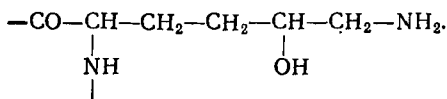


так как он присутствует в значительном количестве в одном из универсальных белков животных организмов — в коллагене (см. § 4.10). В ряде ферментов фигурирует оксизил (Олиз)



В белках некоторых морских организмов присутствуют дийодтирозил, дибромтирозил и т. д. Многие неканонические аминокислоты (орнитин, α , γ -диаминовалериановая кислота, α , δ -диаминомасляная кислота и т. д.) фигурируют не в белках, а в низкомолекулярных пептидах и участвуют в процессах метаболизма.

Все функциональное многообразие белков определяется многообразием последовательностей 20 аминокислотных остатков в полипептидных цепях. Разнообразие этих остатков определяется радикалами R; немногих типов таких атомных групп достаточно для обеспечения любых молекулярно-биологических процессов.

§ 2.3. СВОЙСТВА ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Свободные аминокислоты и входящие в состав белков основные и кислотные остатки являются электролитами. Функционируя в водной среде, они диссоциируют на ионы. Рационально пользоваться следующим определением Бренстеда: *кислота* — молекула, от которой отщепляется протон; *основание* — молекула, присоединяющая протон. Сам растворитель — вода — выступает как кислота в реакции $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$ и как основание в реакции $\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+$ (ион оксония).

Вода — чрезвычайно слабый электролит, ее константа диссоциации очень мала. При 25 °С в чистой воде, т. е. при $[\text{H}_2\text{O}] = 1$,

$$[\text{H}^+][\text{OH}^-] = K[\text{H}_2\text{O}] = 10^{-14} \text{ (моль} \cdot \text{л}^{-1})^2.$$

Так как $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-]$, концентрация водородных ионов в воде составляет 10^{-7} . Удобно пользоваться отрицательным десятичным логарифмом этой величины, обозначаемым рН. Для воды, т. е. для нейтральной среды рН = 7. Соответственно, для кислот рН < 7, а для оснований рН > 7.

Биологические электролиты обычно слабые, иными словами, они мало диссоциированы. *Константа диссоциации* кислоты, т. е. константа равновесия K реакции $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$ равна

$$K = \frac{a_{\text{H}^+} a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}}, \quad (2.1)$$

где $a_{\text{H}} = a_{\text{A}}$ и a_{HA} — активности соответствующих веществ в растворе. В растворах, близких к идеальным, активности практически равны молярным концентрациям. Поэтому

$$[\text{H}^+]^2 = K[\text{HA}],$$

и пользуясь отрицательным десятичным логарифмом K , обозначаемым $\text{p}K$, имеем

$$\text{pH} = 1/2(\text{p}K - \lg [\text{HA}]). \quad (2,2)$$

Степень ионизации слабой кислоты в воде определяется как

$$\alpha = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{A}^-] + [\text{HA}]} \approx \frac{[\text{H}^+]}{[\text{HA}]} = \sqrt{\frac{K}{[\text{HA}]}}. \quad (2,3)$$

Степень диссоциации кислоты, сила кислоты, растет с K , т. е. убывает с ростом $\text{p}K$, сила основания убывает с ростом K , т. е. растет с $\text{p}K$. Условие $[\text{A}^-] = [\text{H}^+]$ соблюдается только в нейтральном растворе. Вообще говоря,

$$\text{pH} = \text{p}K \pm \lg(a_{\text{A}}/a_{\text{HA}}),$$

или (в идеальном растворе)

$$\text{pH} = \text{p}K \pm \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha}. \quad (2,4)$$

Знак плюс отвечает кислоте, знак минус — основанию, для которого

$$\alpha = \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-] + [\text{HA}]},$$

что соответствует реакции $\text{A}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HA}$, где A^- — основание.
— Для неидеального раствора

$$\text{pH} = \text{p}K + \lg \frac{\gamma_{\text{A}^-}}{\gamma_{\text{HA}}} \pm \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha}, \quad (2,5)$$

где γ — коэффициенты активности.

