Линейные операторы: общая теория / Н. Данфорд, Дж. Т. Шварц. - М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. - 427 с.
8. Ректорис, К. Вариационные методы в математической физике и технике: / К. Ректорис. - М.: Изд-во иностранной литературы. - 1985. - 381 с.
9. Тихонов, А.Н. Методы решения некорректных задач / А.Н. Тихонов, В.Я. Арсенин. - М.: Физматлит. - 1979. - 288 с.
10. Ланцош, К. Практические методы прикладного анализа. / К. Ланцош - М.: Физматлит. - 1961. - 524 с.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЕПАРИНА С КАТИОНАМИ ЦИНКА(II) И АМИНОКИСЛОТой (ПРОЛИН)

Скобин Михаил Игоревич,
Крюков Тимофей Владимирович,
Феофанова Мариана Александровна

*Тверской государственный университет, аспирант,
город Тверь.*

Исследования взаимодействий в системе, включающей высокомолекулярный гепарин, ионы Zn^{2+} и аминокислоту (пролин), проводилось по экспериментальным данным рН-метрического титрования водных растворов ($I = 0.15$ (NaCl), $t = 37^\circ C$) при соотношении 1 : 1 : 1 исходных концентраций составляющих компонентов системы методом математического моделирования. Расчёт показал наличие в системе множества комплексных форм, включая и интересующие нас тройные комплексы. Определены константы устойчивости обнаруженных комплексных форм. Построена и проанализирована диаграмма распределения комплексных форм в исследуемой системе: $ZnCl_2 - Na_4Hep - HPro - H_2O - NaCl$.

Ключевые слова: константа устойчивости (stability constant), гепарин (heparin), пролин (proline), цинк (zinc), рН-метрия (pH-meter), математическое моделирование (math modeling).

Целью работы является экспериментальное и теоретическое изучение химических равновесий в сложных многокомпонентных системах вида: $ZnCl_2 - Na_4Hep - HPro - H_2O - NaCl$ и определение констант образования тройных, смешаннолигандных комплексов с помощью методов математического моделирования, а также рН-метрического титрования.

Итак, гепарин — кислый серосодержащий гликозаминогликан (рис. 1), впервые выделенный из печени.

Мономерное звено гепарина (рис. 2) — это дисахарид, представленный уроновой кислотой. Моносахарид уроновой кислоты может быть или α -L-идуруновой кислотой или β -D-глюкуроновой кислотой. Моносахарид β -D-глюкозамина может быть незамещен, сульфатирован или ацетилирован по аминогруппе.

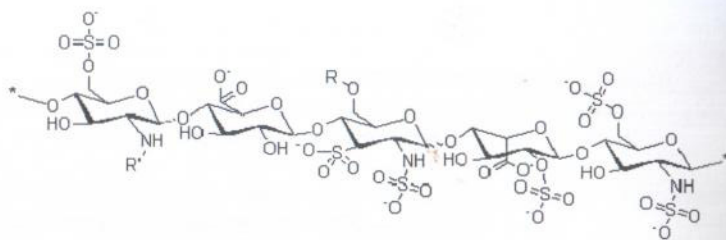


Рис. 1. Цепочка из разнообразных мономерных звеньев, которые могут входить в состав структуры ВМ гепарина

Аминосульфатированный глюкозамин допускает 3-о- и 6-о-сульфатацию. Аминоацелированный глюкозамин может быть 6-о-сульфатирован [4, с. 8].

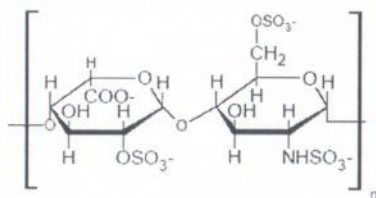


Рис. 2. Структурная формула мономерного звена гепарина

Из рассмотренных выше моносахаридов можно образовать 32 дисахарида. При рассмотрении всех разновидностей дисахаридов характерных для гепарина видно, что его мономерное звено может быть вообще не сульфатировано или включать от одной до трех сульфогрупп [7, с. 8].

В ходе эксперимента нами было сделано следующее допущение: благодаря высокой плотности отрицательного заряда макромолекула гепарина в растворе будет находиться в вытянутом, палочкообразном состоянии, поэтому анионные узлы должны оставаться доступными для взаимодействия с противоионами; макромолекула гепарина представляется нами как совокупность отдельных мономерных звеньев – дисахаридов, концентрация которых в растворе и принимается за концентрацию самого гепарина, а мономерное звено – за базисный термодинамический компонент раствора [5, с. 8].

Выбор иона Zn^{2+} для исследования обоснован его участием во многих важных процессах в кровеносной системе человека [2, с. 8].

Пролин - α -аминокислота, одна из двадцати, кодирующих ДНК аминокислот. Её кодонами являются CCU, CCC, CCA и CCG.

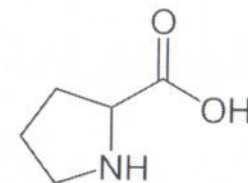


Рис. 3. Структурная формула молекулы пролина.

