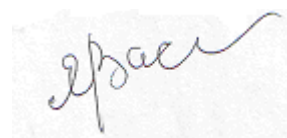


*На правах рукописи*



**ВАСИНА ЯНИНА АЛЕКСАНДРОВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ СКОРОСТИ И МЕХАНИЗМА ТВЁРДОФАЗНОГО  
ТЕРМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ L- $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ  
С КАРБОКСИЛЬНЫМИ, СЕРУ- И АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ  
ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ**

**02.00.04 – физическая химия**

химические науки

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискании учёной степени  
кандидата химических наук

Нижний Новгород

2013

Работа выполнена на кафедре химии общетехнического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет»

**Научный руководитель:** **Яблоков Вениамин Александрович**  
доктор химических наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ

**Официальные оппоненты:** **Фомин Владимир Михайлович**  
доктор химических наук, профессор  
ФГБОУ ВПО «Нижегородский  
государственный университет  
им. Н. И. Лобачевского»

**Кетков Сергей Юльевич**  
доктор химических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник  
ФГБУН «Институт металлоорганической  
химии им. Г. А. Разуваева» РАН,  
Нижний Новгород

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химии высокочистых веществ им. Г. Г. Девярых» РАН, Нижний Новгород

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.08 по химическим наукам при ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» по адресу 603950, г. Н. Новгород, пр. Гагарина, 23, кор.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского  
Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
доктор химических наук, профессор



**Сулейманов Е. В.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы** Работа посвящена изучению кинетики твердофазного термического превращения аминокислот  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$  с радикалом R, в состав которого входят карбоксильные, серу- и азотсодержащие группы.

Аминокислоты участвуют в метаболических процессах животных и растительных организмов, являются строительным материалом в синтезе полипептидных цепей белков. Общее число синтетических или включенных в природные соединения аминокислот исчисляется несколькими сотнями, и их число всё время растёт. Одним из направлений исследования аминокислот является синтез биосовместимых и биодegradуемых олигомеров и полимеров на основе аминокислот.

Известно, что стабильность и высокие потребительские качества широко используемых полимеров в быту и в промышленном производстве изделий из высокомолекулярных соединений имеют свою оборотную сторону. Они экологически опасны, не поддаются быстрому разрушению, оказавшись выброшенными в окружающую среду. В указанных обстоятельствах предпочтительными являются биополимеры, способные подвергаться эффективной биодegradации на безвредные для живой природы компоненты. Не меньшую ценность представляют биосовместимые сополимеры, полученные на основе аминокислот. Такие олигомеры и сополимеры могут использоваться в качестве средств доставки генных конструкций в клетки живого организма, изготовления биосовместимой керамики и во многих других областях практического применения.

Для осуществления синтеза олигомеров и сополимеров актуальным является исследование кинетических характеристик превращения аминокислот, сведения о которых практически отсутствуют, особенно в тех случаях, когда осуществляется твёрдофазное превращение аминокислот при высокой температуре. Указанное обстоятельство позволило нам сосредоточить внимание на исследовании кинетики твёрдофазного превращения L- $\alpha$ -аминокислот, изучить методами масс-спектрометрии и ИК-спектроскопии состав продуктов реакции с целью выяснения вероятного механизма процесса.

**Цель работы** состояла в исследовании кинетики твердофазного термического превращения двенадцати L- $\alpha$ -аминокислот, а также в изучении возможности протекания в исследованных температурных областях поликонденсации L- $\alpha$ -аминокислот с образованием полимерных продуктов. Для реализации указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- исследовать скорость термического превращения моноаминдикарбоновых кислот и их амидов, серусодержащих и гетероциклических аминокислот, диаминакарбоновых кислот;
- качественно оценить влияние радикалов R, входящих в состав  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$  на реакционную способность аминокислот;

- масс-спектрометрическим, ИК-спектроскопическим и времяпролетной MALDI-TOF MS методами определить состав продуктов реакции;
- на основании кинетических параметров и анализа продуктов реакции обосновать вероятный механизм твердофазного термического превращения аминокислот.

**Объекты исследования** В качестве объектов исследования выбраны *L*- $\alpha$ -аминокислоты  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$ , содержащие в составе R радикала  $\text{COOH}$  – группу [аспарагиновая (Asp), глутаминовая кислота (Glu)],  $\text{NH}_2\text{CO}$  – группу [аспарагин (Asn), глутамин (Gln)], аминогруппу [лизин (Lys), аргинин (Arg)], серу [метионин (Met), цистеин (Cys), цистин ( $\text{Cys}_2$ )] и азотсодержащие гетероциклы [пролин (Pro), гистидин (His), триптофан (Trp)].

**Методы исследования** Кинетические измерения проводились компенсационным методом в вакуумированной системе в статических условиях. ИК-спектроскопические, хромато-масс-спектрометрические измерения и времяпролетную MALDI-TOF MS применяли для определения состава продуктов термораспада.

**Научная новизна и практическая ценность работы** Впервые определены константы скорости и активационные параметры твердофазного термического превращения *L*- $\alpha$ -аминокислот  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$  с карбоксильными, серу- и азотсодержащими радикалами R. Доказано, что по своей реакционной способности аминокислоты располагаются в ряд:

Trp < His < Met < Asn <  $\text{Cys}_2$  < Asp < Lys < Arg < Pro < Cys < Gln < Glu.

Получены прямые доказательства твердофазных превращений аминокислот до низкомолекулярных олигомеров с помощью методов: ИК-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии и метода MALDI MS.

Предложен вероятный механизм твердофазной термической поликонденсации аспарагиновой кислоты. Установлено два температурных интервала превращения аспарагиновой кислоты в вакуумированной системе постоянного объема. При 190 – 207 °C реакция завершается образованием низкомолекулярной полиаспарагиновой кислоты и воды. В зоне температур 210 – 240 °C лимитирующим является процесс образования полисукцинимид в последовательном превращении аспарагиновая кислота – полиаспарагиновая кислота – полисукцинимид с выделением 2 моль воды на моль исходной аминокислоты.

Впервые предложен механизм твердофазной термической поликонденсации глутаминовой в полиглутаминовую кислоту в вакуумированной системе постоянного объема, непосредственно связанный со стадией образования лактама глутаминовой кислоты – 2-пирролидон-5-карбоновой кислоты.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Доказано, что твердофазное термическое превращение исследованных аминокислот до низкомолекулярных олигомеров подчиняется уравнению реакции первого порядка. Определены активационные параметры. Наличие

компенсационного эффекта указывает на однотипный механизм (гетеролитическая поликонденсация) в лимитирующей стадии.

2. Доказано, что полиаспарагиновая кислота может быть синтезирована из аспарагиновой кислоты, минуя стадию получения полисукцинимида. Установлен механизм твёрдофазной поликонденсации аспарагиновой и глутаминовой кислот.

3. Обоснован вероятный механизм превращения *L*- $\alpha$ -аминокислот  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$  с серу- и азотсодержащими радикалами на основании кинетических параметров и состава продуктов реакции.

**Область применения результатов** Результаты диссертационной работы могут быть использованы в областях науки и практики, связанных с разработкой методов синтеза полиаминокислот, используемых для получения биodeградируемых и биосовместимых сополимеров. Кроме того, они могут быть полезными при оценке вероятности появления токсичных продуктов при термической переработке пищевых продуктов для специалистов, занимающихся проблемами экологии, а также в учебном процессе для студентов, специализирующихся в области «Техносферной безопасности», «Экологии и природопользования».

**Степень достоверности полученных результатов** Достоверность полученных результатов исследований подтверждена апробацией работы, а также использованием современных физико-химических методов исследования.

