

УДК 536.654:547.466

В. Г. Баделин, В. В. Тюнина*, А. В. Краснов*

**ЭНТАЛЬПИЯ СУБЛИМАЦИИ АЛИФАТИЧЕСКОГО ДИПЕПТИДА
DL- α -АЛАНИЛ-DL- α -ВАЛИНА И ЭНЕРГИЯ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ
В КРИСТАЛЛЕ**

**SUBLIMATION ENTHALPY OF ALIPHATIC DIPEPTIDE OF
DL- α -ALANYL-DL- α -VALINE AND ENERGY OF HYDROGEN BONDS
IN THE CRYSTAL**

Учреждение Российской Академии наук Институт химии растворов РАН
153045 Иваново, ул. Академическая, 1

*Ивановский государственный химико-технологический университет,
кафедра физики
153000 Иваново, пр. Ф. Энгельса, 7

Методом масс-спектрометрии исследован процесс сублимации алифатического дипептида DL- α -аланил-DL- α -валина. Определен диапазон температур, в котором происходит сублимация препарата в виде мономерных молекулярных форм. Впервые получено значение энтальпии сублимации дипептида. Используя полуэмпирические методы квантовой химии (AM1), выполнены расчеты энергии водородной связи между молекулами в кристалле DL- α -аланил-DL- α -валина.

Ключевые слова: сублимация, энтальпия сублимации, DL- α -аланил-DL- α -валин, энергия водородной связи в кристалле.

By mass-spectrometry method the process of sublimation of DL- α -alanyl-DL- α -valine aliphatic dipeptide was investigated. The range of temperatures in which there is a sublimation of a substance as monomeric molecular forms was determined. The value of sublimation enthalpy of the dipeptide was obtained for the first time. Using semi-empirical methods of quantum chemistry (AM1), the calculations of energy of H-bond formation between molecules in crystal form of DL- α -alanyl-DL- α -valine were carried out.

Key words: sublimation, enthalpy of sublimation, DL- α -alanyl-DL- α -valine, energy of H-bond formation in crystal.

Несмотря на то, что к настоящему времени выполнено большое число экспериментальных и теоретических исследований, посвященных изучению сублимации различных кристаллов (металлических, ионных, валентных, полупроводниковых) [1], особый интерес вызывают молекулярные кристаллы, в узлах кристаллической решетки которых располагаются обычно молекулы, обладающие большей протяженностью и объемом. В самом общем случае, энергия межмолекулярного взаимодействия в молекулярных кристаллах складывается из ориентационного, индукционного и дисперсионного эффектов [2]. Однако для кристаллов, содержащих полярные молекулы, в том числе цвиттер-ионы, значительный вклад в полную энергию могут вносить электростатиче-

ские взаимодействия и образование водородных связей. Определение характера взаимодействий в кристалле требует знания энтальпий сублимации.

Исследование тепловых свойств модельных соединений белков (аминокислот, пептидов) в твердом состоянии и, в частности, изучение энтальпий сублимации и теплоемкости в широком интервале температур, позволяет получить экспериментальные значения фундаментальных термодинамических параметров этих соединений и связать их с динамическими свойствами и с конформационными особенностями макромолекул [3]. Кроме того, знание физико-химических свойств низкомолекулярных пептидов и аминокислот имеет большое значение в изучении высокомолекулярных соединений той же природы.

Как правило, пептиды разлагаются либо в кристаллической фазе при нагревании, либо в процессе сублимации [4]. Это осложняет прямое экспериментальное определение энтальпии сублимации и свидетельствует о том, что в кристаллах сила межмолекулярного взаимодействия соизмерима с прочностью внутримолекулярных ковалентных связей [1, 5]. Поэтому определение ΔH_{subl} органических кристаллов не потеряло своей актуальности до сих пор. Методы оценки энтальпии сублимации сравнительно немногочисленны и ориентированы в основном на углеводороды, не содержащие атомов N и O [6, 7]. Имеющиеся теоретические подходы к оценке тепловых эффектов испарения твердых тел относятся преимущественно к идеальным моноатомным кристаллам.

