

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ
КОНСТАНТ УСТОЙЧИВОСТИ КОМПЛЕКСОВ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ(II)
С ГЛИЦИНОМ, L-МЕТИОНИНОМ И L-ТРИПТОФАНОМ
С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛИНЕЙНОЙ РЕГРЕССИИ**

И. А. Томашевский*, О. А. Голованова

УДК 544.03

Омский государственный университет им. Ф. М. Достоевского,
644077, Омск, Россия; e-mail: ivan_tomashevsky@mail.ru, golovanoa2000@mail.ru

(Поступила 23 апреля 2020)

Предложен точный метод определения общих констант устойчивости ионов кальция(II) с глицином, L-метионином и L-триптофаном в водном растворе при 298.15 К посредством регистрации спектров смесей кальция(II) и аминокислот различных концентраций в диапазоне $\lambda = 190\text{--}370$ нм с их дальнейшей обработкой методом множественной линейной регрессии. Установлены различия в полученных константах устойчивости комплексов аминокислот с кальцием(II) и выявлены факторы, влияющие на их устойчивость. Результаты расширили базу данных о взаимодействии кальция(II) с аминокислотами. Полученные закономерности могут быть использованы при исследовании различных процессов биоминералообразования в организме человека, а также при создании медицинских препаратов, направленных на точечное воздействие.

Ключевые слова: спектральный анализ в УФ-области, метод множественной линейной регрессии, комплекс, ионы кальция(II), аминокислота, константа устойчивости.

An accurate method was proposed for determining the general stability constants of calcium(II) ions with glycine, L-methionine, and L-tryptophan in an aqueous solution at 298.15 K by recording the spectra of mixtures of calcium(II) and amino acids of various concentrations in the range $\lambda = 190\text{--}370$ nm with their further processing by multiple linear regression. Differences in the obtained stability constants of complexes of amino acids with calcium(II) were established, and factors influencing their stability were identified. The results expanded the database on the interaction of calcium(II) with amino acids. The obtained results can be used in studies of various processes of biomineral formation in human body, as well as in the development of targeted drugs.

Keywords: UV spectral analysis, multiple linear regression method, complex, calcium(II) ions, amino acid, stability constant.

Введение. Аминокислоты выполняют ряд важнейших функций в человеческом организме. Основной является синтез белков: между $-\text{COOH}$ -группой одной α -аминокислоты и $-\text{NH}_2$ -группой другой может пойти реакция конденсации с образованием дипептида и молекулы H_2O . В образовавшемся дипептиде остатки аминокислот соединены амидной связью, которая получила название пептидной. В дополнение к белковому синтезу аминокислоты в живых организмах выполняют ряд других биологических функций. Так, глицин является нейромедиатором при нервной передаче через химические синапсы, триптофан — аминокислотой, необходимой для синтеза в организме никотиновой кислоты (PP), гемоглобина, сывороточных белков и т. д. [1, 2].

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION THE OVERALL STABILITY CONSTANTS
OF COMPLEXES OF CALCIUM(II) IONS WITH GLYCINE, L-METHIONINE, AND L-TRYP
TOPHAN USING THE MULTIPLE LINEAR REGRESSION METHOD**

I. A. Tomashevskiy*, O. A. Golovanova (F. M. Dostoevsky Omsk State University, Omsk, 644077, Russia; e-mail: ivan_tomashevsky@mail.ru, golovanoa2000@mail.ru)

* Автор, с которым следует вести переписку.

При взаимодействии с ионами металлов аминокислоты могут образовывать комплексы, устойчивостью которых определяется скорость обменных процессов. Образование таких комплексов и их устойчивость играют в организме человека как отрицательную, так и положительную роль. В отличие от комплексообразования ионов тяжелых металлов с аминокислотами, которое подробно изучено и применяется в медицине [3—9], комплексообразование с ионами кальция(II) исследовано недостаточно подробно, например, изучались комплексы кальция(II) с одной аминокислотой [10, 11]. Малое количество системных исследований связано с тем, что ионы кальция, как и металлов группы ПА, являются относительно слабыми комплексообразователями, а аминокислоты — стерически объемными лигандами, и их координирование по ионам кальция(II) может быть затруднено [12]. Для проведения детального и комплексного исследования по установлению характеристик комплексообразования ионов кальция(II) с аминокислотами необходима разработка алгоритма, который будет являться достаточно чувствительным, точным и селективным для данных объектов.