**Апробация работы** Результаты работы представлены на: заочной научно–практической конференции «Естественные науки: актуальные вопросы и тенденции развития» (30 ноября 2011. Новосибирск. Россия); IX Международной дистанционной научно–практической конференции «Современные проблемы гуманитарных и естественных наук» (30 декабря 2011. Москва. Россия); V Международной научно-практической конференции «Современное состояние естественных и технических наук» (20.01.2012. Москва. Россия); II Конференции с международным участием «Успехи синтеза и комплексообразования» (23–27 апреля 2012. Москва. Россия); Международной заочной научно–практической конференции по биологии, химии, физике (8.06. 2012. Новосибирск. Россия); XIII Международной научно-практической конференции «Инновации в науке». (17.10.2012. Новосибирск. Россия); XI Международной конференции «Физикохимия олигомеров» (09-14.09.2013. Ярославль, Россия). Названия и фамилии авторов докладов приведены в списке публикаций.

**Публикации** По результатам проведённых исследований опубликованы 2 статьи в рецензируемых журналах и 6 тезисов докладов.

**Соответствие диссертации паспорту специальности** Диссертация по своим целям, задачам, содержанию, научной новизне и методам исследования соответствует п. 7 «Макрокинетика, механизмы сложных химических процессов» и п. 10 «Связь реакционной способности реагентов с

их строением и условиями осуществления химической реакции» паспорта специальности 02.00.04 – физическая химия.

**Личный вклад автора** Кинетические исследования выполнены автором диссертационной работы самостоятельно. Постановка задач, интерпретация полученных результатов, формулировка основных выводов осуществлялась совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

**Структура диссертации** Диссертационная работа изложена на 129 страницах, состоит из введения, 3 глав и выводов. Диссертация иллюстрирована 79 рисунками и 11 таблицами. Списки цитируемой литературы включает 134 наименований.

**Содержание работы** Во введении обосновывается актуальность темы, выбор объектов, цели и задачи исследования. В литературном обзоре (глава 1) анализируются литературные данные и обсуждаются свойства аминокислот, их структурные и термодинамические характеристики, некоторые особенности твердофазных процессов, а также процессы поликонденсации аминокислот, приводящие к образованию биодegradуемых полимеров. Вторая глава посвящена объектам и методам исследования. В третьей главе приводятся экспериментальные данные и обсуждаются результаты исследования.

## **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ СКОРОСТИ И МЕХАНИЗМА ТВЕРДОФАЗНОГО ТЕРМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ**

Плавление кристаллических аминокислот сопровождается их разложением. Мы обратили внимание, что температура газовой выделения летучих продуктов ( $T_{\text{газ.}}$ ) при нагревании аминокислот существенно ниже температуры, которая фиксируется как температура плавления ( $T_{\text{пл.}}$ ) вещества. Для количественного измерения скорости реакции фиксировали изменение давления ( $p$ ) летучих компонентов от времени реакции ( $t$ ) при температуре опыта в вакуумированной системе постоянного объёма.

#### **1. ИССЛЕДОВАНИЕ СКОРОСТИ И МЕХАНИЗМА ТВЕРДОФАЗНОГО ТЕРМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ МОНОАМИНОДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ**

##### **1.1. Аспарагиновая кислота**

Исследованы скорость и механизм твердофазной термической поликонденсации L-Asp в вакуумированной системе. Специфика проведения поликонденсации отличалась от техники эксперимента, использовавшейся в предыдущих работах Y. Wang et al. (2003 г.), С.Д. Варфоломеева с сотрудниками (2008 г.), тем, что выделяющиеся летучие вещества оставались в зоне реакции и их можно было проанализировать.

Удобным для количественного измерения скорости разложения Asp по изменению давления летучих компонентов от времени  $t$  реакции оказался интервал температур 190 – 230 °С.

На рис. 1 представлены кривые зависимости давления летучих продуктов термического превращения Asp от времени реакции в интервале температур 190 – 207 °С.

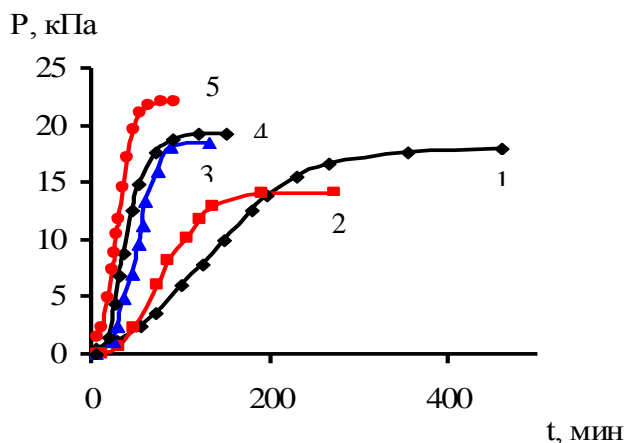


Рис.1. Зависимость давления газообразных продуктов термического превращения Asp от времени при температурах: 1 – 190, 2 – 195, 3 – 200, 4 – 205, 5 – 207 °С

Анализ газообразных продуктов реакции показал, что в указанном интервале температур поликонденсация Asp сопровождается выделением паров воды и следов углекислого газа. Количество выделяющейся воды составляет 0.7 моль, а углекислого газа 0.03 моль на моль Asp. В ИК-спектре твердого продукта поликонденсации присутствуют полосы поглощения, относящиеся к валентным колебаниям групп:  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1608  $\text{cm}^{-1}$ , 1710  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{NH})$  1530  $\text{cm}^{-1}$ , характерные для полиаспарагиновой кислоты (PAsp) и отсутствуют полосы валентных колебаний имидной группы полисукцинимида PSI.

Такой же ИК-спектр наблюдается для олигопептида, полученного при непрерывном удалении паров воды и углекислого газа из зоны реакции.

При более высоких температурах 210 – 230 °С на кривых зависимости давления летучих продуктов от времени реакции появляется излом, выделяющий на кривой два участка (рис. 2).

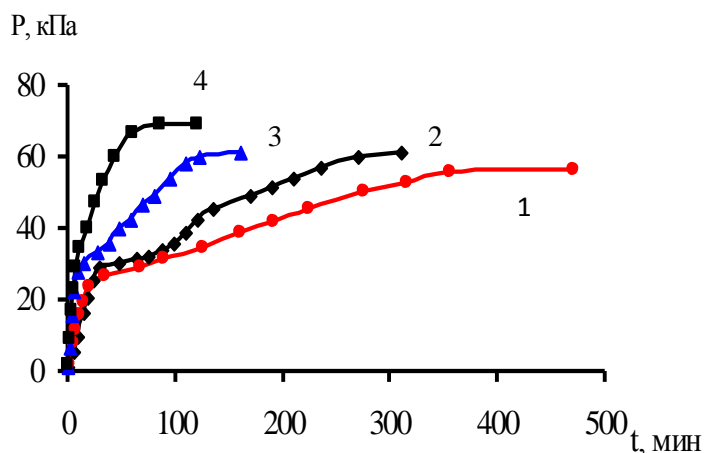


Рис. 2. Зависимость давления газообразных продуктов термического превращения Asp от времени при температурах: 1 – 210, 2 – 215, 3 – 220, 4 – 230 °С

В этих условиях количество выделяющейся воды возрастает до 1.95 моль, углекислого газа до 0.13 моль на моль Asp. В ИК-спектре конечного продукта поликонденсации присутствуют характеристические полосы поглощения PSI, относящиеся к валентным колебаниям имидного кольца:  $\nu(\text{C}=\text{O})$  1672  $\text{cm}^{-1}$ , 1700  $\text{cm}^{-1}$ , 1705  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{CN})$  1270  $\text{cm}^{-1}$ , 1393  $\text{cm}^{-1}$ , 1727  $\text{cm}^{-1}$ .

