



УДК 547.962 : 541.63

МЕТОД РАСЧЕТА КОНСТАНТ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ
ЦИКЛОПЕПТИДНЫХ ИОНОФОРОВ

Гуревич А. З.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

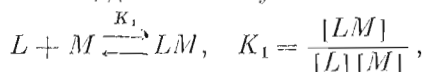
Рассмотрены математические модели комплексообразования наиболее распространенных типов металл-ионофорных комплексов с соотношением лиганд — катион 1:1 и 2:1, а также с последовательным образованием комплексов состава 1:1 и 2:1. Описан метод вычисления из спектральных данных параметров комплексообразования, их погрешностей, а также выбор математической модели по F -критерию. Приведены примеры ЭВМ-расчета параметров комплексообразования эниптаина В с различными катионами и концентрационные зависимости содержания отдельных форм в смеси.

Природные циклопептиды и их синтетические аналоги, образующие устойчивые комплексы с различными катионами, служат эффективным инструментом исследования механизмов ионной транслокации в биологических и модельных мембранных системах [1]. Один из важных этапов этих исследований заключается в количественном изучении катионсвязывающих свойств макроциклических лигандов в гомогенных системах [1—5]. Установлено, что ионофоры могут образовывать комплексы с соотношением лиганд — катион не только 1:1, но и 2:1, а в ряде случаев и более сложные соединения [2—5]. За ходом комплексообразования можно следить с помощью различных физических методов, например спектральных, которые наряду с данными о составе и устойчивости комплексов позволяют получить информацию и об их структуре. Для сравнительной оценки устойчивости комплексов служат константы устойчивости, соответствующие определенной стехиометрии комплекса.

Настоящая работа посвящена методике ЭВМ-расчета этих констант из экспериментальных данных по математическим моделям, описывающим наиболее распространенные типы связывания катиона: а) образование комплексов с соотношением лиганд — катион 1:1; б) последовательное образование комплексов состава 1:1 и 2:1; в) образование комплексов состава 2:1. Метод расчета констант, использованный в данной работе, отличается от предложенных ранее в работах [6—8].

Математические модели. Исходя из обычных условий экспериментов по комплексообразованию (титрование солью), будем считать известными исходную молярную концентрацию лиганда A_0 и соли B_0 . Концентрацию A_0 полагаем величиной постоянной, а отношение B_0/A_0 изменяемой.

1. *Образование комплекса со стехиометрией 1:1.* Уравнение реакции и константа устойчивости K_1 для этого случая имеют вид:



где $[L]$ — концентрация свободного лиганда, $[M]$ — концентрация свободного катиона и $[LM]$ — концентрация комплекса в равновесных условиях. Выражение для теоретически вычисляемой величины $P_{\text{выч}}$ записывается в виде

$$P_{\text{выч}} = \frac{[L]}{A_0} P_L + \frac{[LM]}{A_0} P_{LM},$$

где P_L и P_{LM} — значения параметров, соответствующих свободному и комплексному состоянию лиганда. Как правило, отсчет удобно проводить относительно параметра P_L , измеренного для лиганда в отсутствие соли. Тогда изменения вычисляемого параметра в ходе титрования описываются уравнением

$$\Delta P_{\text{выч}} = \frac{[LM]}{A_0} \Delta P_{LM}. \quad (1)$$

Во всех рассматриваемых случаях $\Delta P_{\text{выч}}$ выражено через константы устойчивости, общую концентрацию лиганда A_0 и отношение B_0/A_0 .

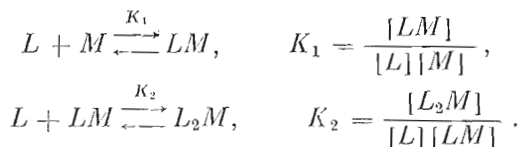
Для данного случая преобразование уравнения (1) дает:

$$\Delta P_{\text{выч}} = \frac{[L] K_1}{1 + K_1 [L]} \Delta P_{LM} (B_0/A_0), \quad (2)$$

где значения $[L]$ получаем решением уравнения

$$[L]^2 + (1/K_1 + B_0/A_0 - A_0) [L] - A_0/K_1 = 0. \quad (3)$$

II. *Последовательное образование комплексов со стехиометрией 1:1 и 2:1.* Этот случай описывается соотношениями



Выражение для приращения наблюдаемого параметра имеет вид:

$$\Delta P_{\text{выч}} = \frac{[LM]}{A_0} \Delta P_{LM} + \frac{2[L_2M]}{A_0} \Delta P_{L_2M}. \quad (4)$$