Данная аминокислота не является незаменимой - это означает то, что человеческий организм может сам её синтезировать. Из 20 аминокислот, формирующих белковые молекулы, пролин уникален тем, что аминогруппа связана не с одной, а двумя алкильными группами, являясь вторичным амином.

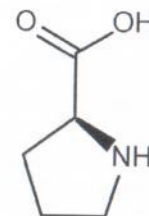


Рис. 4. Структурная формула изомерной формы L – пролина.

Пролин существует в цвиттер-ионной форме. Структура цвиттер иона будет меняться в зависимости от pH раствора, учитывая, что значения pKa глицина 1.99 и 10.96.

Циклическая структура боковой цепи пролина даёт ему исключительную конформационную жёсткость по сравнению с другими аминокислотами. Это также влияет на скорость образование пептидной связи между пролином и другими аминокислотами. Когда пролин образует пептидную связь, азота, входящий в его структуру, не имеет связей с водородом, значит, он не может выступать в качестве донора водородной связи, но может быть её акцептором.

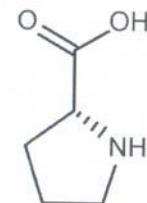


Рис. 5. Структурная формула изомерной формы D – пролина.

Аминокислота существует в двух оптически изомерных формах — L и D.

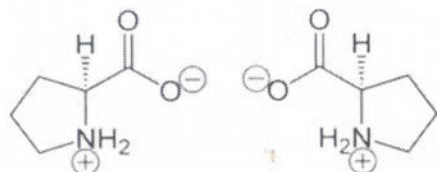


Рис. 6. Цвиттер-ионные структуры двух энантиомеров пролина: (S)-пролин (слева) и (R)-пролин.

В данной работе для изучения химических равновесий в системах, содержащих гепарин, ионы 3-d металла (цинк – Zn^{2+}) и аминокислоту (пролин – Pro^-) использовался стандартный фармакологический раствор гепарина (12000 Да) в форме тетранатриевой соли, производства «Московский эндокринный завод» - каждый миллилитр такого раствора содержал 5000 ЕД (1 ЕД = 0,0077 мг гепарина) или 38.5 мг соли.

Для приготовления основного раствора в колбу на 100 мл были добавлены заданные количества растворов пролина, гепарина и Zn^{2+} с заданными концентрациями, некоторое количество фонового электролита NaCl и 0.1 М HCl. Далее доводили дистиллированной водой до метки и опускали в ультратермостат UTU-2/77 на 15 минут, после чего приступали к титрованию.

Измерения значений pH проводили с помощью И-135, укомплектованного измерительным стеклянным электродом ЭСЛ 63-07 и насыщенным хлоридсеребряным электродом сравнения. Перед началом титрования была проведена калибровка pH-метра с помощью стандартных буферных растворов с величинами pH, равными 1.65 и 9.18, с учетом поправки на температуру. Титрование проводилось на фоне 0.15 М хлорида натрия [4, с. 8].

Таблица 1.

Компонентная матрица системы:

$Na_4Hep - Pro^- - Zn^{2+}$.

Базис: H^+ , Hep^{4-} , Pro^- , Zn^{2+} .

№	Молекулярная форма	$lg(\beta_i)$	H^+	Zn^{2+}	Hep^{4-}	Pro^-
1	H^+	0	1	0	0	0
2	Zn^{2+}	0	0	1	0	0
3	Hep^{4-}	0	0	0	1	0
4	Pro^-	0	0	0	0	1
4	OH^-	-13.40	-1	0	0	0
6	$Zn(OH)^+$	-8.67 ± 0.09	-1	1	0	0
7	$Zn(OH)_2$	-16.47 ± 0.06	-2	1	0	0
8	$Zn(OH)_3^-$	-27.75 ± 0.1	-3	1	0	0
9	H_2Pro^+	9.94 ± 0.65	2	0	0	1

10	$HHep^{3-}$	3.79	1	0	1	0
11	$HepPro^{5-}$	5.23 ± 0.17	0	0	1	1
12	$ZnPro^+$	4.57 ± 0.33	0	1	0	1
13	$ZnHHep^-$	6.06 ± 0.73	1	1	1	0
14	ZnH_2Hep	10.00 ± 0.22	2	1	1	0
15	$ZnHepPro^{3-}$	$lg(\beta_1)$	0	1	1	1

По уравнению материального баланса и закона действующих масс для функции pH по базисным компонентам для всех имеющихся систем была составлена математическая модель [3, с. 8]. Расчеты моделей химических равновесий и определение соответствующих констант выполнены с помощью комплекса вычислительных программ New DALSFKE (KCM Soft, 2000).

Для исследования ионно-молекулярных равновесий и расчёта констант образования тройных комплексов в системах: $Zn^{2+} - L_1 - L_2$ ($L_1: Hep^{4-}$; $L_2: Pro^-$) была записана компонентная матрица (табл. 1).

В исследуемой системе $Zn^{2+} - Na_4Hep -$ аминокислота (пролин – Pro^-) гомогенность раствора нарушалась при достижении критической величины pH, следовательно, в областях существования твердой фазы процедура математического моделирования не может быть проведена [5, с. 8].