Неидеальность раствора электролита определяется нехимическими взаимодействиями молекул и ионов. При достаточно высокой концентрации ионов каждый из них окружен ионной атмосферой — ионами противоположного знака. Теория Дебая — Хюккеля позволяет вычислить термодинамические характеристики и, следовательно, коэффициенты активности для неидеальных растворов электролитов.

Рассматриваемая совокупность ионов есть кооперативная система с сильным взаимодействием (см. § 1.5). В отличие от решетки Изинга, здесь взаимодействия медленно ослабевают с расстоянием между частицами, так как они имеют электроста-

тический характер, следуют закону Кулона. Однако для такой системы применимо приближение молекулярного поля (см. стр. 40).

Пусть в единице объема раствора содержится по n_i ионов сорта i ($i = 1, 2, 3, \dots, N$) с зарядами $e_i = |e|z_i$, где $|e|$ — абсолютная величина заряда электрона, z_i — число положительных или отрицательных зарядов на ионе (валентность иона). Так как раствор в целом электрически нейтрален, то

$$\sum_{i=1}^N e_i n_i = 0. \quad (2,6)$$

На каждый ион действуют электростатические силы, созданные другими ионами. В приближении молекулярного поля на данный ион действует некоторое среднее поле окружающих ионов. Если последние одинаковы, то такое же среднее поле характеризует действие выбранного иона на остальные. Это означает, что поле является самосогласованным. Электростатическое поле потенциально. Средний потенциал поля $\psi(r)$ должен, согласно законам электростатики, удовлетворять уравнению Пуассона

$$\Delta\psi(r) = -\frac{4\pi}{\varepsilon} \rho(r) = -\frac{4\pi}{\varepsilon V} \sum_i e_i n_i \exp[-e_i \psi(r)/kT]. \quad (2,7)$$

Здесь V — объем системы, ε — диэлектрическая проницаемость раствора, ρ — численная плотность ионов, зависящая от расстояния r до данного иона. В соответствии с Больцмановской статистикой $\rho(r)$ выражается экспоненциально через свободную энергию иона $e_i \psi$. При $e_i \psi \ll kT$ получаем, разлагая экспоненту в ряд и ограничиваясь линейными членами,

$$\Delta\psi(r) = \kappa^2 \psi(r), \quad (2,8)$$

где κ — параметр Дебая — Хюккеля, *радиус ионной атмосферы*, определяемый следующим образом:

$$\kappa^2 = \frac{4\pi}{V \varepsilon kT} \sum_i e_i^2 n_i. \quad (2,9)$$

Выражение для плотности $\rho(r)$ в уравнении (2.7) соответствует среднему полю, задаваемому распределением ионов. В свою очередь поле влияет на это распределение.

Пользуясь граничным условием $\psi(\infty) = 0$, находим решение уравнения (2.7)

$$\psi(r) = \frac{A \exp(-\kappa r)}{r}. \quad (2,10)$$

Для нахождения A предположим, что ионы имеют конечный диаметр a . Потенциал иона на расстояниях $r \leq a$ равен $\psi_i = e_i/\epsilon r$. Напишем условие непрерывности электрической индукции при $r = a$:

$$-\epsilon \frac{\partial \psi}{\partial r} \Big|_{r=a} = \frac{e_i A}{r^2} \exp(-\kappa r) (1 + \kappa r) \Big|_{r=a} = \frac{e_i}{a^2}.$$

Следовательно, средний потенциал поля равен

$$\psi(r) = \frac{e_i}{\epsilon r} \frac{\exp[-\kappa(r-a)]}{1 + \kappa a}. \quad (2.11)$$

