

СТРУКТУРА ЗВ'ЯЗАНОЇ ВОДИ В СКЛОПОДІБНОМУ ТІЛІ ЗА ДАНИМИ
¹H ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЇ

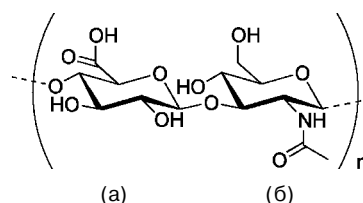
Методом низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії вивчено гідратацію склоподібного тіла великої рогатої худоби. Виявлено, що більша частина води може розглядатися як зв'язана. Незамерзаюча вода не є гомогенною, а існує у вигляді кластерів, розмір яких становить 0,9–50 нм. Її середня асоційованість (участь протонів у формуванні водневих зв'язків) перебуває в діапазоні 1,3–1,75 протона від кожної молекули води.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: склоподібне тіло, зв'язана вода, ¹H ЯМР-спектроскопія, гіалуронова кислота, кластери.

ВСТУП. Середовищем для деяких тканин організму є біологічні рідини, до складу яких входять біополімери білкової та полісахаридної природи. Завдяки високим гідратаційним властивостям біополімерні молекули здатні формувати гелеподібні структури, навіть коли їх концентрація в середовищі вимірюється лише кількома процентами. Тобто біологічні рідини можна розглядати як колігативну систему, властивості якої визначаються міжмолекулярними взаємодіями води з її біополімерною складовою. Супрамолекулярна структура біологічних рідин забезпечує можливість існування багатьох видів клітин, створюючи умови для їх розвитку та процесів метаболізму. Одним з різновидів гелеподібних біологічних рідин є склоподібне тіло, яке також можна віднести до особливого типу сполучної тканини. Склоподібне тіло займає близько 4/5 об'єму очного яблука, надає йому форму, забезпечує тургор (внутрішній тиск) і нестисливість. На 99 % склоподібне тіло складається з води, зв'язаної з молекулами протеогліканів і глікозаміногліканів, які представлені в основному гіалуроновою кислотою [2, 8].

Гіалуронова кислота належить до несольфованих глікозаміногліканів і входить до складу сполучної, епітеліальної і нервової тканин, а також є одним з головних компонентів позаклітинного матриксу. Вона міститься у багатьох біологічних рідинах (слині, синовіальній рідині, слизових оболонках шлунково-кишкового тракту), відіграє важливу роль у проліфе-

рації та міграції клітин. У тілі людини масою 70 кг у середньому міститься близько 15 г гіалуронової кислоти, третина з якої відновлюється протягом доби. Гіалуронова кислота склоподібного тіла є полімерною сполукою, молекулярна маса якої дорівнює 33–61 кДа [2], а елементарна ланка складається з D-глюкуронової кислоти (а) та N-ацетилглюкозаміну (б) і може бути представлена у такий спосіб:



Вже перші досліді, виконані методом ЯМР-спектроскопії [6], показали, що склоподібне тіло містить значну кількість зв'язаної води, тобто такої води, яка замерзає при температурі, значно нижчій 273 К. В останні роки на основі методу низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії було розроблено ефективні способи вимірювання структурних і термодинамічних характеристик міжфазної води в гелях, твердих біологічних об'єктах і гідратованих твердих тілах з розвиненою поверхнею [3, 10, 11].

Оскільки на даний час медичні препарати, виготовлені на основі склоподібного тіла, активно використовують як біогенні стимулятори, а саме склоподібне тіло може слугувати моделлю для дослідження взаємодії нанорозмірних частинок ентеросорбентів зі слизовими секретами організму, метою роботи було вивчити параметри гідратної оболонки біопо-

лімерних складових склоподібного тіла, а також будову кластерів води, які формуються на міжфазних межах у процесі заморожування-відтавання.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як об'єкт дослідження використовували склоподібне тіло великої рогатої худоби (виробництво Республіки Білорусь) з вмістом води 99,0–99,5 %, що було встановлено методом висушування при 105 °С до постійної маси. Свіжовиділений біоматеріал зберігали в холодильнику при температурі мінус 20 °С. Перед вимірюванням його розморожували і поміщали у 5 мм ампулу ЯМР.