Исходя из этих соображений, было принято решение ограничиться только лишь теми участками кривой титрования, на которых титруемый раствор заведомо гомогенен.

Для цинксодержащей системы в компонентной матрице учитывали логарифмы констант образования только трёх гидроксоформ $Zn(OH)_i^{2-i}$ ($i=1, 2, 3$) [6, с. 8], а вероятность образования хлоридных комплексов считали ничтожно малой из-за их малой устойчивости, следовательно, игнорирование их в модели не приведет к существенным искажениям результатов расчета [5, с. 8].

Методом pH-метрического титрования и математического моделирования были получены диаграммы распределения для системы $Zn^{2+} - L_1 - L_2$ ($L_1: Hep^{4-}$; $L_2: пролин - Pro^-$) (рис. 7).

Анализ полученной диаграммы распределения значимых форм в системе $Zn^{2+} - Na_4Hep - Pro^-$ показал интервалы pH, где концентрация тройных комплексов наибольшая, что можно использовать для выделения их в твёрдом виде. Также на диаграмме видно, что концентрация кислой комплексной формы $ZnHepPro^{2-}$ растёт до pH = 3,5, а потом резко уменьшается, что свидетельствует о разрушении комплекса. Средняя комплексная форма $ZnHepPro^{3-}$ представляет меньший интерес и существует в коротком интервале pH от 3,5 до 9,7.

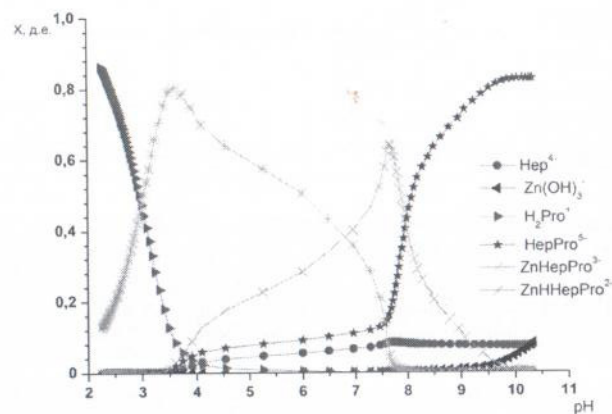


Рис. 7. Концентрационная диаграмма распределения значимых форм в системе $Zn^{2+} - Na_4Hep - Pro^-$ при эквимольном соотношении $M:L_1:L_2$. Температура $37^\circ C$, фоновый электролит $0.15 M NaCl$.

Величины десятичных логарифмов констант образования комплексов, состоящих из высокомолекулярного гепарина, аминокислоты (пролин) и металла (цинк(II)) представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Итоговая база данных по логарифмам констант образования комплексов, состоящих из высокомолекулярного гепарина, аминокислоты (пролин) и металла (Zn^{2+}).

$I = 0.15 (NaCl), t = 37^\circ C.$

Равновесие	$lg\beta$
$Hep^{4+} + Pro^- + Zn^{2+} \leftrightarrow HepProZn^{3-}$	9.54098 ± 0.29
$Hep^{4+} + H^+ + Pro^- + Zn^{2+} \leftrightarrow$	16.26179 ± 0.31

Таким образом, по результатам моделирования металл-ионных равновесий в системе: $Zn^{2+} - L_1 - L_2$ ($L_1: Hep^{4+}; L_2: Pro^-$) зафиксировано образование очень устойчивого кислого смешаннолигандного комплекса ($HepHProZn^{2-}$) и менее устойчивого среднего комплекса ($HepProZn^{3-}$).

Список литературы:

1. Гараева С.Н. Аминокислоты в живом организме / С.Н. Гараева, Г.В. Редкозубова, Г.В. Постолати. - Типография Академии Наук Молдовы, 2009, - 552 с.

2. Живописцев В. П. Аналитическая химия цинка / В. П. Живописцев, Е. А. Селезнёва. - Москва: Изд. «Наука», 1975. - 200 с.
 3. Россоти, Ф. Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворе / Ф. Россоти, Х. Россоти. - М.: Мир, 1965.
 4. Семёнов А.Н. Физико-химические закономерности образования металлокомплексов ионов некоторых s-, d- и f-элементов с гепарином: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / А.Н. Семенов. - Тверь, 2010. - 23 с.
 5. Феофанова М.А. Исследование взаимодействий высокомолекулярного гепарина и глицина с помощью методов рН-метрического титрования и математического моделирования / М.А. Феофанова, А.Н. Семенов, Е.Н. Кудрявцева // Вестник Тверского государственного университета. - 2009. - Серия "Биология и экология". Вып.11. - С.69-73.
 6. Martell, A.E. Critical stability constants. V.4: Inorganic complexes / A.E. Martell, R.M. Smith. - New-York.: Plenum Press. - 1976.
 7. Rabenstein D.L. Heparin and heparin sulfate: structure and function. Nat.Prod. Rep., 2002, Vol. 18, p. 312-331.