В настоящей работе разработан общий алгоритм определения констант устойчивости комплексов ионов кальция(II) с аминокислотами, основанный на регистрации УФ-спектров вариативных смесей, которые обрабатывались с помощью хемометрического метода множественной линейной регрессии (МЛР). Приведен алгоритм нахождения термодинамических констант устойчивости комплексных соединений ионов кальция(II) с глицином, L-метионином и L-триптофаном в водном растворе при $T = 298.15$ К и объяснены различия в константах.

Эксперимент. При приготовлении растворов использованы кристаллические формы аминокислот фирмы “Омскреактив” квалификации х.ч. Препараты хранили в эксикаторе над оксидом фосфора (V). Раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ квалификации х.ч. ($C = 0.1000$ моль/л) готовили путем растворения кристаллического $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в бидистилляте. Концентрацию устанавливали хемометрическим методом [13]. Концентрации компонентов в водных смесях выбраны исходя из достижения необходимого (отличного от фонового в четыре или более раз) уровня оптической плотности соответствующих спектров. Концентрации компонентов рабочих растворов представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Концентрации компонентов рабочих смесей

Смесь	$C_{\text{Ca}(\text{NO}_3)_2}$, МОЛЬ/Л	$C_{\text{аминокислоты}}$, МОЛЬ/Л
1	0.0100	0.00001
2	0.0500	0.0005
3	0.0010	0.0001
4	0.0050	0.0050
5	0.0001	0.0010
6	0.0005	0.0500
7	0.00001	0.0100

Спектры зарегистрированы на спектрофотометре ПЭ-5400УФ в диапазоне $\lambda = 190—370$ нм (холостой раствор — бидистиллированная вода) в кювете с толщиной светопоглощающего слоя $l = 1.0$ см и обработаны с помощью хемометрического метода МЛР. Ранее этот метод использовался для исследования более изученных с точки зрения природы объектов [14—18].

В случае применения метода МЛР содержания компонентов в модельных смесях вычисляют, решая сильно переопределенную систему линейных уравнений вида

$$A_x = K^* C_x, \quad (1)$$

где A_x — оптические плотности анализируемой смеси при n длинах волн; K^* — матрица коэффициентов светопоглощения размером $n \times p$ (p — количество определяемых компонентов, $n \gg p$); C_x — концентрации компонентов анализируемой смеси. В основе вычислений лежит метод наименьших квадратов (МНК). Решение системы (1) в рамках МНК находят, подставив в формулу матрицу коэффициентов участников реакций, которая вычисляется из рассчитанных равновесных концентраций комплексообразователя, лиганда и комплекса ($[C]$) и оптических плотностей растворов различных концентраций:

$$K^* = A[C]^{-1}. \quad (2)$$

По найденным концентрациям всех участников комплексообразования рассчитываются общие константы устойчивости [19]. При решении этой задачи метод МЛР предполагает пересчет всех возможных частиц на частицы одного типа. Поскольку аминокислоты являются стерически объемными лигандами и их координирование с ионами кальция(II) при подходе сразу нескольких молекул затруднено, при расчете и обсуждении результатов учитывается состав комплексов 1:1.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1, *а* приведены спектры, зарегистрированные для соответствующих рабочих растворов (1—7) смесей ионов кальция(II) и глицина. Поглощение указано только для тех длин волн (по оси абсцисс), оптическая плотность (по оси ординат) на которых значительно отличается от нуля. Для того чтобы установить раздельное влияние ионов кальция и аминокислоты (на примере глицина) на оптическую плотность, приготовлены дополнительные рабочие растворы (8—11) (табл. 2), спектры которых представлены на рис. 1, *б*. Как видно, одновременное присутствие в растворе ионов кальция и аминокислоты вносит вклад в изменение оптической плотности приготовленных смесей. Этот вклад может быть небольшим, но с учетом того, что в растворе происходит образование комплекса кальция(II) и аминокислоты, даже небольшой вклад каждого участника реакции может влиять на суммарную оптическую плотность на отдельных длинах волн с учетом неаддитивности смесей, что косвенно указывает на возможность определения констант устойчивости методом МЛР, поскольку он способен оперировать данными независимо от уровня выраженности сигнала.