Количество выделяющейся воды в составе газообразных продуктов и данные ИК-спектроскопии указывают на образование PAsp в результате реакции поликонденсации Asp в интервале температур 190 – 207 °С. Образование небольшого количества углекислого газа происходит в результате декарбоксилирования некоторых звеньев полимерной цепи PAsp.

Начальный участок кривых термического превращения Asp при температурах 210–230 °С (рис. 2) соответствует поликонденсации, сопровождающейся образованием PAsp.

По кинетическим данным, снятым при температурах 190 – 207 °С (рис. 1) и по значениям  $p - t$ , относящимся к начальному участку кривых, снятых при 210 – 230 °С (рис. 2), были вычислены константы скорости  $k_1$  реакции первого порядка поликонденсации Asp в PAsp (табл. 1).

Лишь на глубокой стадии поликонденсации при 210 – 230 °С происходит образование PSI. Этому процессу соответствуют участки кривых в координатах  $p - t$  (рис. 2) после излома. По предельному давлению газообразных продуктов  $p_\infty$  после завершения реакции при 210 – 230 °С рассчитаны эффективные константы скорости ( $k_2$ ) и активационные параметры стадии превращения PAsp в PSI (табл. 1).

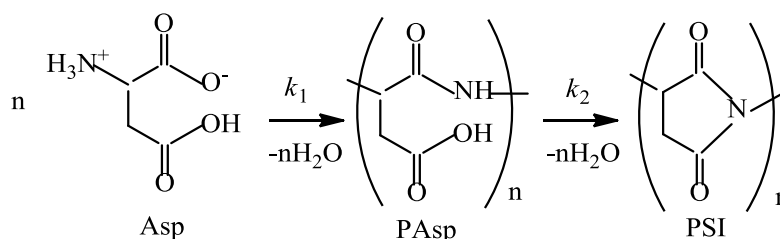
Таблица 1 Кинетические параметры термического превращения Asp

Реакция поликонденсации	T, °C	$k_1 \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	Реакция превращения	T, °C	$k_2 \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>
Asp	190	7	PAsp		
$\downarrow k_1$	195	20	$\downarrow k_2$		
PAsp	200	35	PSI		
	205	42	$E = 191 \pm 33$		
$E = 187 \pm 12$	207	54	кДж/моль		
кДж/моль	210	90	$\ln k_0 = 43 \pm 8$	210	9
$\ln k_0 = 44 \pm 3$	215	121		215	10
	222	267		222	20
	230	349		230	55

Аррениусовская зависимость констант скорости реакции образования PAsp ( $k_1$ ) от температуры в координатах  $\ln k_1 - 1/T$  выполняется во всем диапазоне температур 190 – 230 °С.



Полученные нами кинетические параметры и ИК-спектроскопические измерения позволяют высказать предположение о вероятном механизме термического превращения Asp в интервале температур 190 – 230 °С:



На первой стадии происходит поликонденсация Asp в PAsp. Скорость превращения PAsp в PSI на порядок ниже скорости образования PAsp из Asp (табл. 1), поэтому мы смогли отдельно определить эффективные константы скорости термического превращения двух последовательных стадий поликонденсации.

Реакция декарбоксилирования концевых групп PAsp вносит вклад в увеличение суммарного давления летучих веществ, поэтому константы скорости являются удельными скоростями двух параллельно протекающих процессов – реакции поликонденсации и декарбоксилирования на стадии образования как PAsp, так и PSI.

Результаты масс-спектрометрического анализа конечного продукта реакции методом времяпролетной MALDI MS свидетельствуют об образовании PSI при 210-230 °С. На полученном масс-спектре образца наблюдается несколько серий сигналов, отстоящих друг от друга на величину 97 Да, соответствующих массе звена PSI, что позволяет предположить возможную природу концевых групп образовавшихся полимерных молекул. Из представленного в диссертации спектра сделан вывод, что значение молекулярной массы олигомера не превышает 4000 Да.

Таким образом, поликонденсация Asp не всегда завершается образованием PSI. Характер продукта поликонденсации зависит от температуры реакции. Можно подобрать такой температурный режим (например, ниже 200 °С), когда процесс поликонденсации завершится только образованием PAsp, причем в составе полимерной цепи будут содержаться пептидные звенья, образовавшиеся в результате декарбоксилирования.

## 1.2. Глутаминовая кислота

В отличие от аспарагиновой в глутаминовой кислоте (L-Glu) вторая карбоксильная группа отделена от α-углеродного атома не одной, а двумя метиленовыми группами. Такая структурная особенность приводит к существенному изменению химических свойств аминокислот. Первичным актом термического превращения кристаллической Glu является равновесная реакция образования 2-пирролидон-5-карбоновой или пироглутаминовой кислоты (pyroGlu):



Сравнительное изменение давления летучих компонентов, образующихся при нагревании Glu и ругоGlu при повышении температуры, представлено на рис. 3.

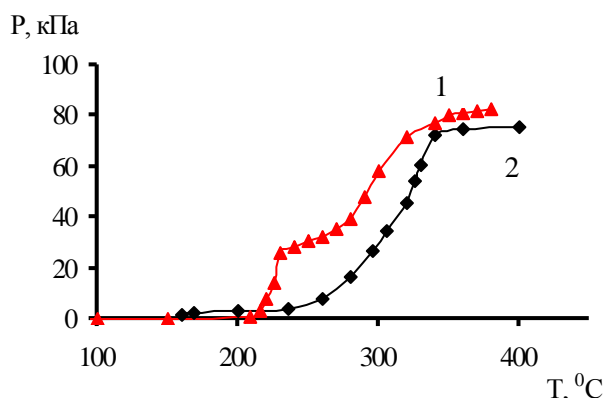


Рис.3. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Glu(1) и ругоGlu (2) от температуры

Циклическая ругоGlu проявляет большую термическую стабильность по сравнению с Glu. Понизив температуру твердофазного термического превращения Glu до 170-210 °С, можно полностью исключить терморазложение ругоGlu. Количественное превращение Glu в ругоGlu происходит при 175 °С, если непрерывно удалять образующуюся при циклизации воду при пониженном давлении.

На рис. 4 приведены кинетические кривые термического превращения Glu в вакуумированной системе в интервале температур 170–210 °С.

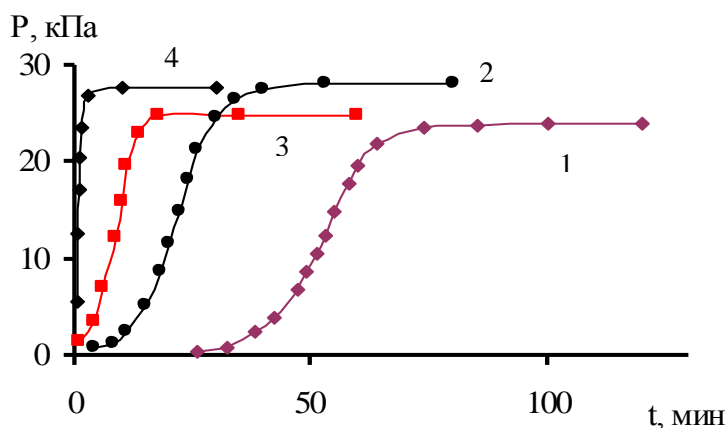


Рис. 4. Зависимость давления летучих продуктов термического превращения Glu от времени при следующих температурах: 1 – 170, 2 – 175, 3 – 180, 4 – 210 °С

ИК- спектр твердого продукта термического превращения Glu, образующегося через 7 часов после начала реакции при 175 °С, свидетельствует об исчезновении полос поглощения исходной Glu и появлении полос поглощения, относящихся к валентным колебаниям амидной группы (3303, 1720, 1384, 1209, 1116, 1058 и 707 см<sup>-1</sup>), которые характерны для полиглутаминовой кислоты (PGlu).