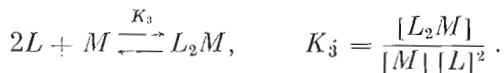
После соответствующего преобразования уравнение (4) принимает вид:

$$\Delta P_{\text{выч}} = (D_1 \Delta P_{LM} + D_2 \Delta P_{L_2M}) R/C, \quad (5)$$

где $C = 1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2$; $D_1 = K_1 [L]$; $D_2 = 2K_1 K_2 [L]^2$; $R = B_0/A_0$ и значения $[L]$ получаем из решения кубического уравнения

$$\begin{aligned} K_1 K_2 [L]^3 + (K_1/A_0 + 2K_1 K_2 (B_0/A_0) - K_1 K_2) [L]^2 + (K_1 (B_0/A_0) - \\ - K_1 - 1/A_0) [L] - 1 = 0. \end{aligned} \quad (6)$$

III. *Образование комплекса со стехиометрией 2:1.*



Выражение для $\Delta P_{\text{выч}}$:

$$\Delta P_{\text{выч}} = \frac{2[L_2M]}{A_0} \Delta P_{L_2M}. \quad (7)$$

Уравнение (7) в этом случае преобразуется к виду:

$$\Delta P_{\text{выч}} = \frac{2K_3 [L]^2}{1 + K_3 [L]^2} \Delta P_{L_2M} (B_0/A_0), \quad (8)$$

где значение $[L]$ получаем решением кубического уравнения

$$(K_3/A_0)[L]^3 + (2K_3(B_0/A_0) - K_3)[L]^2 + [L]/A_0 - 1 = 0. \quad (9)$$

Метод решения и анализ данных. Для определения неизвестных параметров, к которым относятся константы устойчивости и значения ΔP_{LM} и ΔP_{L_2M} , ищем минимум функционала:

$$\Phi = \sum_{i=1}^n \omega_i (\Delta P_{\text{эксп. } i} - \Delta P_{\text{выч. } i})^2, \quad (10)$$

где n — число экспериментальных точек; $\{\Delta P_{\text{эксп. } i}\}$ — набор величин, получаемый из эксперимента, в зависимости от отношения (B_0/A_0) ; ω_i — весовые множители, равные $1/\sigma_i^2$ (σ_i — дисперсия измерения величины $\{\Delta P_{\text{эксп. } i}\}$), в случае равноточных измерений можно принять $\omega_i = 1$; $\{\Delta P_{\text{выч. } i}\}$ — набор величин, получаемый в результате расчета по уравнениям (2), (5) или (8), в зависимости от выбранной математической модели комплексообразования при ограничении

$$K_j > 0. \quad (11)$$

Для минимизации функционала (10) использован метод сопряженных направлений Пауэлла [9], алгоритм и достоинства которого описаны в работе [10]. Поскольку этот алгоритм разработан для класса задач без ограничений, для его реализации необходимо модифицировать условия (11). Принимая диапазон изменения констант практически неограниченным, представим их в виде $K = 10^x$. Тогда оптимизируемыми параметрами в уравнении (10) являются не K_j , а $x_j = \lg K_j$. Кроме того, для масштабирования параметров, а также для выбора начального шага оптимизации, одинакового для всех оптимизируемых параметров, нормированы значения экспериментально наблюдаемых величин $\{\Delta P_{\text{эксп. } i}\}$ путем их деления на максимальное значение $(P_{\text{эксп.}})_{\text{макс}}$. Из уравнений (2), (5) и (8) видно, что наряду с подлежащими определению параметрами $K_1, K_2, K_3, \Delta P_{LM}$ и ΔP_{L_2M} в них входит неизвестная концентрация свободного лиганда $[L]$.

Чтобы отыскать все неизвестные величины, организована следующая итерационная процедура для проведения расчетов на ЭВМ. Для разумно выбранных исходных значений констант K_j решалось одно из уравнений (3), (6) или (9) в зависимости от выбранной схемы комплексообразования. Решением уравнения (3) в случае (I) является:

$$[L] = \frac{-(1/K_1 + (B_0/A_0) - A_0)}{2} + \sqrt{\frac{(1/K_1 + (B_0/A_0) - A_0)^2}{4} + A_0/K_1}.$$