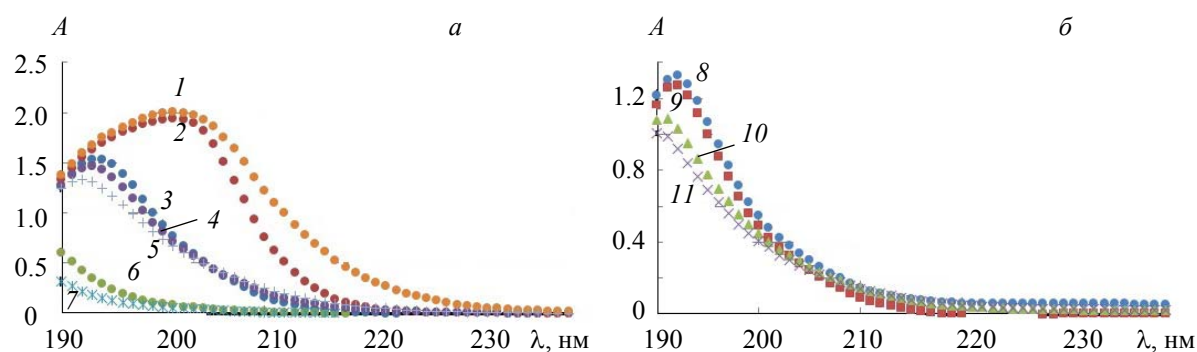


Рис. 1. Спектры поглощения рабочих (*а*) и дополнительных рабочих растворов (*б*) смесей ионов кальция(II) с глицином

Т а б л и ц а 2. Концентрации ионов кальция(II) и глицина для приготовления дополнительных рабочих смесей

Смесь	C_{CaCl_2} , моль/л	$C_{глицин}$, моль/л
8	0.0100	0.0010
9	0.0100	0.0001
10	0.0010	0.0100
11	0.0001	0.0100

Для применения метода МЛР необходимо рассчитать предварительные коэффициенты молярного светопоглощения всех участников реакции. Для этого, зная примерные значения [10, 20, 21] общих констант устойчивости исследуемых комплексов и общие концентрации каждого компонента, с помощью специального программного обеспечения (DefMix, KOEFF_COUNTER, CONCENTR_COUNTER) методом МЛР рассчитываем предварительные равновесные концентрации каждого участника комплексообразования и соответствующие оптические плотности, а также коэффициенты молярного светопоглощения ε (л · моль⁻¹ · см⁻¹) для всех участников реакции. На рис. 2 приведены молярные коэффициенты светопоглощения ε для участников реакции комплексообразования между кальцием(II) и глицином.

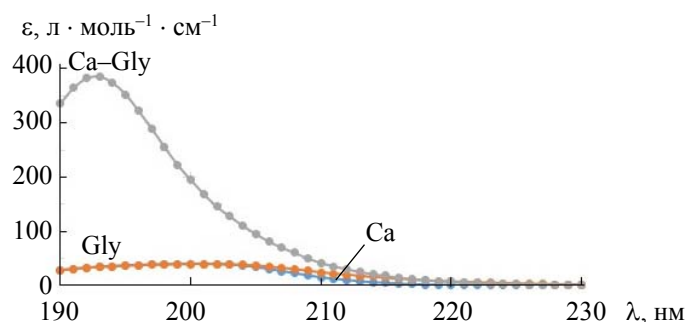


Рис. 2. Молярные коэффициенты светопоглощения ϵ для участников реакции комплексообразования между ионами кальция(II) и глицином

Основным критерием возможности использования коэффициентов при дальнейших расчетах является корректность их значений. Например, если при $\lg K = 4$ молярный коэффициент светопоглощения одного или нескольких участников реакции значительно (статистически отличается от погрешности определения этим методом) ниже нуля, то выбранное начальное значение константы для расчета равновесных концентраций некорректно (занижено) и его нужно увеличить. Противоположная ситуация имеет место, если при $\lg K = 4$ коэффициенты одного из участников реакции очень велики и явно не соответствуют природе данных веществ и/или известным справочным значениям. В таком случае выбранное значение константы для расчета равновесных концентраций некорректно завышено и его нужно уменьшить, пересчитав равновесные концентрации при более низкой константе и повторив пересчет в программном обеспечении.

Полученные молярные коэффициенты ϵ участников реакций в заданном диапазоне длин волн значительно отличаются от нуля, причем молярные коэффициенты поглощения ионов кальция(II) и аминокислоты во всех случаях одного порядка, а комплексных соединений различаются и зависят от природы взаимодействия комплексообразователя и лигандов, а также от строения аминокислот.