Для количественной оценки твердофазного термического превращения Glu из кривых рис. 4 были рассчитаны эффективные константы скорости реакции первого порядка (*k*). По значениям констант скорости превращения

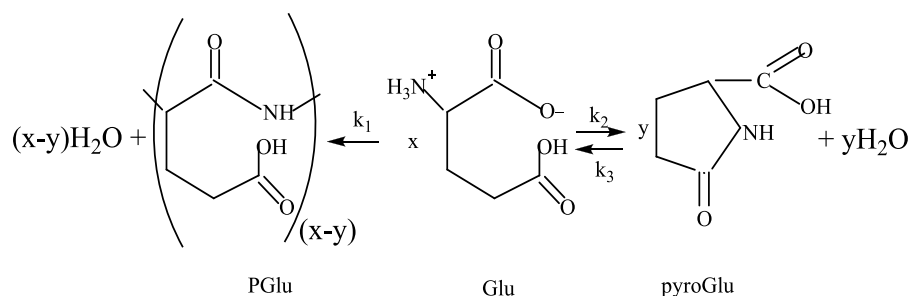
Glu были вычислены энергетические параметры процесса термической поликонденсации Glu в PGlu (табл. 2).

Таблица 2 Кинетические параметры термического превращения Glu

T, °C	$k \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{230} \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	E, кДж/моль	$\ln k_0$
170	41	6109	148±7	37.2±6
175	87			
180	128			
185	233			
190	315			
210	866			
220	1150			

Энергия активации процесса оказалась равной 148 кДж/моль. Эта величина ниже энергии активации поликонденсации Asp в PAsp. Поэтому Glu демонстрирует более высокую реакционную способность по сравнению с Asp в поликонденсации.

На основании анализа продуктов реакции и кинетических измерений предложен механизм термического превращения Glu при 170-210 °C:



Общее количество воды (x), выделившейся в газовую фазу, соответствует глубине превращения исходной Glu. Квазиравновесное состояние, определяемое константами скорости  $k_2$  и  $k_3$ , по мере развития процесса сдвигается в сторону Glu в результате необратимой реакции поликонденсации ( $k_1$ ). Выделившаяся при поликонденсации вода в свою очередь способствует смещению равновесия:  $\text{Glu} \rightleftharpoons \text{ruгоGlu} + \text{H}_2\text{O}$  влево до тех пор, пока последнее количество ruгоGlu не превратится в Glu.

Количественное превращение Glu в PGlu означает, что в соответствии с приведенным выше механизмом смесь ruгоGlu и  $\text{H}_2\text{O}$  должна при нагревании в закрытой вакуумированной системе привести к количественному превращению ruгоGlu в PGlu. Действительно, расплав ruгоGlu в контакте с парами воды при 175 °C реагирует с образованием кристаллического PGlu.

ИК-спектр полученных кристаллов соответствует характеристическим частотам валентных колебаний P<sub>2</sub>Glu. Температура плавления олигомера 204 °С (литер. данные T<sub>пл</sub>= 206 °С). Разложение его начинается при 209 °С (литер. данные T<sub>разл.</sub>= 209,8 °С). Показано, что масс-спектр P<sub>2</sub>Glu существенно отличается от масс-спектров Glu и ругоGlu. Отсутствие в спектрах масс, соответствующих осколкам ругоGlu, и присутствие в масс-спектрах ионов, относящихся к олигомерным фрагментам, образовавшимся при поликонденсации Glu, свидетельствует в пользу представленной выше схемы термического превращения Glu.

## 2. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ АМИДОВ МОНОАМИНДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Аспарагин (L-Asn) и глутамин (L-Gln) относятся к амидам аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) аминокислот. Изучение их термического превращения преследовало цель сравнения их реакционной способности с реакционной способностью Asp и Glu, а также определения возможности получения полимеров, схожих по составу с полимерами Asp и Glu.

Изучена скорость термического превращения Asn при 195-230 °С и Gln при 160-220 °С. На рис. 5 и 6 приведены соответствующие кинетические кривые.

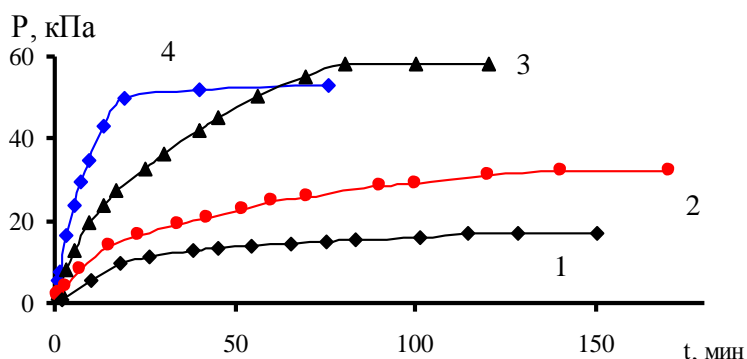


Рис. 5. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Asn от времени в интервале температур: 1 – 205, 2 – 213, 3 – 220, 4 – 230 °С

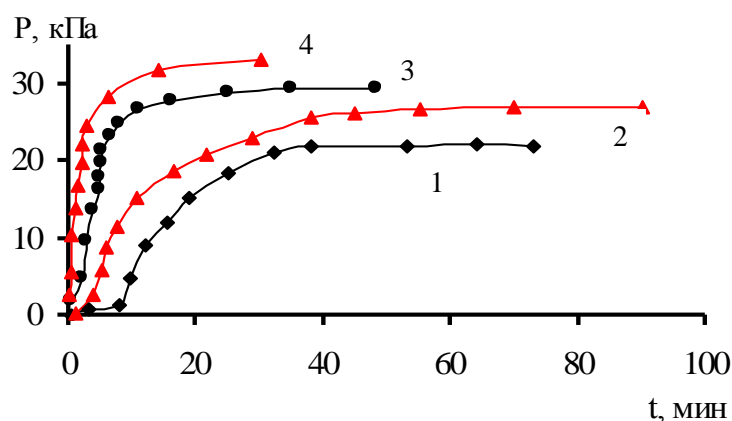
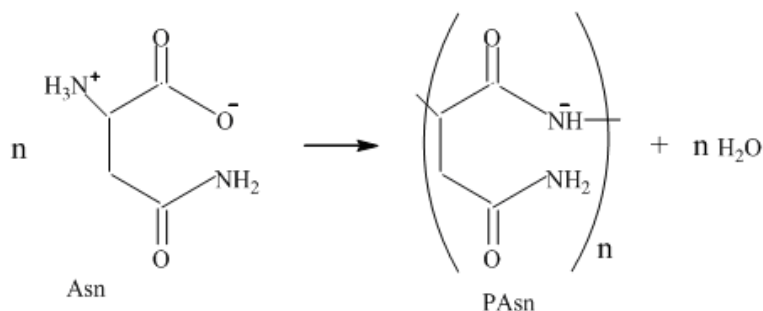
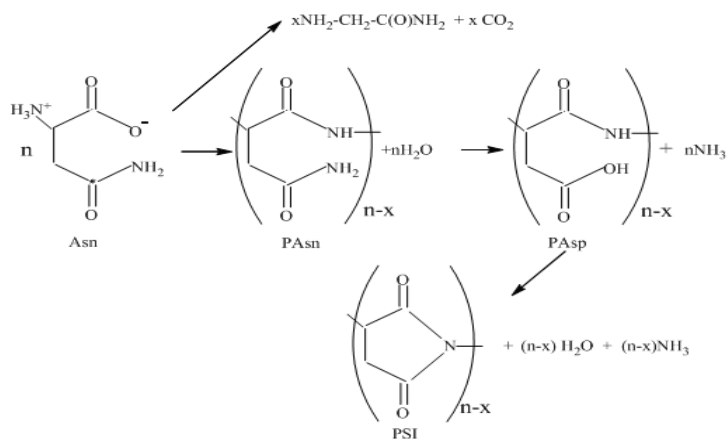


Рис. 6. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Gln от времени в интервале температур: 1 – 170, 2 – 179, 3 – 190, 4 – 220 °С

Масс-спектрометрический анализ продуктов термического превращения Asn показал, что в газовой фазе образуются вода, аммиак и углекислый газ. Выделение воды свидетельствует в пользу поликонденсации Asn в полиаспарагин (PAsn).