Спектри ЯМР отримували на ЯМР-спектрометрі високої розподільчої здатності (Varian "Mercury") з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зонduючий імпульс тривалістю 3 мкс. Температуру в датчику регулювали за допомогою термоприставки Bruker VT-1000 з точністю ±1 град. Інтенсивність сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з використанням процедури розкладання сигналу на його складові у припущенні гаусівської форми лінії, оптимізації нульової лінії і фази з точністю, яка для добре розділених сигналів була не нижчою 5 %, а для сигналів, що перекриваються, – ±10 %. Для запобігання переохолодженню води в досліджуваних об'єктах вимірювання концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Концентрацію незамерзаючої води у зразках обчислювали шляхом порівняння інтенсивності сигналу води у зразках до і після їх заморожування. Методику ЯМР-вимірювань, визначення термодинамічних характеристик і розрахунку радіуса кластерів міжфазної води детально описано в роботах [3, 10, 11].

При аналізі міжфазних явищ для вивчення процесів, що проходять на межі розділу фаз тверде тіло-рідина-пара, використовують два основних підходи – метод надлишкових величин Гіббса і метод шару кінцевої товщини [5]. Відповідно до першого з цих підходів, припускають, що весь надлишок енергії, зумовлений формуванням межі розділу фаз, зосереджений у нескінченно тонкому поверхневому шарі, тоді як термодинамічні параметри решти рідини не відрізняються від об'ємних. При цьому для визначення геометричних розмірів нанорозмірних агрегатів рідини, обмежених твердою поверхнею, можна використати рівняння Гіббса–Томсона, що зв'язує радіус сферичного або циліндричного водного кластера (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, що локалізований у порах радіуса R; $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об'ємного льоду; ρ – густина твердої фази; σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною; ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення. Це рівняння може бути використане для обчислення розподілу пор за розмірами з температурної залежності концентрації незамерзаючої води $C_{uw}(T)$, отриманої на основі методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим заморожуванням води, для суспензій твердих тіл або гідратованих біологічних об'єктів, якщо застосування інших методів аналізу пористої структури є неможливим [3]. На практиці рівняння (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, де константа k для багатьох гетерогенних систем, що містять воду, близька до 50 [3, 9].

У методі шару кінцевої товщини [5] припускають, що вплив поверхні межі розділу фаз поширюється на кілька молекулярних шарів вглиб рідкої фази. Тоді процес замерзання (відтавання) міжфазної води, локалізованої у твердій пористій матриці, проходить відповідно до змін вільної енергії Гіббса, зумовлених впливом поверхні. Цей вплив тим менший, чим далі від поверхні досліджуваний шар води. При $T=273$ К замерзає вода, властивості якої не відрізняються від об'ємних, а з поступовим зниженням температури (без урахування ефекту переохолодження) замерзають шари води, які ближче розташовані до поверхні, причому для міжфазної води справедливе співвідношення:

$$\Delta G_{ice} = -0,036(273,15 - T), \quad (2)$$

де чисельний коефіцієнт являє собою параметр, пов'язаний з температурним коефіцієнтом зміни вільної енергії Гіббса для льоду [4]. За величиною інтенсивності сигналу визначають температурну залежність $C_{uw}(T)$ відповідно до методики, детально описаної в роботах [3, 10, 11], а далі обчислюють кількість сильно- і слабозв'язаної води, а також термодинамічні характеристики цих шарів.