В работе в качестве объекта исследования выбран алифатический дипептид DL- α -аланил-DL- α -валин. В центре внимания работы – исследование процесса перехода дипептида из твердой фазы в газообразное состояние, определение диапазона температур, в котором происходит сублимация препарата в виде мономерных молекулярных форм с целью получения энтальпийных характеристик сублимации и оценки энергии образования водородных связей между цвиттерионами в кристалле.

Экспериментальная часть

При исследовании термодинамики сублимации DL- α -аланил-DL- α -валин (DL- α -Ala-DL- α -Val) использован масс-спектрометрический метод в сочетании с эффузионным методом Кнудсена, реализованный на магнитном масс-спектрометре МИ 1201, модернизированном для термодинамических исследований, с диапазоном масс 2–1400 а.е.м., регистрируемые токи ионов вплоть до $1 \cdot 10^{-12}$ А, энергия ионизирующих электронов – 50 эВ. Исследуемый образец малолетучего дипептида помещали непосредственно в молибденовую ячейку и испаряли его. Отношение площади открытого препарата к площади эффузионного отверстия составляло 1000. Исследования проводили в высоком вакууме ($2 - 3 \cdot 10^{-6}$ Па). Это обеспечивает минимальное столкновение исследуемых ионов с молекулами газа, что уменьшает потери ионов и предотвращает образование побочных продуктов [8, 9]. Для поддержания нужной температуры использовались две вольфрам-рениевые термодпары ВР-5/20, одна из которых размещалась в области нагревателя, а другая непосредственно в стенке ячейки для измерения температуры эксперимента с погрешностью $\pm 2,5$ °С.

В работе применяли хроматографически гомогенное соединение фирмы Reanal (Венгрия): DL- α -аланил-DL- α -валин. Дипептид осушали под вакуумом при комнатной температуре непосредственно перед использованием.

Результаты и их обсуждение

Полученный масс-спектр электронного удара для исследуемого дипептида DL- α -Ala-DL- α -Val приведен на рис. 1. Выполнена его расшифровка, определен состав ионов, образующихся в масс-спектре в результате ионизации молекул.

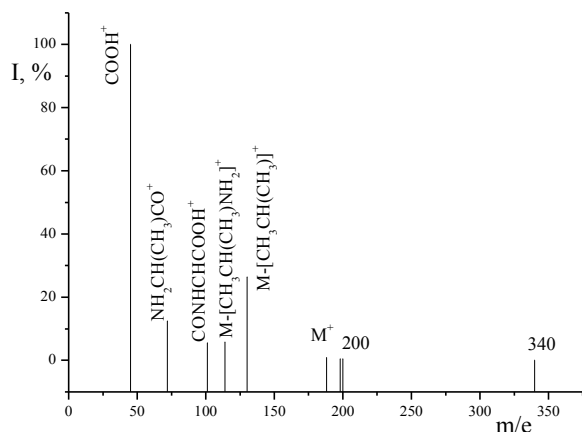


Рис. 1. Масс-спектр DL- α -Ala-DL- α -Val при T = 200 °C

Значения относительной интенсивности основных ионных токов для этого вещества при одной из температур представлены в табл. 1. Установлено, что в диапазоне температур 135 – 215 °C происходит сублимация DL- α -Ala-DL- α -Val в виде мономерных молекулярных форм. Показано, что фрагментация дипептидов и аминокислот носит сходный характер, причем идет с С-конца пептида с образованием иона COOH^+ [8, 10, 11]. Основные направления разрыва связей главной пептидной цепи при электронном ударе исследуемого DL- α -Ala-DL- α -Val совпадают с указанными в работах для аминокислот и дипептидов [10, 12]. Установлено (рис. 1), что при температурах выше 190 °C в масс-спектре DL- α -Ala-DL- α -Val регистрируются ионы, масса которых превышает массу молекулярного. Этот факт, по-видимому, связан с процессами образования полипептидов, которые происходят в твердой фазе при достижении данной температуры [13].