Количество выделившейся воды зависит от длины цепи (n) олигомера PAsn. Биуретовая реакция дает положительный результат, подтверждающий образование олигопептида. Присутствие в газовой фазе CO<sub>2</sub>, вероятно, связано с реакцией декарбоксилирования исходной Asn. Гидролиз PAsn приводит к образованию PAsp. Твёрдый продукт, полученный при термическом превращении Asn при 230 °С, не дает биуретовой реакции. Предположительно, что это PSI, который получается дегидратацией PAsp, промежуточно образованной согласно схеме.



Для Gln при 170 °С после окончания реакции газовая фаза содержала воду, углекислый газ и аммиак. Масс-спектрометрический анализ твердого продукта термического превращения Gln подтвердил образование олигомерных продуктов низкомолекулярного состава.

В табл. 3 приведены кинетические и активационные параметры термического превращения Asn и Gln. Сравнивая величины *k* для Asn и Gln, можно констатировать, что также как и в случае Asp и Glu наличие дополнительной метиленовой группы у Gln приводит к ускорению процесса термического превращения аминокислоты примерно в 15 раз (сравните величины *k* при 230 °С) за счет понижения энергии активации со 124 до 104 кДж/моль при переходе от Asn к Gln.

Таблица 3 Кинетические и активационные параметры термического превращения Asn и Gln

T <sup>0</sup> C	Asn				T <sup>0</sup> C	Gln			
	$k \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{230} \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	E, кДж/ моль	lnk <sub>0</sub>		$k \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{230} \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	E, кДж/ моль	lnk <sub>0</sub>
195	12	135	124±6	27,3±9	161	32	1880	104±7	25,5±8
205	19				170	69			
213	23				179	79			
220	33				190	347			
230	135				220	866			

Таким образом, при температурах 160 – 220 °С, основным процессом термического превращения Asn и Gln является гетеролитическая поликонденсация с выделением воды и аммиака, что показано в вышеприведенных схемах реакции. Параллельно идет процесс декарбоксилирования, доля которого увеличивается с повышением температуры опыта.

### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ СЕРУСОДУРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ

Кристаллы изучаемых аминокислот плавятся с разложением: D,L-метионин (D,L-Met) при 281 °С, L-цистеин (L-Cys) при 240 °С, L-цистин (L-Cys<sub>2</sub>) при 260 °С. Если проводить нагревание образцов в замкнутом вакуумированном объеме со скоростью 3 °С/мин, то газовыделение, указывающее на термическое превращение аминокислот, начинается уже при температурах 190 – 230 °С, то есть существенно ниже их температур плавления. На рис. 7 приведены кинетические кривые превращения D,L-Met, L-Cys и L-Cys<sub>2</sub> в координатах *p* – *t*, снятые при близких температурах.

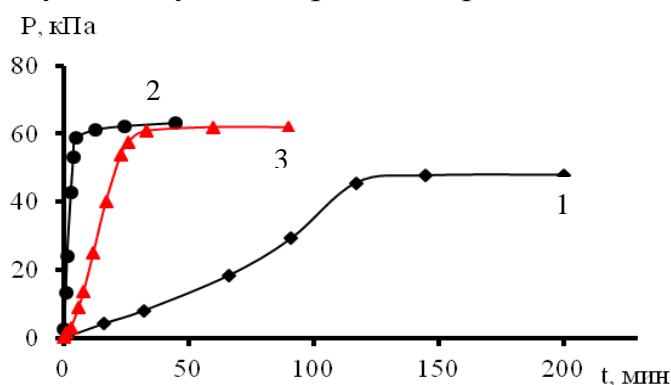


Рис. 7. Зависимость давления газообразных продуктов превращения: 1 – Met (226 °С), 2 – Cys (225 °С), 3 – Cys<sub>2</sub> (224 °С) от времени

Термическое превращение серусодержащих аминокислот подчиняется уравнению реакции первого порядка до глубины превращения 30–50%.

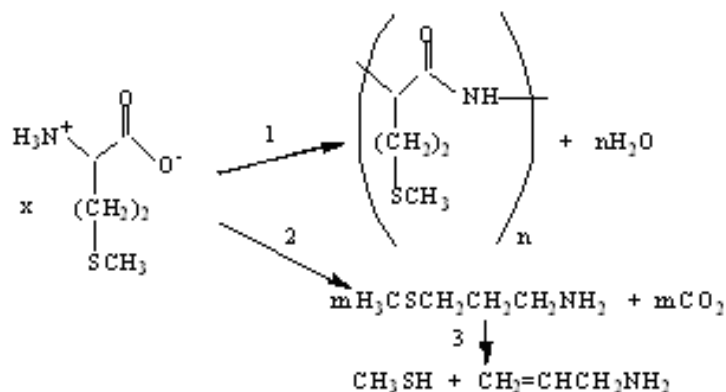
Температурная зависимость констант скорости реакции подчиняется уравнению Аррениуса  $k = k_0 \cdot e^{-E/R}$ . Кинетические и активационные параметры разложения серосодержащих аминокислот приведены в табл. 4

Таблица 4 Кинетические и активационные параметры превращения серосодержащих аминокислот

Аминокислота	$T, ^\circ\text{C}$	$k \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	$k_{230} \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	$E, \text{кДж/моль}$	$\ln k_0$
D,L-Met	216	4	15,1	195±10	42,7±8
	221	6			
	226	7			
	231	16			
	238	22			
L-Cys	194	25	1567	193±15	46,6±5
	198	53			
	201	85			
	206	190			
	225	728			
Cys <sub>2</sub>	199	13	223	184±7	42,5±6
	204	17			
	210	27			
	218	75			
	224	117			

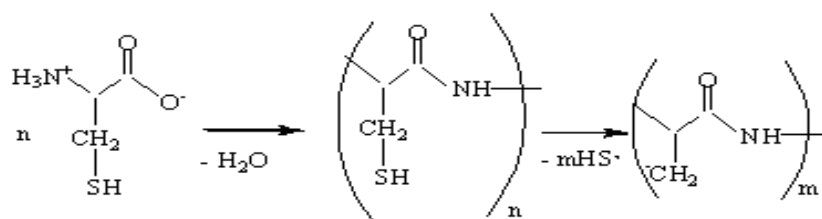
Константы скорости превращения серосодержащих аминокислот растут в ряду Met < Cys<sub>2</sub> < Cys, (табл. 4) и отличаются в указанной последовательности на порядок. Кажущиеся энергии активации ( $E$ ) лежат в пределах 184 – 195 кДж/моль,  $\lg k_0$  в интервале 42 – 47.