Вычислим теперь свободную энергию взаимодействия ионов. Система, состоящая из центрального иона и окружающей его ионной атмосферы, подобна гальваническому элементу, который можно разряжать бесконечно медленно, обратимо и изотермично. Будем постепенно уменьшать заряды ионов от e_i до 0. При $r = a$ из (2.11) следует

$$\psi = \frac{e_i}{\epsilon a (1 + \kappa a)}. \quad (2.12)$$

Часть среднего потенциала, зависящая от зарядов ионной атмосферы, а не от собственного заряда иона, равна

$$\psi_e = \frac{e_i}{\epsilon a (1 + \kappa a)} - \frac{e_i}{\epsilon a} = -\frac{e_i \kappa}{\epsilon (1 + \kappa a)}. \quad (2.13)$$

При убывании зарядов ионов от e_i до ηe_i ($\eta < 1$) κ также убывает до $\eta \kappa$ в силу (2.9). Следовательно, ψ_e убывает до $\eta^2 \psi_e$, и соответствующее изменение свободной энергии равно

$$F_e = - \sum_i \frac{n_i e_i^2}{\epsilon} \kappa \int_0^1 \frac{\eta^2 d\eta}{1 + \eta \kappa a} = - \sum_i \frac{n_i e_i^2}{3\epsilon} \kappa g(\kappa a), \quad (2.14)$$

где

$$g(x) = \frac{3}{x^3} (\ln(1+x) - x + 1/2 x^2) = 1 - 3/4 x + 3/5 x^2 + \dots$$

Согласно (2.9) при $\kappa a \ll 1$ получаем

$$F_e = - \sum_i \frac{n_i e_i^2 \kappa}{3\epsilon} = - 1/3 \left(\sum_i \frac{n_i e_i^2}{\epsilon} \right)^{1/2} \left(\frac{4\pi}{kT} \right)^{1/2} = - \frac{\kappa^3 kT}{12\pi}. \quad (2.15)$$

Такова свободная энергия взаимодействия ионов. Изменение свободной энергии при удалении иона данного сорта из раствора равно

$$\frac{\partial F_e}{\partial n_i} = - \frac{e_i^2 \kappa}{2\epsilon} = kT \ln \gamma_i, \quad (2.16)$$

где γ_i — коэффициент активности ионов сорта i . Имеем

$$\ln \gamma_i = -\frac{1}{2} \frac{e^2 z_i^2}{ekT} \kappa = -\frac{e^3 z_i^2 (2\pi)^{1/2}}{(ekT)^{3/2}} J^{1/2}, \quad (2,17)$$

где величина

$$J = \frac{1}{2} \sum_i n_i z_i^2 \quad (2,18)$$

называется *ионной силой* раствора. Ионная сила, рН и рК — важнейшие характеристики раствора электролита.

Мы видим, что коэффициент активности ионов данного сорта зависит от концентраций ионов всех остальных сортов.

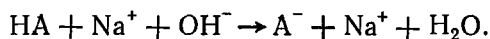
Изложенная теория Дебая — Хюккеля относится к сильным электролитам. Аминокислоты — слабые электролиты. Однако при больших ионных силах коэффициенты активности аминокислот отличны от единицы и на опыте определяют не рК, а эффективные константы диссоциации

$$pK' = pK + \lg(\gamma_A / \gamma_{HA}). \quad (2,19)$$

Для одноосновных электролитов отношение γ_A / γ_{HA} мало отличается от единицы и рК' достаточно близко к рК — разница составляет 0,1—0,2. Следовательно,

$$pH \approx pK \pm \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}. \quad (2,20)$$

При титровании слабой кислоты сильным основанием (скажем, NaOH) идет реакция



Следовательно, $[A^-] \approx [Na^+]$. Для степени ионизации имеем

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \approx \frac{c_{Na}}{c_{HA}}, \quad (2,21)$$