Решением уравнений (6) и (9) в случаях (II) и (III) является наименьший положительный корень. Для его получения использовалась комбинация методов прямого поиска и деления отрезка пополам [11]. Затем, в зависимости от математической модели, значения K_j , найденные значения $[L]$ и исходные параметры, соответствующие различным типам комплексов ($\Delta P_{LM}, \Delta P_{L_2M}$), подставлялись в соответствующие уравнения (2), (5) или (8) для определения $\Delta P_{\text{выч.}}$. Полученные таким образом значения $\{\Delta P_{\text{выч. } i}\}$ подставляли в уравнение (10). Значения концентраций $[L]$, величин $K_j, \Delta P_{LM}$ и ΔP_{L_2M} варьировались до достижения минимума выражения (10). После этого находился оптимальный набор искомых параметров. Анализ набора получаемых параметров рассмотрен в работах [12, 13], где указывается, что «наилучший» набор параметров не обязательно правильно описывает совокупность химических взаимодействий, протекающих в системе. Достоверность этого набора зависит от того, насколько соответствует действительности выбранная модель, достаточны и надежны экспериментальные данные, совершенна программа.

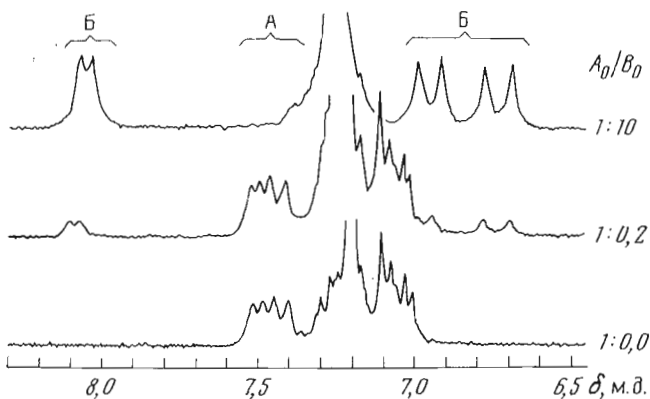


Рис. 1. Спектры ^1H -ЯМР синтетического аналога антаманида $\text{cyclo}(-\text{Val-Pro-Pro-Ala-Phe})_2$ при различных соотношениях A_0/B_0 . Показаны сигналы свободной (А) и комплексной (Б) форм

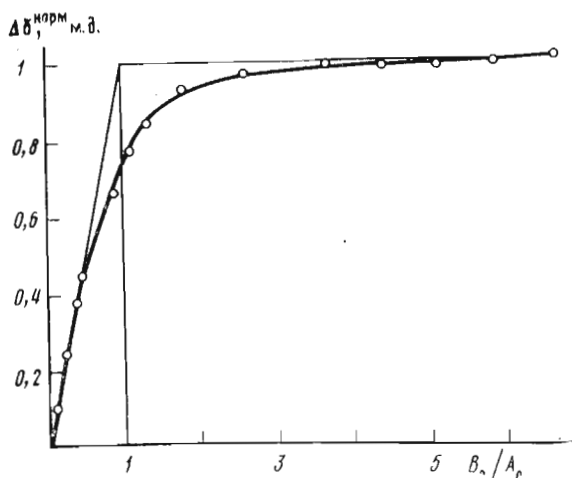


Рис. 2. Кривая титрования (три-N-дезметил)эпициатина в RbSCN по данным ^1H -ЯМР (параметры – см. таблицу)

Частные случаи. Задача отыскания неизвестных параметров может быть упрощена, если есть возможность измерять любую из концентраций ($[L]$, $[M]$, $[LM]$, $[L_2M]$), участвующих в комплексообразовании частиц.

Примером определения концентрации свободного лиганда $[L]$ может служить случай медленного обмена между свободной и комплексной формами. В спектрах ЯМР синтетического аналога антаманида – $\text{cyclo}(-\text{Val-Pro-Pro-Ala-Phe})_2$ при изменении отношения B_0/A_0 наблюдаются отдельные сигналы от свободной (сигналы А) и комплексной (сигналы Б) форм (рис. 1), интегральная интенсивность которых пропорциональна исходной концентрации A_0 . Тогда концентрация $[L]$ вычисляется через площадь соответствующих сигналов по формуле

$$[L] = \left(\frac{S_A}{S_{(A+B)}} \right) A_0.$$

Используя полученные значения концентраций $[L]$, можно приближенно определить константы устойчивости методами, не требующими привлечения ЭВМ [12, 14]. Однако при этом может получиться большая погрешность в вычисленных параметрах комплексообразования, связанная с низ-