Таблица 1

Масс-спектр молекул DL- α -Ala-DL- α -Val (T=150°C, U_{ион}=50В)

m/e	Молекулярная форма	I _{отн.} , %
45	COOH^+	100
73	$\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}^+$	12
101	CONHCHCOOH^+	6
114	$\text{M}-[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2]^+$	6
130	$\text{M}-[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)]^+$	26
188	M^+	1

На основании экспериментальных данных построены температурные зависимости ионных токов исследуемого дипептида. Для определения энтальпии сублимации, исходя из измеряемых ионных токов, применялась процедура, в основе которой лежит уравнение изобары реакции [14] в виде:

$$\ln(IT) = -(\Delta H_{\text{sub}}/RT) + C. \quad (1)$$

Показано, что экспериментальные данные для DL- α -Ala-DL- α -Val успешно описываются линейной зависимостью $\ln(IT) = f(1/T)$, по углу наклона которой находят $\Delta H_{\text{sub}} = -R \text{tg} \alpha$ (рис. 2).

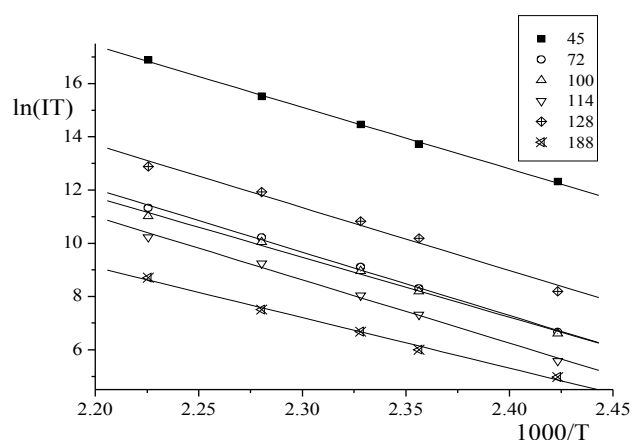


Рис. 2. Температурная зависимость произведения величины ионных токов и температуры для масс-спектра DL- α -Ala-DL- α -Val

В табл. 2 представлены полученные значения энтальпий сублимации исследуемого дипептида в интервале существования мономерных форм. Для экстраполяции энтальпий сублимации за пределы изученного температурного интервала необходимо учитывать зависимость ΔH_{sub} от T . Если известны теплоемкости твердой и газовой фаз (C_p^{crystal} и C_p^{gas}), то стандартную энтальпию сублимации $\Delta H_{\text{sub}}^{298}$ можно отнести к экспериментально измеренной при температуре T энтальпии сублимации ΔH_{sub}^T с помощью уравнения Кирхгоффа [1, 7]:

$$\Delta H_{\text{sub}}^{298} = \Delta H_{\text{sub}}^T + \int_{298}^T (C_p^{\text{crystal}} - C_p^{\text{gas}}) dT. \quad (2)$$

Авторами работы [3] показано, что наиболее подходящим является выражение, содержащее величину теплоемкости кристаллической фазы, поскольку тем самым учитываются особенности молекулярной структуры изучаемого соединения:

$$(C_p^{\text{crystal}} - C_p^{\text{gas}})[T-298,15] = [0,75 + 0,15C_{p,\text{crystal}}^{298}][T-298,15], \quad (3)$$

где $C_{p,\text{crystal}}^{298}$ может быть как экспериментальным, так и расчетным значением. Соотношение (3) справедливо в интервале температур $T = 200 - 500$ К. Таким образом, расчет стандартной энтальпии сублимации DL- α -Ala-DL- α -Val проводился по уравнению (4):

$$\Delta H_{\text{sub}}^{298} \approx \Delta H_{\text{sub}}^T + [0,75 + 0,15C_{p,\text{crystal}}^{298}][T - 298,15]. \quad (4)$$

Теплоемкость для исследуемого кристаллического дипептида измерена при 298,15 К [15] и приведена в табл. 2.