При термическом превращении Met образуется полимерная масса вещества, дающая положительную биуретовую реакцию на амидную группу в олигопептиде. В газовой фазе масс-спектрометрическим методом найдены CO<sub>2</sub>, метилтиол CH<sub>3</sub>SH, а также следы H<sub>2</sub>S и (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>; по остаточному давлению при комнатной температуре определено, что 50% газовой фазы составляет вода – продукт поликонденсации. Хромато-масс-спектрометрическим методом в конденсированной фазе обнаружены: 3-метилтио-1-пропиламин, метилтиол и 1-аминопропен-2. Вероятная схема термического превращения Met может быть представлена следующими параллельно и последовательно протекающими реакциями.



Вода, метилтиол и  $\text{CO}_2$  переходят из кристалла в газовую фазу и определяют в ней состав продуктов разложения Met. В отличие от гетеролитической поликонденсации 1 появление  $\text{CO}_2$  и метилтиола является следствием гомолитического расщепления связей C–S и C–O в кристалле (реакции 2 и 3).

Термическое превращение Cys и  $\text{Cys}_2$ , также как и Met, сопровождается образованием олигомеров (положительная биуретовая реакция). Газовая фаза состоит наполовину из воды, а также  $\text{H}_2\text{S}$  и  $\text{CO}_2$  как для Cys, так и для  $\text{Cys}_2$ . Расчеты показали, что на моль Cys образуется примерно 2 моль летучих веществ ( $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{H}_2\text{S}$ ). Количества  $\text{CO}_2$  в газовой фазе незначительны. В кристаллической структуре Cys происходит гетеролитический процесс поликонденсации и последующий гомолитический разрыв связи C–S в образующемся олигомере, приводящий к образованию  $\text{H}_2\text{S}$ .



Механизм подтверждается образованием значительного количества  $\text{H}_2\text{S}$  в газовой фазе. Связь C–N в процессе термораспада этих аминокислот не подвергается разрыву. Об этом свидетельствует отсутствие в продуктах  $\text{NH}_3$ .

Из литературных источников известна окислительно-восстановительная реакция взаимопревращения  $\text{L-Cys} \rightleftharpoons \text{L-Cys}_2$ . Мы находим для этих аминокислот практически одинаковые продукты терморазложения, что свидетельствует о возможности протекания этой равновесной реакции в условиях нашего эксперимента.

Таким образом, формально скорость брутто-процесса превращения Met, Cys и  $\text{Cys}_2$  при небольших глубинах разложения исходных соединений (30-50%) можно рассматривать как «кооперативную» химическую реакцию поликонденсации первого порядка, протекающую в твердой фазе. Несмотря на близкие значения кажущихся энергий активации терморазложения Met, Cys и  $\text{Cys}_2$ , соответственно равных 195, 193 и 184 кДж/моль, эффективные константы реакции при одной и той же температуре отличаются одна от другой примерно на порядок в ряду  $\text{Met} < \text{Cys}_2 < \text{Cys}$ . При температурах выше  $200^\circ\text{C}$  их превращение сопровождается образованием серосодержащих газообразных продуктов.



#### 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО ТЕРМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ С ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМ РАДИКАЛОМ

Исследование термической стабильности аминокислот с гетероциклическим заместителем [триптофан (Trp), гистидин (His) и пролин (Pro)], их возможное участие в процессах образования полимеров явилось причиной изучения нами их термического превращения.

Характер изменения давления ( $p$ ) летучих продуктов разложения от температуры ( $T$ ) позволил определить интервал температур, удобный для количественного измерения скорости превращения этих аминокислот. Он составил 230 – 280 °С для L-Trp и L-His и 200 – 230 °С для L-Pro.

На рис. 8 и 9 приведены кинетические кривые разложения гетероциклических аминокислот Trp и His, снятые в координатах давление ( $p$ ) газообразных продуктов – время реакции ( $t$ ).

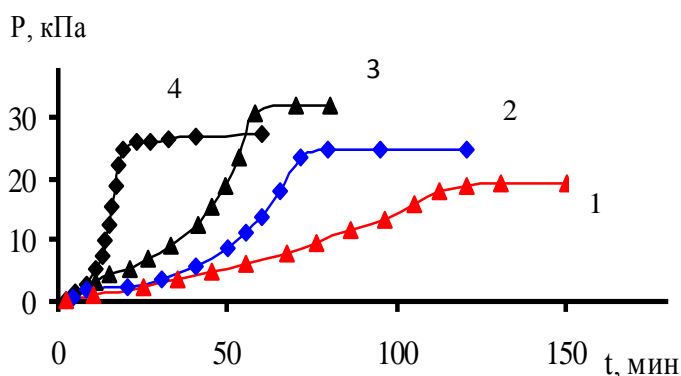


Рис. 8. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Trp от времени реакции в интервале температур: 1 – 240, 2 – 251, 3 – 255, 4 – 270 °С

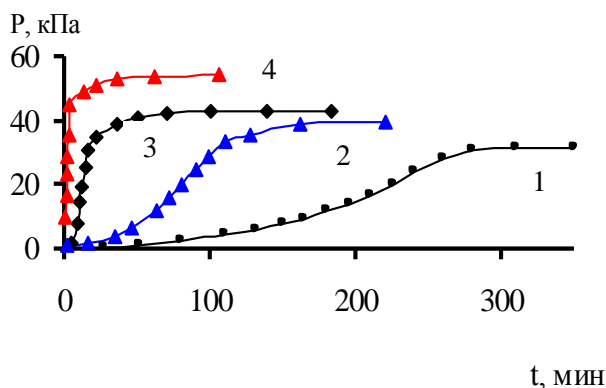


Рис. 9. Зависимость давления газообразных продуктов превращения His от времени реакции в интервале температур: 1 – 240, 2 – 251, 3 – 260, 4 – 270 °С

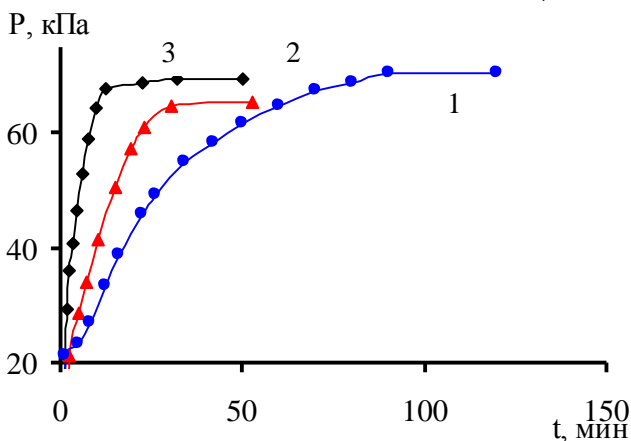


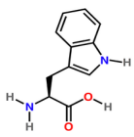
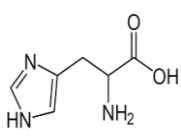
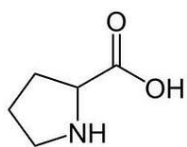
Рис. 10. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Pro от времени реакции в интервале температур: 1 – 210, 2 – 220, 3 – 230 °С

Кривые превращения Pro носят иной характер (рис. 10). Эта аминокислота начинает превращаться при более низких температурах по сравнению с Trp и His. Процесс сопровождается образованием циклического димера и воды. Количество выделившейся воды соответствует стехиометрии превращения Pro в димер. Скорость образования циклического димерного продукта настолько высока, что сразу же в газовую фазу выделяется стехиометрическое количество воды.

Параметры термического превращения аминокислот с гетероциклическим заместителем приведены в табл. 5. Как следует из этой таблицы, энергия активации термического превращения растет при переходе от Trp к Pro, но скорость процесса при этом увеличивается. Скорость превращения Pro выше этого параметра для His почти на два порядка, скорости превращения His и Trp различаются в 1,5 – 2 раза.