Міжфазну енергію біополімерної складової склоподібного тіла визначали як модуль сумарного зниження вільної енергії води, що зумовлено наявністю межі розділу фаз [3], за формулою:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (3)$$

де C_{uw}^{max} – загальна кількість незамерзаючої води при $T=273$ К.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1, а наведено одержані при різній температурі спектри ^1H ЯМР-зразка склоподібного тіла в процесі підвищення температури від 210 до 280 K. У незамерзломому стані спектр складається з одного сигналу, хімічний зсув якого ($\delta_{\text{H}}=4,8$ м.ч.) близький до хімічного зсуву рідкої води. При заморожуванні інтенсивність сигналу води швидко зменшується зі зниженням температури, отже, спектри не можуть бути записані при постійній чутливості приладу. Крім того, вид спектрів ускладнюється, на них з'являється один або кілька сигналів, зміщених до більших величин δ_{H} (рис. 1, а).

Вода є сильноасоційованою рідиною [1, 7], тому хімічний зсув її протонів визначається здатністю води формувати поліасоціати, впорядковані сіткою водневих зв'язків. Граничними станами для молекул води можна вважати мономер і тетракоординовану воду, що входить до складу льодоподібних структур. У першому випадку жоден з протонів води не бере участі в утворенні водневозв'язаних комплексів, а в другому такий комплекс формує

кожен протон. При цьому слід враховувати, що одночасно з участю молекули води в асоціативних взаємодіях як протонодонора інша молекула виступає електрондонором, і загальна кількість водневих зв'язків у льоду (або льодоподібних структурах), що припадають на кожен протон, дорівнює чотирьом. Проте основним чинником, що впливає на сумарну величину хімічного зсуву води, є середнє число зв'язаних протонів (n) [12]. Саме його можна вводити як параметр асоційованості. Відповідно до результатів експериментальних визначень величин хімічного зсуву різних форм води, узагальнених в роботі [3], можна вважати, що мономерні молекули води мають хімічний зсув протонів, близький до 1 м.ч., а у складі льоду – 7 м.ч. У цьому наближенні кожному значенню хімічного зсуву води буде відповідати певне значення n . Опрацьовані таким чином спектри незамерзаючої води для склоподібного тіла наведено на рисунку 1, б.

З даних рисунка 1, б випливає, що для повністю відталого зразка $n=1,3$. Зі зменшенням частки незамерзаючої води величина n