По установленным коэффициентам молярного поглощения ϵ и фактическим спектрам поглощения смесей рассчитаны истинные равновесные концентрации каждого участника реакции комплексообразования для всех рабочих смесей. На этом этапе программа корректирует константу, поскольку идет перебор значений относительно оптической плотности спектров и молярных коэффициентов всех участников реакции на каждой длине волны исследуемого диапазона. Общую концентрацию комплекса можно определить суммированием найденной истинной равновесной концентрации кальция(II) и истинной равновесной концентрации комплекса, после чего из рассчитанной общей концентрации ионов кальция вычитается известная исходная концентрация этих ионов, полученная разница делится на исходную концентрацию и умножается на 100 %. Полученное значение является относительной ошибкой определения суммарной (равновесная концентрация свободных ионов кальция(II) + равновесная концентрация ионов кальция(II) в составе комплекса) концентрации кальция(II) в растворе. Аналогично рассчитывается ошибка и по аминокислоте.

Таким образом, сводится баланс найденных концентраций и сравнивается с тем, что введено изначально в рабочие растворы. Важно подобрать такую смесь, в которой относительная ошибка определения конечной общей константы минимальная [19]. Чтобы снизить относительную ошибку, необходим оптимальный выбор длин волн, молярные коэффициенты поглощения и оптические плотности на которых используются в расчете истинных равновесных концентраций участников комплексообразования, т. е. не принимать в расчет истинных равновесных концентраций диапазоны длин волн, где либо коэффициенты молярного поглощения выражены недостаточно хорошо, либо дифференциация молярных коэффициентов аминокислоты и комплекса относительно друг друга невелика. Путем подбора интервалов этих длин волн наименьшую относительную ошибку для комплекса в системе Ca^{2+} -Met демонстрирует диапазон 244–260 нм, для системы Ca^{2+} -Gly диапазон 200–210 нм, для Ca^{2+} -Trp 230–300 нм. По этим условиям определены равновесные концентрации всех участников реакции комплексообразования и рассчитаны соответствующие $\lg K$ для данных систем и относительные ошибки определения для каждой из них. Наименьшая ошибка расчета общих констант для всех систем выявлена для рабочих растворов, в которых концентрации комплексообразователя и ли-

ганда соотносятся 1:1, т. е. для смеси № 4. Для вышеуказанных комплексов рассчитана энергия Гиббса комплексообразования:

$$\Delta G_{298}^{\circ} = -RT \ln K_p. \quad (3)$$

В табл. 3 приведены рассчитанные для комплексов $\lg K$, их относительные ошибки определения и энергии Гиббса комплексообразования. Как видно, комплекс Ca^{2+} с метионином гораздо менее устойчивый, чем с триптофаном и глицином. Это связано с тем, что в составе метионин имеет боковой радикал с делокализацией электронной плотности за счет атомов углерода. Метилтиогруппа не дает увеличения устойчивости данного комплекса [22], а боковой радикал не принимает участия в комплексообразовании с Ca^{2+} и создает для него соответствующие стерические препятствия — координация происходит преимущественно по атомам кислорода карбоксильной группы и атому азота аминогруппы. В свою очередь координационное соединение Ca^{2+} с триптофаном устойчивее, чем с метионином, поскольку в структуре триптофана имеется индольная функциональная группировка, которая обладает большей электронной плотностью за счет двойных связей между атомами углерода и азота в ее составе, что способствует дополнительной координации s^2 -орбиталей Ca^{2+} по индольной группировке, помимо атомов кислорода карбоксильной группы и атома азота аминогруппы. Однако индольная группировка относительно объемная и наряду с электронной плотностью способна создавать стерические препятствия при подходе Ca^{2+} . Комплекс Ca^{2+} с глицином наиболее устойчивый — в его составе отсутствуют боковые радикалы и препятствия при подходе комплексообразователя к лиганду. Таким образом, геометрический (структурный) фактор молекул аминокислот при комплексообразовании превалирует над фактором электронной плотности боковых радикалов. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами [12], где общие константы устойчивости установлены с помощью потенциометрического титрования.

Т а б л и ц а 3. Рассчитанные $\lg K$ и их относительные ошибки определения для систем Ca^{2+} –аминокислота

Аминокислота в составе комплекса	$\lg K$	$\varepsilon, \%$	$\Delta G_{298}^{\circ},$ кДж/моль
Met	0.57	1.75	-3.25
Trp	2.47	4.98	-14.07
Gly	3.23	0.20	-18.40

Заключение. Предложен алгоритм определения общих констант устойчивости комплексов ионов кальция(II) с аминокислотами, основанный на регистрации УФ-спектров и использовании хемометрического метода множественной линейной регрессии. Рассчитаны константы устойчивости для исследуемых систем Ca^{2+} –аминокислота. Результаты прошли балансовую проверку, сопоставлены с полученными другим методом, и являются достоверными.