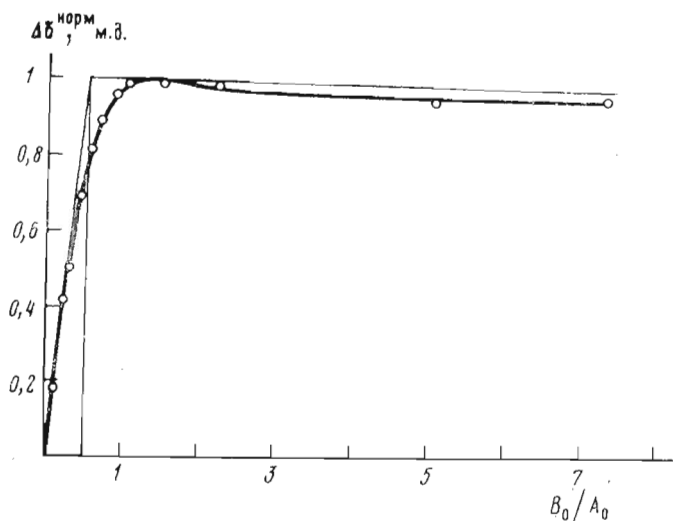


Рис. 3. Кривая титрования энниатина в $\text{Ca}(\text{CNS})_2$ по данным ^1H -ЯМР (параметры — см. таблицу)

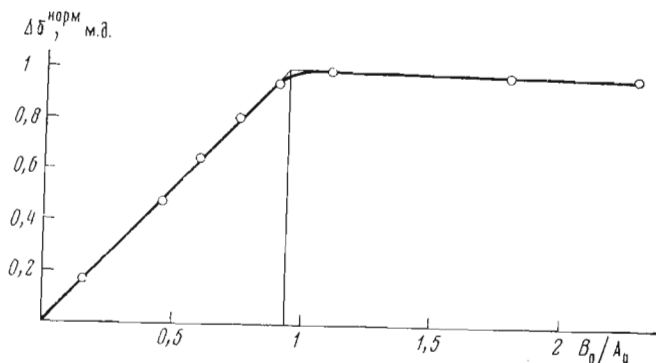


Рис. 4. Кривая титрования энниатина в CsSCN по данным ^1H -ЯМР (параметры — см. таблицу)

кой точностью измерения интегральной интенсивности сигналов. Полученные таким образом значения параметров могут служить в качестве первого приближения для оптимизации уравнения (10) на ЭВМ.

Еще одним способом упрощения задачи отыскания неизвестных параметров может служить измерение концентрации свободного катиона $[M]$ с помощью ион-селективных электродов [14], однако работа в неводных растворителях сопряжена с рядом существенных трудностей [15].

Выбор модели. Для правильной оценки параметров комплексообразования особенно важен выбор математической модели (схемы комплексообразования). В некоторых случаях по характеру кривой комплексообразования можно определить математическую модель. Из рис. 2 видно, что при экстраполяции линейных участков экспериментальной кривой точка их пересечения (точка эквивалентности [16]) находится при соотношении лиганд — катион 1 : 1. В этом случае расчет ведется по модели (I). Кривая процесса комплексообразования, представленная на рис. 3, явно сложнее, чем в моделях (I) и (III). В этом случае расчет следует вести по модели (II). В других случаях выбрать математическую модель по графику не представляется возможным. Так, например, на рис. 4 точка эквивалентности смещена в сторону соотношения 1 : 2. Поэтому при расчете используются модели для случаев (I) и (II), а затем проводится анализ по

Константы комплексообразования K_j и приращения параметров ΔPLM

Соединение	Растворитель	Концентрация A_0 , М	Катион
Энниатин В	$CD_3CN-CDCl_3$, 1:1	0,0406	Na^+
		0,0432	K^+
		0,0470	Cs^+
(Три- <i>N</i> -дезметил)энниатин В	$CDCl_3-CD_3OH(CD_3OD)$, 1:2	0,0415	K^+
		0,0350	Ca^{2+}
		0,0125	Rb^+

F -критерию [17, 18], который рассчитывается по формуле [19]

$$F = \frac{(\Phi_1^{мин} - \Phi_2^{мин})(n - p_1)}{\Phi_1^{мин}(p_1 - p_2)}$$

для числа степеней свободы $(p_1 - p_2)$ и $(n - p_1)$, где $\Phi_1^{мин}$ и $\Phi_2^{мин}$ — минимум, получаемый оптимизацией уравнения (10) по моделям (I) и (II) соответственно, p_1 и p_2 — число оптимизируемых параметров (I) и (II) моделей, n — число экспериментальных точек. Особо следует отметить, что в спор-