Таблица 2

Энтальпия сублимации алифатического дипептида

Дипептид	$\Delta H_{\text{sub}}(\text{exp.}),$ кДж/моль	$T_{\text{exp.}}$ К	$C_{p,\text{cryst}}^{298},$ Дж/(моль.К) [15]	$\Delta H_{\text{sub}}^{298},$ кДж/моль	$T_{\text{dec.}}$ К
DL- α -Ala-DL- α -Val	156 \pm 4	436	240	160 \pm 4	493

Как видно из табл. 2, разница между экспериментальными и стандартными значениями энтальпии сублимации невелика и сопоставима с погрешностью эксперимента.

Энтальпия сублимации дипептида имеет довольно большое значение по сравнению с неполярными органическими соединениями. Кристаллическая структура дипептида, имеющего характер биполярного иона, представляет собой упаковку цвиттер-ионов с водородными связями [16]. Структура DL- α -Ala-DL- α -Val представлена на рис. 3, а упаковка молекул в кристалле – на рис. 4.

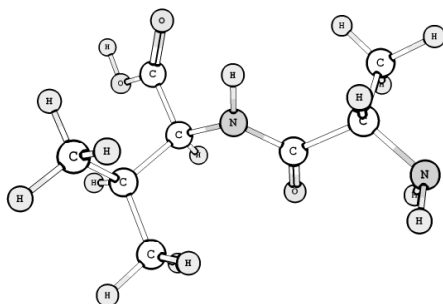


Рис. 3. Структура DL- α -Ala-DL- α -Val

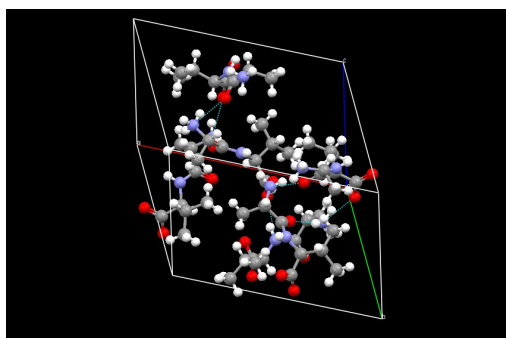


Рис. 4. Упаковка кристалла DL- α -Ala-DL- α -Val

Исследуемый дипептид DL- α -Ala-DL- α -Val преимущественно ориентирован группами RCOO⁻...N⁺H₃R. Таким образом, каждый цвиттер-ион в элементарной ячейке кристалла

связан с соседними цвиттер-ионами за счет водородных связей. Расчет энергии водородной связи между молекулами в кристалле проводился по формуле [11, 16]:

$$E^{HB} = D_{HB} \cdot [5(r_{hb}/r_{DA})^{12} - 6(r_{hb}/r_{DA})^{10}] \cdot \cos^4(\theta_{DNA}), \quad (5)$$

где $D_{HB} = 9,5$ ккал/моль – глубина равновесного парного потенциала при образовании водородной связи в димере H_2O ; $r_{hb} = 2,75$ Å; r_{DA} , θ_{DNA} – расстояние и угол между атомом донора и акцептора, соответственно. Расстояние между атомом донора (N) и акцептора (O) и угол θ_{DNA} взяты из Cambridge Structural Database (CSD). Рассчитанные значения энергии водородной связи приведены в табл. 3.