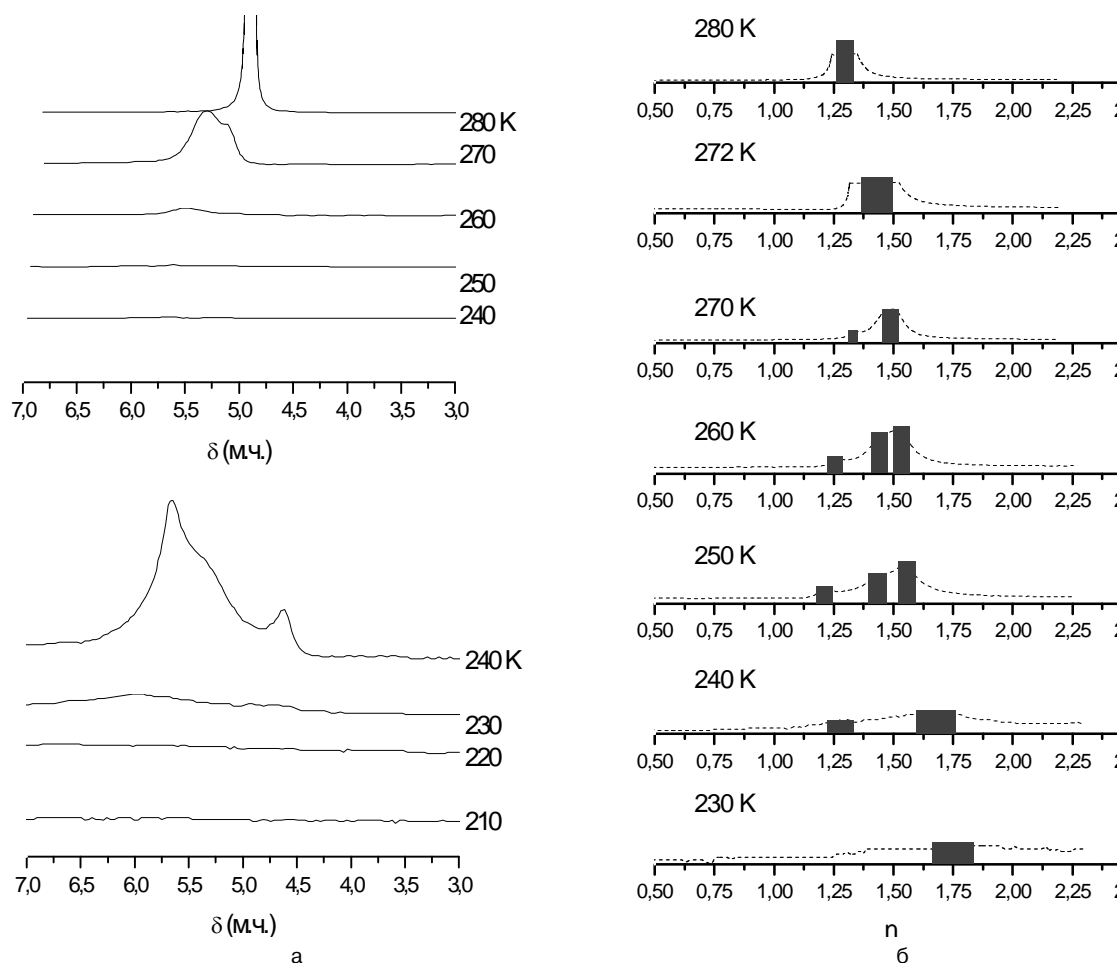


Рис. 1. Спектри ^1H ЯМР води у замороженому зразку склоподібного тіла при різних температурах (а) та її асоційованість (б).

зростає до 1,75 при 230 К. Слід зазначити, що зі зниженням температури завдяки вимерзанню води збільшується частка води, яка безпосередньо бере участь у взаємодіях з молекулами біополімерів.

На рисунку 2, а показано температурну залежність концентрації незамерзаючої води, розраховану за відповідними величинами інтенсивності сигналу води в спектрах ^1H ЯМР. Оскільки в температурному інтервалі $260 < T < 273$ К інтенсивність сигналу зростає дуже швидко, на кривій $C_{\text{uw}}(T)$, крім реально отриманих експериментальних точок (відзначених кружками), з інтервалом 2 град. проставлено віртуальні точки (відмічені квадратами). Віртуальні точки було введено з метою більш наочної візуалізації розподілів за радіусами й енергіями для кластерів міжфазної води, розрахованих згідно з рівняннями (1) і (2) (рис. 2, в і рис 2, б відповідно).

На залежності $C_{\text{uw}}(T)$ спостерігаються дві ділянки – швидкої і повільної змін з температурою величини C_{uw} . Відповідно до класифікації, наведеної в [3], вони можуть бути віднесені до слабо- і сильнозв'язаної води (WBW і SBW відповідно). Визначити концентрацію сильнозв'язаної води C_{uw}^s можна шляхом екстраполяції відповідної ділянки до 273 К (рис. 2, а). Величина C_{uw}^s виявилася дуже великою – 12 г/г у перерахунку на суху речовину біополімерної складової склоподібного тіла. Оскільки залежність $C_{\text{uw}}(T)$ має плавний характер, практично всю воду, що входить до складу склоподібного тіла, слід вважати зв'язаною, тобто в склоподібному тілі міститься 87 г/г слабозв'язаної води. Слабозв'язана вода входить до складу кластерів, розмір яких перевищує 3 нм (рис. 2, в), а зміна міжфазної енергії Гіббса, що зумовлена взаємодією з межами розділу фаз, менша 0,45 кДж/моль (рис. 2, б). Сильнозв'язана вода утворює досить великі кластери, радіус яких перебуває в діапазоні 0,9–2,2 нм. Міжфазна енергія біополімерної складової склоподібного тіла, яку визначали відповідно до рівняння (3), виявилася дуже великою ($\gamma_s = 1273$ Дж/г), що значно перевищує величини, отримані для водних розчинів білків крові або молекул полісахаридів [3, 11].