Результаты работы включены в базу данных RU 2020620516 [23] и могут быть использованы при исследовании физиогенных и патогенных процессов в организме человека, протекающих с участием ионов кальция(II) и аминокислот, а также при создании медицинских препаратов.

- [1] А. Майстер. Биохимия аминокислот, Москва, Иностран. лит. (1961)
- [2] Т. С. Галкина, Л. П. Бессонова. Современные наукоемкие технологии, № 9 (2012) 84
- [3] V. Peyrot, C. Briand, F. Codaccioni, J. C. Sari. Chem. Biol. Interact., **61**, N 2 (1987) 151—158
- [4] В. Ф. Миронов, Е. М. Берлингер, Т. К. Гар. Журн. общей химии, N 37 (1967) 911—912
[V. F. Mironov, E. M. Berliner, T. K. Gar. J. Gen. Chem., N 37 (1967) 911—912]
- [5] И. И. Сейфуллина, Е. Э. Марцинко, Е. А. Чебаненко. Вестн. Одесского нац. ун-та, Химия, **18**, № 1 (2013) 45
- [6] Ю. М. Киселёв, Н. А. Добрынина. Химия координационных соединений, Москва, Академия (2007)
- [7] В. И. Боцюрко. Врачебное дело, **2** (1977) 50—52
- [8] Д. Б. Корман, Л. А. Островская, В. А. Кузьмин. Вопросы онкологии, **64**, № 6 (2018) 697—707
- [9] Г. Гургенидзе, Д. Лабарткава, М. Микаберидзе, Н. Урушадзе, М. Чоговадзе. Аллергология и иммунология, **11**, вып. 2 (2010) 85—86

- [10] **П. Манорик, Е. Близнюкова, М. Федоренко.** Журн. неорг. химии, **33**, № 4 (1988) 977—982
- [11] **E. Bottari.** Ann. Chim. (Rome), **75** (1985) 393—398
- [12] **О. А. Голованова, И. А. Томашевский.** Журн. физ. химии, **93**, № 1 (2019) 11—22 [**О. А. Golovanova, I. A. Tomashevsky.** J. Phys. Chem., **93**, N 1 (2019) 7—17]
- [13] **В. П. Васильев.** Аналитическая химия, лаб. практикум, Москва, Дрофа (2004)
- [14] **И. В. Власова, А. С. Шелпакова, С. М. Добровольский, А. В. Фисенко.** Аналитика и контроль, **13**, вып. 3 (2009) 153—157
- [15] **И. А. Томашевский, К. С. Спиридонова.** Материалы XXXVIII регион. студ. науч.-практ. конф. “Молодежь третьего тысячелетия”, 14—30 апреля 2014 г., Омск (2014) 270—271
- [16] **П. А. Бурюкина, И. В. Власова, К. А. Спиридонова.** Аналитика и контроль, **17**, вып. 3 (2013)
- [17] **И. В. Власова, И. А. Томашевский, Г. И. Клишева, А. О. Мановская, А. Е. Егошина.** Материалы 5-й междунар. науч.-тех. конф. “Техника и технология нефтехимического и нефтегазового производства”, Омск, 25—30 апреля 2015 г. (2015) 124
- [18] **П. А. Бурюкина, И. В. Власова, Р. Р. Миргалеева.** Вестн. Омского ун-та, № 3 (2016) 54—58
- [19] **K. Esbensen.** Multivariate Data Analysis: In Practice: an Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design, CAMO (2005) 150
- [20] **A. E. Martell.** Sci. Total Environ., **64**, N 1-2 (1987) 125—147
- [21] **G. Berthon.** Pure Appl. Chem., **67** (1995) 1117
- [22] **S. A. A. Sajadi.** Adv. Biosci. Biotech. (2010) 55—59
- [23] **О. А. Голованова, И. А. Томашевский.** Спектры смесей ионов кальция (II) и магния (II) с биогенными аминокислотами для расчета общих констант устойчивости и термодинамических параметров комплексообразования, регистрация базы данных, RU 2020620516, 10.03.2020