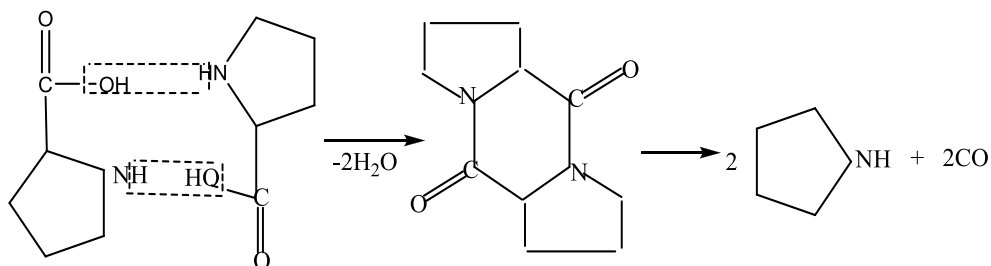
Гетероциклический фрагмент Pro тесно соприкасается со своей кислотной группой, и в результате возникают возможности реализации процессов циклизации и расщепления близко расположенных активных групп. В случае Pro проявляет себя энтропийный фактор, и это обеспечивает Pro более высокие скорости термического превращения в ряду изученных аминокислот.

Таблица 5 Параметры термического превращения аминокислот с гетероциклическим заместителем

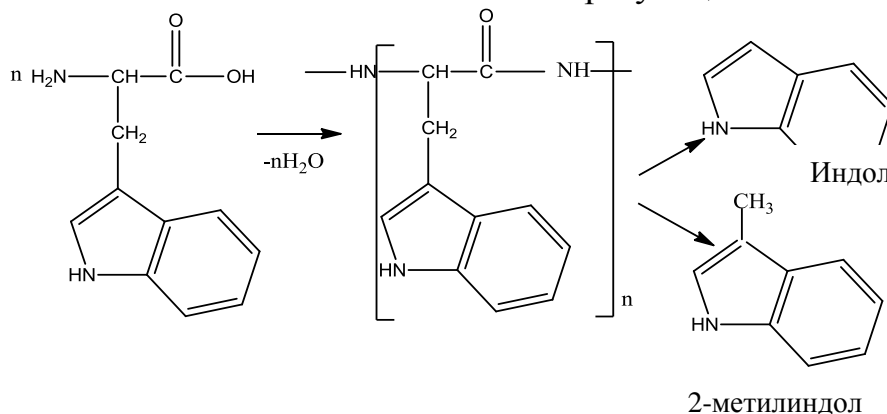
Аминокислота	T, °C	$k \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{230} \cdot 10^3$ , мин <sup>-1</sup>	$E_a$ , кДж/моль	$\ln k_0$
Триптофан 	240 251 255 260 270	13 20 29 47 124	4,2	179±10	37,3±7
Гистидин 	230 240 250 260 280	9 17 44 107 23	8,7	190±6	40,7±8
Пролин 	205 207 210 220 230	28 110 126 204 770	770	212±11	50,3±10

Масс-спектр жидких продуктов термического превращения Pro, полученных в течение 4 часов при 207 °C, подтвердил это. Масса 194 отвечает циклическому димеру, образованному путем отщепления двух молекул воды от двух определенным образом ориентированных молекул Pro. Присутствуют также продукты расщепления образующегося димера, такие

как пирролидин и CO, которые наблюдаются в масс-спектре исходного Pro. Ниже приведен вероятный механизм твердофазного термического превращения Pro.



По структуре Trp близок His, только его гетероциклический фрагмент более объемный, чем у His. В His и Trp гетероциклическая группа отделена от основных участников процесса поликонденсации  $\text{CH}_2$  группой. Это нашло свое отражение в продуктах реакции. Масс-спектр исходного Trp и соответствующие спектры продуктов термического превращения Trp, полученных при  $240^\circ\text{C}$  в течение 5 часов, показали, что в продуктах присутствуют осколки более высокомолекулярных продуктов поликонденсации Trp, а также индол (молекулярная масса 117) и 2-метилиндол (молекулярная масса 131). Последние являются продуктами расщепления связей C – C в заместителях R образующихся олигомеров.



Процесс термического превращения His аналогичен превращению Trp, так как строение His повторяет структуру Trp, но вместо индольного гетероцикла в His присутствует имидазольный.

В заключение этого раздела следует расположить исследованные аминокислоты с гетероциклическим заместителем в порядке увеличения их способности к термопревращению: Trp < His < Pro.

## 5. ТВЕРДОФАЗНОЕ ТЕРМИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ ДИАМИНОКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

В качестве объектов исследования выбраны аргинин (L-Arg) и лизин (L-Lys). Определенный нами температурный интервал превращения этих

аминокислот 190 – 240 °С. На рис. 11, 12 приведены кинетические кривые твердофазного термического превращения Arg и Lys, снятые в координатах давление ( $p$ ) – время реакции ( $t$ ).

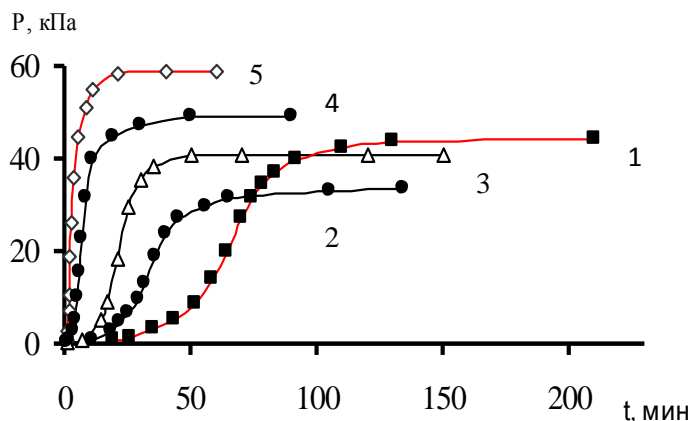


Рис. 11. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Arg от времени реакции в интервале температур: 1 – 202, 2 – 206, 3 – 210, 4 – 225, 5 – 242 °С

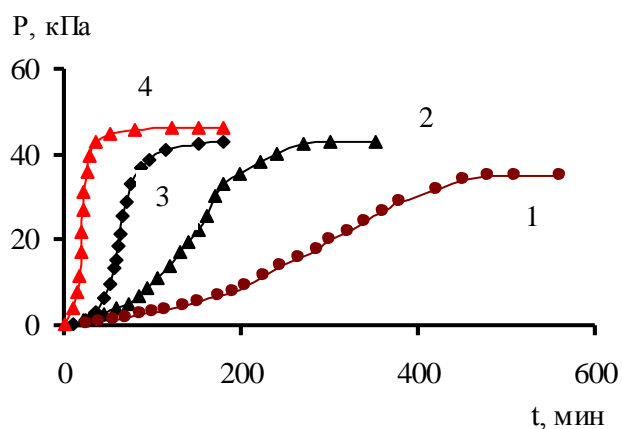
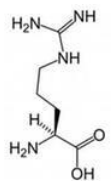
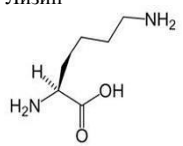


Рис. 12. Зависимость давления газообразных продуктов превращения Lys от времени реакции в интервале температур: 1 – 190, 2 – 195, 3 – 200, 4 – 210 °С

В табл. 6 приведены кинетические и активационные параметры превращения обеих аминокислот.