ВИСНОВКИ. Практично вся вода, що входить до складу склоподібного тіла, є зв'язаною, причому до сильнозв'язаної можна віднести 13 % загальної кількості води. При заморожуванні у спектрах ^1H ЯМР спостерігаються від 1 до 3 сигналів води з різним ступенем

асоційованості, що відповідає участі у водневих зв'язках в середньому від 1,3 до 1,75 протонів від кожної молекули води. Незамерзаюча вода має вигляд кластерів, розмір яких для сильнозв'язаної води становить 0,9–2,2 нм, а для слабозв'язаної – 2,8–50 нм.

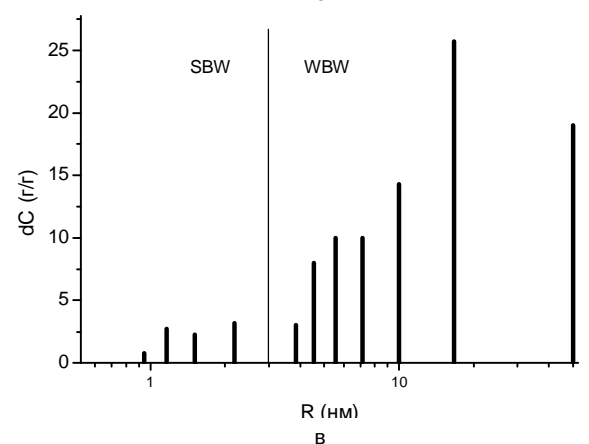
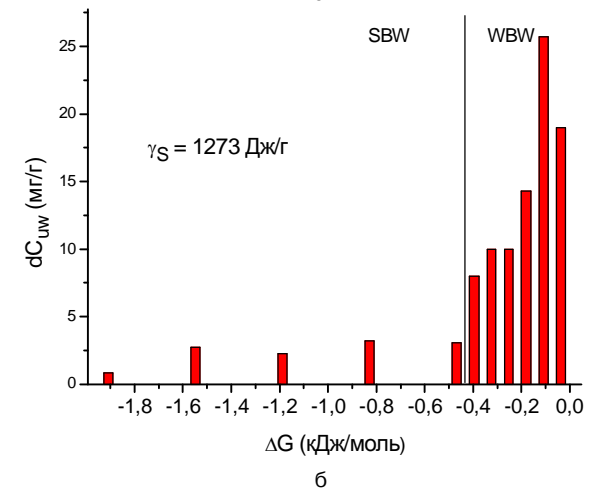
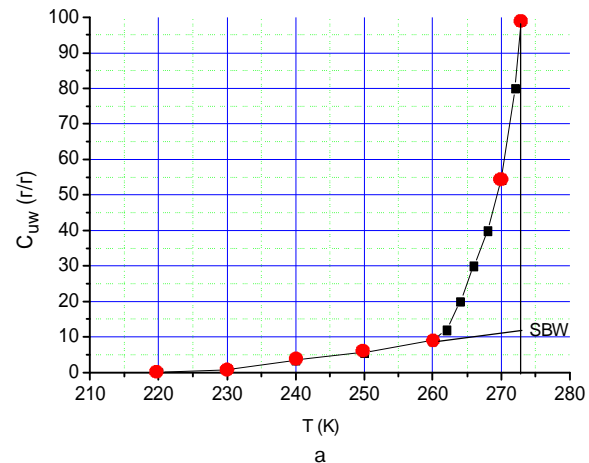