т. е. α равно отношению концентраций сильного и слабого электролита. Определение α , рН и, следовательно, рК производится путем титрования кислоты щелочью или основания кислотой. Для грубых определений применяются химические индикаторы. Гораздо более точные результаты дает *потенциометрический метод*, основанный на регистрации потенциала на электроде, помещенном в раствор. Этот потенциал непосредственно связан с активностью иона (например, протона) в растворе. При титровании активность меняется, меняется и потенциал электрода. Для определения рН применяется стеклянный электрод. Этот электрод и электрод сравнения (обычно каломельный) помещаются в раствор с известной концентрацией исследуемого вещества. Разность потенциалов при надлежащей градуировке измеряется

непосредственно в единицах рН. рК определяется из значений рН в точке нейтрализации по формуле (2,4). Методы титрования биологически функциональных веществ описаны в [1].

Аминокислоты — *амфотерные* электролиты, характеризующиеся двумя значениями рК, а именно величинами рК₁ и рК₂, отвечающими титрованию щелочью (нейтрализация СОО-группы) и кислотой (нейтрализация NH₃⁺-группы) соответственно. В табл. 2.2 приведены некоторые значения рК₁, рК₂ и рН. Последняя величина отвечает *изоэлектрической точке*. Если аминокислота заряжена положительно, она движется к катоду, если отрицательно, — к аноду. В изоэлектрической точке молекула амфотерного электролита нейтральна — она остается неподвижной и не участвует в электропроводности. Для рН_i имеем

$$pH_i = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2).$$

В нижней половине таблицы приведены константы ионизации аминокислот, содержащих ионогенные группы в боковой цепи. рК₁ всюду относится к карбоксильной группе. рК₃ — отрицательный десятичный логарифм третьей константы диссоциации (при наличии в аминокислоте добавочной ионогенной группы).

Таблица 2.2

Электрохимические константы аминокислот [2]

	рК ₁	рК ₂	рК ₃	рН _i
Глицин	2,35	9,78		6,1
Аланин	2,34	9,87		6,1
Валин	2,32	9,62		6,0
Лейцин	2,36	9,60		6,0
Серин	2,21	9,15		5,7
Пролин	1,99	10,60		6,3
Триптофан	2,38	9,39		5,9
Аспарагиновая кислота	2,09	3,87 (СООН)	9,82 (NH ₃ ⁺)	3,0
Глутаминовая кислота	2,19	4,28 (СООН)	9,66 (NH ₃ ⁺)	3,2
Тирозин	2,20	9,11 (NH ₃ ⁺)	10,1 (ОН)	5,7
Цистеин	1,96	8,18 (NH ₃ ⁺)	10,28 (SH)	5,07
Аргинин	2,02	9,04 (NH ₃ ⁺)	12,48 (гуанидин)	10,8
Лизин	2,18	8,95 (α-NH ₃ ⁺)	10,53 (ε-NH ₃ ⁺)	9,7
Гистидин	1,77	6,10 (имидазол)	9,18 (NH ₃ ⁺)	7,6

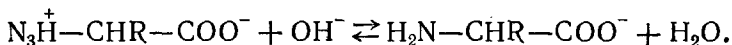
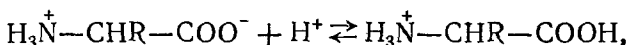
Изучение электрохимических свойств аминокислот доказывает их дипольную природу (стр. 60). Теплоты реакций ионизации органических кислот



невелики, они имеют порядок величины 1 ккал/моль. Напротив, для реакций диссоциации замещенных ионов аммония

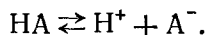


эти теплоты примерно равны 12 ккал/моль. Аминокислоты в кислом растворе характеризуются теплотами ионизации от 1,3 до 2,1 ккал/моль, в щелочном — от 10 до 13 ккал/моль. Следовательно, идут соответственно реакции



Другими доказательствами дипольного строения аминокислот являются сильное повышение диэлектрической проницаемости при их растворении в воде, большая плотность и высокие температуры плавления твердых аминокислот, что связано с сильным электростатическим взаимодействием.