Таблица 6 Кинетические и активационные параметры термического превращения Arg и Lys

Аминокислота	T, °C	$k \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	$k_{230} \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	$E_a,$ кДж/моль	$\ln k_0$
Аргинин 	202	19,5	458	112±10	26±12
	206	52			
	210	96			
	225	165			
	242	610			
Лизин 	190	3	376	209±16	49±8
	195	9			
	200	11			
	210	55			
	242	920			

Хромато-масс-спектрометрический анализ продуктов термического превращения Arg, полученных при  $T = 210 - 250$  °С, показал присутствие

воды, углекислого газа и аммиака. Вода образуется в результате поликонденсации, которая реализуется при взаимодействии  $\text{COO}^-$  и  $\text{NH}_3^+$  – соседних цвиттер – ионов Arg. В масс-спектрах наблюдаются сигналы пиков, относящихся к полиаргину низкомолекулярного состава.

Хромато-масс-спектрометрический анализ продуктов термического превращения Lys, полученных при  $T = 210^\circ\text{C}$ , показал присутствие воды и аммиака в газовой фазе. Для твердых продуктов превращения Lys наличие низкомолекулярных олигомеров подтверждается ИК-спектроскопическими и масс-спектрометрическими измерениями. Рассчитанные для данных частиц абсолютные молекулярные массы хорошо соотносятся с наблюдаемой серией сигналов в полученном масс-спектре образца методом времяпролетной MALDI MS: 242, 385, 513, 641 ДА. Результаты масс-спектрометрического анализа конечного продукта реакции свидетельствуют об образовании низкомолекулярного полизина при  $210 - 230^\circ\text{C}$ .

Сравнение реакционной способности аминокислот  $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$  показывает, что объемные гетероциклы создают, вероятно, значительные стерические препятствия взаимодействию цвиттер-ионов, расположенных в узлах кристаллической решетки. В силу этого обстоятельства триптофан и гистидин проявляют высокую термическую стабильность по сравнению с другими аминокислотами изученного ряда:

$\text{Trp} < \text{His} < \text{Met} < \text{Asn} < \text{Cys}_2 < \text{Asp} < \text{Lys} < \text{Arg} < \text{Pro} < \text{Cys} < \text{Gln} < \text{Glu}$   
Наименьшую термическую стабильность (высокую скорость реакции) в приведенном ряду проявляет глутаминовая кислота. Амиды Asn и Gln проявляют более высокую термическую стабильность по сравнению с соответствующими аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) кислотами, что свидетельствует о высоком электронодонорном эффекте  $\text{H}_2\text{NC(O)CH}_2-$  и  $\text{H}_2\text{NC(O)CH}_2\text{CH}_2-$  групп по сравнению с электроноакцепторными свойствами  $\text{HOOC(O)CH}_2-$  и  $\text{HOOC(O)CH}_2\text{CH}_2-$  групп.

Для всех аминокислот характерны реакции поликонденсации. В лимитирующей стадии процесса идёт образование олигомеров с выделением воды, по росту давления которой мы определяли константы скорости реакции. На основании наблюдаемого кинетического компенсационного эффекта можно утверждать, что в лимитирующей стадии процесса термического превращения аминокислот реализуются коллективные взаимодействия цвиттер-ионов в узлах кристаллической решетки аминокислоты. Коллективными являются элементарные акты взаимодействия положительно и отрицательно заряженных концов диполей цвиттер-ионов, сопровождающиеся формированием звеньев олигомерной цепи и выделением воды. Вклад в брутто-процесс вносят гомолитические радикальные реакции декарбоксилирования и дезаминирования, которые протекают с более высокой скоростью. Поэтому мы определяли эффективные константы скорости твердофазного термического превращения аминокислот.

Обнаружение компенсационного эффекта в случае исследованных нами аминокислот, различающихся лишь структурой заместителя R в составе цвиттер-иона  ${}^+\text{H}_3\text{NCH(R)COO}^-$ , указывает на однотипный механизм процесса, лимитирующей стадией которого является гетеролитическая поликонденсация.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые определены константы скорости и активационные параметры твердофазного термического превращения *L*-α-аминокислот  $\text{NH}_2\text{CH(R)COOH}$  с карбоксильными, серу- и азотсодержащими радикалами R в интервале температур 160 – 280 °С. Методами ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии доказана поликонденсация аминокислот до низкомолекулярных олигомеров.

2. Установлено два температурных интервала превращения аспарагиновой кислоты в вакуумированной системе постоянного объема. При 190 – 207 °С реакция завершается образованием полиаспарагиновой кислоты и воды. При 210 – 250 °С лимитирующим является процесс образования полисукцинимида. Полиаспарагиновая кислота может быть синтезирована из аспарагиновой кислоты в одностадийном процессе, минуя стадию получения полисукцинимида.

3. Доказан механизм превращения глутаминовой кислоты в полиглутаминовую при участии равновесной стадии образования пироглутаминовой кислоты.

4. Наличие компенсационного эффекта в твердофазном термическом превращении исследованных аминокислот, различающихся структурой заместителя R в составе цвиттер-иона  ${}^+\text{H}_3\text{NCH(R)COO}^-$ , указывает на однотипный механизм (гетеролитическая поликонденсация) в лимитирующей стадии процесса.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Яблоков В.А., **Васина Я.А.**, Зеляев И.А., Митрофанова С.В. Кинетика термического разложения серусодержащих аминокислот // Журнал общей химии, – 2009 – Т. 79 – №.6. – С. 969 – 973.
2. Яблоков В.А., **Васина Я.А.**, Гришин И.Д. Кинетика твердофазной термической поликонденсации аспарагиновой кислоты в вакуумированной системе // Журнал общей химии, – 2013 – Т. 83 – №11. – С. 1850 – 1854.
3. Яблоков В.А., **Васина Я.А.**, Зеляев И.А., Митрофанова С.В. Исследование реакционной способности метионина и его комплекса с хлоридом ртути // Приволжский науч. жур. Изд. Н. Новгород: ННГАСУ, – 2008 – №1 – С.110 – 114.
4. Яблоков В.А., **Васина Я.А.** Сравнительная кинетика термического разложения глутатиона, цистеина и глицина // Приволжский науч. жур. Изд. Н. Новгород: ННГАСУ, –2012 – №4 – С.169 – 171.
5. **Васина Я.А.** Исследование реакционной способности метионина и его комплекса с хлоридом ртути. Труды заочной научно-практич. конф. «Естественные науки: актуальные вопросы и тенденции развития». Новосибирск. 30 ноября 2011г. С.107.
6. **Васина Я.А.** Кинетика термораспада аминокислот. Труды IX Междунар. дистанционной научно-практич. конф. «Современные проблемы гуманитарных и естественных наук», Москва, 30 декабря 2011г. С.33.
7. **Васина Я.А.** Кинетика термораспада аминокислот. Труды V Междунар. дистанционной научно-практич. конф. «Современное состояние естественных и технических наук», Москва, 20 января 2012 г. С.34.
8. **Васина Я.А.**, Яблоков В. А. Сравнительная кинетика термического разложения глутатиона, цистеина и глицина. Материалы XIII Международной научно-практической конференции «Инновации в науке». 17.10.2012. Новосибирск. Россия. Часть 1. С. 34.
9. **Васина Я.А.** Кинетика термораспада некоторых природных соединений. Труды II Всероссийск. (с междун. участием) научн. конф. «Успехи синтеза и комплексообразования», Москва, 23-27 апреля 2012 г. С. 126.
10. Яблоков В. А., **Васина Я.А.**, Кинетика твердофазной термической поликонденсации аспарагиновой кислоты в вакуумированной системе. Материалы XI Международной конференции «Физикохимия олигомеров». 09-14.09.2013. Ярославль. Россия. Часть 2. С. 108.

Подписано в печати \_\_\_\_\_ Формат 60x90/16 Бумага газетная. Печать трафаретная.

Объем 1 печ. л. Тираж 100 экз. Заказ №

---

Отпечатано в полиграфическом центре ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет», 603950, Н.Новгород, Ильинская, 65.