Рис. 2. Температурна залежність концентрації незамерзаючої води (а), розподіл за енергіями (б) і розподіл за радіусами (в) для кластерів води, зв'язаної в склоподібному тілі. SBW – strongly bound water (сильнозв'язана вода), WBW – weakly bound water (слабозв'язана вода).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонченко В. Я. Основы физики воды / В. Я. Антонченко, А. С. Давыдов, В. В. Ильин. – К. : Наук. думка, 1991. – 668 с.
2. Вит В. В. Строение зрительной системы человека / В. В. Вит. – Одесса : Астропринт, 2003. – 664 с.
3. Гунько В. М. Вода на межфазной границе / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наук. думка, 2009. – 694 с.
4. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / под ред. В. П. Глушкова. – М. : Наука, 1978. – 495 с.
5. Фролов Ю. Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы / Ю. Г. Фролов. – М. : Химия, 1982. – 400 с.
6. Чередниченко В. М. Исследование методом ЯМР дегидратации стекловидного тела, вызванной криопротектором ПЭО-400 / В. М. Чередниченко, П. А. Бездетко, В. Д. Зинченко // Криобиология. – 1987. – № 4. – С. 45–46.
7. Эйзенберг Д. Структура и свойства воды / Д. Эйзенберг, В. Кауцман. – Л. : Гидрометеиздат, 1975. – 280 с.
8. Holmes M. W. A. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size / M. W. A. Holmes, M. T. Bayliss, H. Muir // Biochem. J. – 1988. – **250**. – P. 435–441.
9. Petrov O. V. NMR cryoporometry: Principles, application and potential / O. V. Petrov, I. Furo // Progr. In NMR. – 2009. – **54**. – P. 97–122.
10. Turov V. V. Application of ^1H NMR Spectroscopy Method for Determination of Characteristics of Thin Layers of Water Adsorbed on the Surface of Dispersed and Porous Adsorbents / V. V. Turov, R. Lebeda // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 1999. – **79**, № 2–3. – P. 173–211.
11. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. M. Bogatyrev [et al.] // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – **118**, № 1–3. – P. 125–172.
12. Yamaguchi Y. Theoretical Prediction of Proton Chemical Shift in Supercritical Water Using Gas-Phase Approximation / Y. Yamaguchi, N. Yasutake, M. Nagaoka // Chem. Phys. Lett. – 2001. – **340**. – P. 129–136.

И. И. Геращенко, А. И. Маркина, В. В. Туров

ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А. А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

СТРУКТУРА СВЯЗАННОЙ ВОДЫ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ПО ДАННЫМ ^1H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Резюме

Методом низкотемпературной ^1H ЯМР-спектроскопии изучена гидратация стекловидного тела крупного рогатого скота. Обнаружено, что большая часть воды может рассматриваться как связанная. Незамораживающая вода не гомогенна, а присутствует в виде кластеров, размер которых составляет 0,9–50 нм. Её средняя ассоциированность (участие протонов в формировании водородных связей) находится в диапазоне 1,3–1,75 протона от каждой молекулы воды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стекловидное тело, связанная вода, ^1H ЯМР-спектроскопия, гиалуроновая кислота, кластеры.

I. I. Herashchenko, A. I. Markina, V. V. Turov

CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

STRUCTURE OF BOUND WATER IN VITREOUS BODY BY ^1H NMR SPECTROSCOPY

Summary

The hydration of the vitreous body of cattle by low-temperature ^1H NMR spectroscopy was studied. It was found that major part of the water in vitreous body exists in bound state. Non-freezing water is not homogeneous and forms the clusters with a size of 0,9–50 nm. The average associativity of non-freezing water (part of the protons in hydrogen bonds formation) is in a range of 1,3–1,75 of protons from each molecule of water.

KEY WORDS: vitreous body, bound water, ^1H NMR spectroscopy, hyaluronic acid, clusters.

Отримано 25.05.11

Адреса для листування: І. І. Геращенко, вул. Драгоманова, 5, кв. 223, Київ, 02068, Україна.