Таблица 3

**Структурные и энергетические параметры водородной связи
в кристалле DL- α -Ala-DL- α -Val**

Дипептид	Угол θ_{DNA} , °	Расстояние r_{NA} , Å	Расстояние r_{DA} , Å	Энергия водородной связи E^{HB} , кДж/моль
DL- α -Ala-DL- α -Val	153,51	1,945	2,768	- 25,04

Таким образом, показана возможность применения масс-спектрометрии в сочетании с эффузионным методом Кнудсена к изучению сублимации низколетучих и термонестабильных дипептидов. Получены масс-спектры электронного удара для DL- α -аланил-DL- α -валина. Определен диапазон температур 135 – 190 °С, в котором происходит сублимация DL- α -Ala-DL- α -Val в виде мономерных молекулярных форм. Установлено, что при температурах выше 190 °С в масс-спектрах DL- α -Ala-DL- α -Val регистрируются ионы, масса которых превышает массу молекулярного. Этот факт, по-видимому, связан с процессами образования полипептидов, которые происходят в твердой фазе при достижении данной температуры. Определены энтальпии сублимации мономерных форм дипептида; осуществлено их приведение к стандартным значениям при $T = 298$ К. Показано, что молекулы DL- α -Ala-DL- α -Val в кристаллической ячейке преимущественно ориентированы группами $RCOO \dots N^+H_3R$, и следовательно, каждый цвиттер-ион в элементарной ячейке кристалла связан с соседними цвиттер-ионами за счет водородных связей. Проведен расчет структурных и энергетических параметров водородных связей в дипептиде DL- α -Ala-DL- α -Val. Полученные результаты свидетельствуют о том, что довольно высокое значение энтальпии сублимации дипептида по сравнению с органическими молекулярными веществами обусловлено вкладами от электростатических взаимодействий между цвиттер-ионами и наличием водородных связей в кристалле.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 07-03-00369).

Список литературы

1. Кемпбел Дж. Современная общая химия. М. : Мир, 1975. Т. 3.
2. Биологически активные вещества в растворах: структура, термодинамика, реакционная способность / под ред. А. М. Кутепова. М. : Наука, 2001. 403 с.
3. Chickos J. S., Acree Jr. W. E. // J. Phys. Chem. Ref. Data. 2002. Vol. 31. № 2. P. 537–702.
4. De Kruif C. G., Voogd J., Offringa J. C. A. // J. Chem. Thermodyn. 1979. Vol. 11. P. 651–656.
5. Комтерел Т. Прочность химической связи. М. : Иностран. лит-ра, 1956.
6. Арнаутова Е. А., Захарова М. В., Пивина Т. С. и др. // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 12. С. 2872–2881.
7. Брединайдер С. Свойства газов и жидкостей. М. ; Л. : Химия, 1966. Гл. V. С. 162–165.
8. Методы практической биохимии / под ред. Б. Уильямса, К. Уилсона. М. : Мир, 1978. 273 с.
9. Вульфсон Н. С., Заикин В. Г., Микая А. И. Масс-спектрометрия органических соединений. М. : Химия, 1986. 312 с.
10. Якубке Х. -Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: пер. с нем. М. : Мир, 1985. 456 с.
11. Пелипец О. В. Исследование термодинамики испарения ErCl_3 , EuBr_2 и EuCl_2 и строения молекулярных форм по данным высокотемпературной масс-спектрометрии и газовой электронографии : Дисс. ... канд. хим. наук, Иваново : ИГХТУ, 2000. 140 с.
12. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М. : Просвещение, 1987. 815 с.
13. Племенков В. В. Введение в химию природных соединений. Казань, 2001. 376 с.
14. Пентин Ю. А., Вилков Л. В. Физические методы исследования в химии. М. : Мир, 2006. 683 с.
15. Badelin V. G., Kulikov O. V., Vatagin V. S. et al. // Thermochim. Acta. 1990. Vol. 169. P. 81–93.
16. Молекулярные структуры. Прецизионные методы исследования: пер. с англ. / под ред. А. Доиеникано, И. Харгиттай. М. : Мир, 1997. 671 с.

Поступила в редакцию 17.09.2009 г.