

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 см³ 0,01 *N* HCl величина pH уменьшается от 7 до 5. При добавлении такого же количества HCl к раствору 0,1 *N* CH₃COOH и 0,1 *N* CH₃COONa 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.

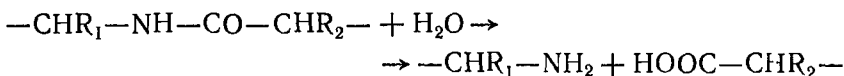
Сейчас разработаны хорошие методы выделения и очистки белков [1]. Удаётся получить белки и в кристаллической форме. Вместе с тем многие важные белки до сих пор в чистом виде не выделены (например, ацетилхолинэстераза). Методы идентификации характерных групп и связей в белках описаны в биохимической литературе (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⁺H₃ (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—NH₂, 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-

тронных оболочек, сопровождаемое сдвигом электронной плотности от азота к кислороду. Связь N—C должна считаться не единичной, но частично двойной. Плоское строение пептидной связи определяет особенности структуры полипептидной цепи в целом (см. § 4.2).

Химическое, и, тем самым, биологическое поведение белка определяется его аминокислотным составом и последовательностью остатков в цепи — *первичной структурой*. Современные методы позволяют определить аминокислотный состав белка без особых затруднений. Белок расщепляется на аминокислоты в результате *гидролиза* — реакции, обратной поликонденсации,



Гидролитическое расщепление происходит при действии на белок кислот, щелочей, а также протеолитических ферментов (протеаз), катализирующих разрыв пептидной связи. Получаемый гидролизат представляет собой смесь аминокислот. Качественное определение его состава производится с помощью характерных химических реакций, в ряде случаев дающих окрашенные продукты (см. [2]). Количественное определение состава гидролизата осуществляется путем его разделения на чистые аминокислотные фракции. Для этой цели пользуются хроматографией.

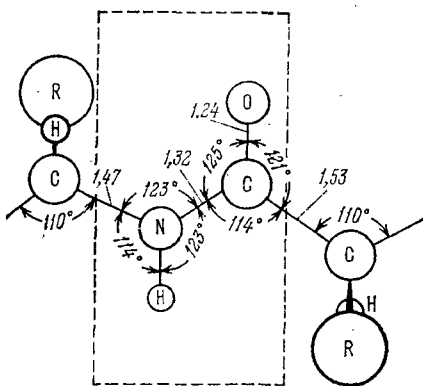


Рис. 2.1. Пептидная связь.

Хроматография — метод разделения веществ в газовой смеси или в растворе, основанный на пропускании газа или жидкости через пористые сорбенты. Этот метод был открыт в 1903 г. Цветом [5]. (Описание различных вариантов методов, применяемых для разделения и анализа белков и аминокислот, см. в [1].)

Представим себе колонку из пористого сорбента (скажем, набитую порошком Al_2O_3). Нальем сверху небольшое количество исследуемого раствора, целиком сорбируемого в колонке, и будем пропускать через нее с некоторой скоростью чистый растворитель. Растворитель будет вымывать, элюировать сорбированные вещества, и они будут смещаться в низ колонки. Перемещение слабо сорбируемого вещества происходит быстрее, чем

вещества, сорбируемого сильнее. Исследуемое вещество сорбируется в верхней части колонки и десорбируется в нижней ее части. Вследствие этого возникает максимум адсорбции, т. е. в сорбенте образуются зоны адсорбированного вещества, перемещающиеся по колонке с различной скоростью, так как сорбция зависит от химического строения вещества (и от природы сорбента). Если различия в сорбции значительны, то через некоторое время зоны, содержащие отдельные компоненты смеси, полностью разделяются, и оказывается возможным извлечь эти компоненты. Сущность хроматографии состоит в многократном повторении актов адсорбции — десорбции, приводящем в конечном счете к разделению компонент смеси. Очевидно, что в основе хроматографии находятся динамические, кинетические явления.

Для понимания хроматографии нужно рассматривать явления адсорбции и (или) ионного обмена в гетерогенных системах и распределения веществ между двумя жидкими фазами.

Молекулярная адсорбция в простейшем случае описывается изотермой Лэнгмюра

$$m = \frac{kc}{1 + Ac}, \quad (2,26)$$

где m — количество адсорбированного вещества, c — его концентрация в растворе, A и k — константы. В более сложных случаях полезно эмпирическое уравнение Фрейндлиха

$$m = Bc^\epsilon, \quad (2,27)$$

где B и ϵ — константы.