Из изложенного следует необходимость работы с биологическими веществами при постоянных значениях pH. Стабилизация pH достигается с помощью *буферных растворов*. В присутствии нейтральных солей диссоциация слабых кислот и оснований не зависит от разведения. Рассмотрим раствор слабой кислоты HA и ее натриевой соли NaA. Напишем реакцию диссоциации кислоты:



Константа равновесия K_k этой реакции равна

$$K_k = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}, \quad (2,22)$$

и так как $[\text{A}^-] = [\text{H}^+]$, то

$$[\text{H}^+] = \sqrt{K_k [\text{HA}]}. \quad (2,23)$$

В присутствии соли NaA, которая диссоциирована гораздо сильнее кислоты, $[\text{A}^-] \approx [\text{NaA}]$. Следовательно,

$$K_k = \frac{[\text{H}^+][\text{NaA}]}{[\text{HA}]} \quad (2,24)$$

и

$$[\text{H}^+] = K_k \frac{[\text{HA}]}{[\text{NaA}]}. \quad (2,25)$$

Концентрация ионов H^+ зависит от отношения концентраций кислоты и соли, но не от степени разведения. Так, в растворе 0,1 *N* уксусной кислоты и 0,1 *N* уксуснокислого натрия $pH = 4,628$. При десятикратном разведении раствора водой $pH = 4,670$, при стократном разведении $pH = 4,73$.

При добавлении к 1 л воды 1 $см^3$ 0,01 *N* HCl величина pH уменьшается от 7 до 5. При добавлении такого же количества HCl к раствору 0,1 *N* CH_3COOH и 0,1 *N* CH_3COONa эта величина убывает с 4,628 до 4,540. Для стабилизации pH применяются ацетатные, фосфатные и другие буферы (см. [1, 3]).

§ 2.4. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

Белки — высокомолекулярные соединения со строго определенным химическим строением и молекулярным весом. Молекула белка состоит из одной или нескольких полипептидных цепей, образовавшихся в результате поликонденсации аминокислот.

Сейчас разработаны хорошие методы выделения и очистки белков [1]. Удаётся получить белки и в кристаллической форме. Вместе с тем многие важные белки до сих пор в чистом виде не выделены (например, ацетилхолинэстераза). Методы идентификации характерных групп и связей в белках описаны в биохимической литературе (см., в частности, [2]).

При объединении аминокислот в белковую цепь образуются *пептидные связи* $-NH-CO-$. На одном конце цепи находится $-COO^-$ -группа (С-конец), на другом — группа $-N^+H_3$ (N-конец). Молекулярные веса белков варьируют в широких пределах — от нескольких десятков тысяч (рибонуклеазы) до нескольких миллионов (гемоцианины). Характерные молекулярные веса отдельных полипептидных цепей, входящих в состав молекулы белка, порядка 20 000, что соответствует примерно 150—180 аминокислотным остаткам (средний молекулярный вес аминокислотного остатка равен 117). По установленнейшей терминологии молекулы, содержащие менее 100 аминокислотных остатков, называют не белками, а *полипептидами*. Таковы некоторые гормоны, например инсулин, адренокортикотропин (см. стр. 74). Полипептидами часто называют также синтетические полиаминокислоты и их производные.

Полинг и Кори установили методом рентгеноструктурного анализа модельных низкомолекулярных соединений, например амидов $R-CO-NH_2$, что пептидная (амидная) связь имеет специфическое строение, показанное на рис. 2.1 [4]. Четыре атома $-CO-NH-$ расположены в одной плоскости. Длина связи $N-C$, равная 1,32 Å, значительно меньше длины этой связи в алифатических аминах, где она составляет 1,47 Å. Это означает сопряжение связей $N-C$ и $C=O$, перекрывание их элек-