Об ионном обмене сказано далее. Распределение вещества между двумя жидкими фазами следует из условия равенства его химических потенциалов в равновесии

$$\mu_i^{(1)} = \mu_i^{(2)}$$

или

$$\mu_i^{(1)}(0) + RT \ln a_i^{(1)} = \mu_i^{(2)}(0) + RT \ln a_i^{(2)}. \quad (2,28)$$

Следовательно, отношение активностей a компонент в обеих фазах постоянно

$$\frac{a_i^{(1)}}{a_i^{(2)}} = \text{const}, \quad (2,29)$$

т. е. активность (концентрация) вещества в одной фазе линейно зависит от его активности (концентрации) в другой фазе.

Рассмотрим *равновесную* хроматографию, считая, что равновесие между веществом на твердом сорбенте и в растворе устанавливается мгновенно, и можно пренебречь продольной диффузией.

Уравнение материального баланса при перемещении однокомпонентного вещества сверху вниз в колонке имеет вид

$$-\frac{\partial c}{\partial x} = \alpha \frac{\partial c}{\partial V} + \rho \frac{\partial m}{\partial V}, \quad (2,30)$$

где m — количество вещества, сорбированного 1 г сорбента, ρ — число граммов сорбента на 1 см длины колонки, c — концентрация вещества, V — объем протекшего раствора (мл), α — доля объема пор в колонке, x — расстояние от верха колонки. Последнее уравнение можно переписать в виде

$$-\omega \frac{\partial c}{\partial x} = \alpha \frac{\partial c}{\partial t} + \rho \frac{\partial m}{\partial t}, \quad (2,31)$$

где ω — скорость протекания раствора. Задача состоит в решении такого рода уравнений, т. е. в нахождении зависимости m и c от ω , t и x . Эти зависимости дают законы деформирования границ хроматографических зон.

Если раствор представляет собой смесь двух веществ, то они сорбируются в разных местах колонки. При протекании раствора сначала из колонки выходит первая, более подвижная, а затем обе компоненты в виде исходного раствора. Выходная кривая (зависимость концентрации на выходе от объема V протекшего раствора) имеет вид, показанный на рис. 2.2. Она позволяет производить фронтальный анализ. Концентрация первой компоненты на первой ступени обозначена c_{11} , концентрации второй компоненты на первой и второй ступенях c_{12} и c_{22} . Объемы V_1 и V_2 называют объемами задержки. При лэнгмюровских изотермах адсорбции

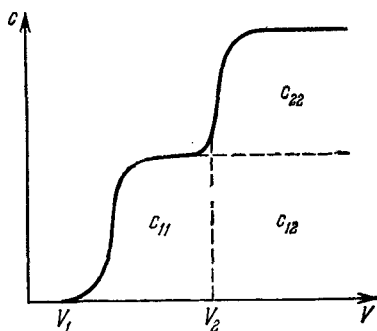


Рис. 2.2. Выходная кривая.

$$m_1 = \frac{k_1 c_{12}}{1 + l_1 c_{12} + l_2 c_{22}}, \quad m_2 = \frac{k_2 c_{22}}{1 + l_1 c_{12} + l_2 c_{22}}, \quad (2,32)$$

где m_1 и m_2 — количества первой и второй компонент в адсорбированном состоянии на 1 г сорбента, k_i и l_i — константы. Вместе с тем

$$m_2 = V_2 c_{22}, \quad m_1 = V_2 c_{12} - (V_2 - V_1) c_{11}. \quad (2,33)$$

Из (2.32) и (2.33) следует, что

$$c_{12} = c_{11} \frac{1 - V_1/V_2}{1 - k_1/k_2}. \quad (2,34)$$

Значения V_1 и V_2 определяют из хроматографических опытов с отдельными компонентами. Таким образом можно найти c_{12} , если известна величина c_{11} .

В действительности установление равновесия происходит отнюдь не мгновенно. Поэтому зоны несколько размываются. Теория объясняет это размытие. Распределение концентрации в зоне оказывается гауссовым.

Теория и методы хроматографии описаны в обширной монографической и журнальной литературе (см., например, [1, 6—10]). Здесь мы ограничиваемся лишь краткими сведениями о хроматографическом анализе белковых гидролизатов (ср. [1, 2, 10]).

Весьма наглядно двумерное разделение аминокислот на бумаге — метод «отпечатков пальцев». В этом случае сорбентом

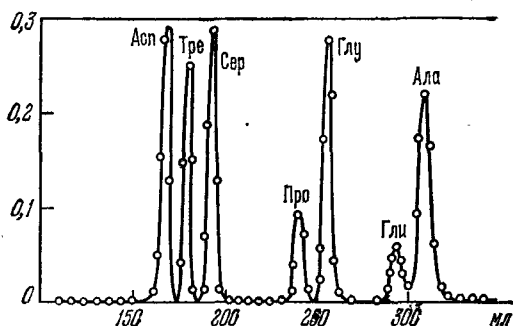


Рис. 2.3. Часть концентрационной кривой гидролизата рибонуклеазы.

По оси ординат — интенсивность окраски с нингидрином.
По оси абсцисс — объем элюата.

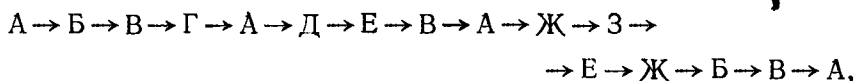
служит плотная фильтровальная бумага. На краю прямоугольного листа помещают каплю анализируемого гидролизата. Затем лист подвешивают к лотку со специальным растворителем и промывают им. Через определенное время бумагу высушивают, лист поворачивают на 90° и вновь промывают уже другим растворителем. Лист снова высушивают, обрызгивают растворами веществ, дающих цветные реакции с аминокислотами, и нагревают. На листе появляются цветные пятна, отвечающие разным аминокислотам. По их положению можно определить аминокислотный состав белка. Вырезая участки бумаги с пятнами и элюируя из них аминокислоты растворителями, можно определить весовое содержание аминокислот.

Совершенным методом исследования аминокислотного состава белков является хроматография на ионнообменных смолах, в частности на катионообменнике Дауэкс-50, содержащем сульфогруппы, связывающие NH_3^+ -группы аминокислот. Элюция производится при разных рН, концентрациях буфера и темпера-

гурах. Аминокислоты вымываются в определенной последовательности. Небольшие порции элюата одинакового объема собирают автоматически в пробирки при помощи коллектора. Каждую фракцию смешивают с дающим окраску реагентом (нингидрин), нагревают в стандартных условиях и определяют на фотометре интенсивность окраски. Проводят калибровку для каждой аминокислоты, учитывающую зависимость поглощения света от концентрации. Площадь каждого «пика» отвечает количеству данной аминокислоты в гидролизате (рис. 2.3) [11]. Вся процедура сейчас автоматизирована и установление аминокислотного состава белка не составляет проблемы.

§ 2.5. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется ее *первичной структурой*. Определение первичной структуры производится путем частичного гидролиза белка с помощью специфических протеаз, катализирующих расщепление пептидной связи лишь между определенными остатками. Так, трипсин атакует лишь те пептидные связи, которые образованы СО-группами остатков основных аминокислот — Арг или Лиз. В результате образуется смесь коротких полипептидных цепей, *олигомеров*. Такие короткие цепи называются *пептидами*. Их исследование производится посредством химических и физико-химических методов (хроматография, масс-спектроскопия). Воздействуя другим ферментом, можно «разрезать» белок по другим связям, получить смесь других пептидов. N- и C-концевые остатки белка (см. стр. 68) определяются в результате их химической модификации, предшествующей частичному гидролизу. Зная строение пептидов, полученных при специфическом расщеплении различными ферментами, можно установить первичную структуру белка. Допустим, что белковая цепь имеет структуру



где буквами обозначены остатки, стрелками — пептидные связи —NH—СО—. Подействуем на белок ферментом, разрывающим связь группы СО с остатком А. Получим пептиды $A, B \rightarrow V \rightarrow G \rightarrow A, D \rightarrow E \rightarrow V \rightarrow A, Ж \rightarrow З \rightarrow E \rightarrow Ж \rightarrow B \rightarrow V \rightarrow A$. Подействуем на белок другим ферментом, разрывающим связи с остатками Г и Е. Получим $A \rightarrow B \rightarrow V \rightarrow G, A \rightarrow D \rightarrow E, V \rightarrow A \rightarrow Ж \rightarrow З \rightarrow E, Ж \rightarrow B \rightarrow V \rightarrow A$. Последовательность пептидов нам неизвестна, но она легко устанавливается, так как