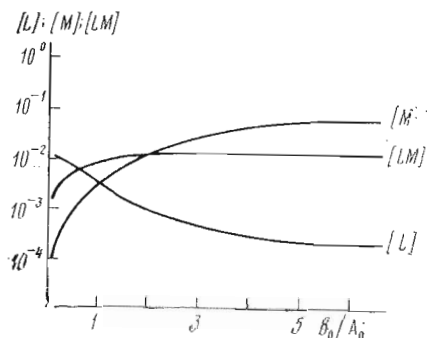


Рис. 5. Зависимость содержания отдельных форм в смеси от соотношения B_0/A_0 при титровании (три-*N*-дезметил)энниатина В $RbSCN$

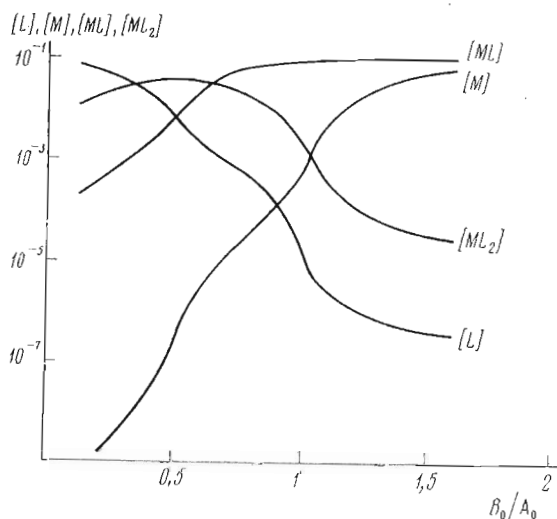


Рис. 6. Зависимость содержания отдельных форм в смеси от соотношения B_0/A_0 при титровании энниатина В $Ca(CNS)_2$

Константы комплексообразования, М ⁻¹		Приращения параметров, м. д.	
K_1	K_2	ΔP_{L_1M}	ΔP_{L_2M}
$(0,3 \pm 0,04) \cdot 10^5$	$(0,1 \pm 0,02) \cdot 10^2$	$0,04 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,005$
$(0,6 \pm 0,08) \cdot 10^5$	$(0,6 \pm 0,07) \cdot 10^2$	$0,08 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,01$
$(0,1 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$(0,1 \pm 0,01) \cdot 10^2$	$0,08 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
$(1,1 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$(0,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$0,095 \pm 0,001$	$0,1 \pm 0,001$
$(1,2 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$(0,8 \pm 0,09) \cdot 10^2$	$0,24 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$
$(0,5 \pm 0,07) \cdot 10^3$	—	$0,37 \pm 0,04$	—

ных случаях отсутствие точек в области перегиба кривой комплексообразования может привести к ошибочному выбору модели. При большом разбросе экспериментальных точек в той же области расчет проводится по всем моделям, а выбор схемы комплексообразования — по *F*-критерию. Следует отметить также, что даже при правильно выбранной схеме комплексообразования низкая точность экспериментальных данных приводит к большим ошибкам в определении параметров кривых.

Погрешности. Экспериментальные величины $\{\Delta P_{аксн}\}_i$ содержат погрешности измерения, которые в свою очередь приводят к ошибкам в определении параметров комплексообразования. Для расчета ошибок параметров комплексообразования, найденных оптимизацией функционала (10), вычислялись индивидуальные доверительные интервалы этих параметров [20] следующим образом. Преобразуем одну из формул (2), (5) или (8) для вычисления того из параметров, для которого строится интервал, принимаем все остальные вычисляемые параметры за истинные и подставляем в преобразованную форму экспериментально наблюдаемые величины $\{\Delta P_{аксн}\}_i$. Таким образом получаем соответствующие значения параметра. Затем стандартным методом [21] определяем доверительный интервал для выбранного параметра. Тем же способом строим интервалы для других параметров.

Результаты. Для решения поставленной задачи были разработаны программы (Fortran IV), реализованные на ЭВМ типа Varian 620/L=100 (США). Эти программы применены для расчетов параметров комплексообразования депептидных антибиотиков группы энниатинов (таблица) [22]. На рис. 5, 6 приведены вычисленные концентрационные зависимости содержания отдельных форм в смеси при титровании энниатина В.

Проверка изложенного в данной работе алгоритма и разработанных на его основе ЭВМ-программ на примере анализа ЯМР- и КД-спектров таких ионофоров, как энниатин, валиномицин, антаманид и их синтетические аналоги, показала высокую степень объективности выбора модели и точность вычисления параметров комплексообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. (1974) Мембраноактивные комплексоны, «Наука», М.
2. Ivanov V. T., Evstratov A. V., Sumskaya L. V., Melnik E. I., Chumburidze T. S., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. (1973) FEBS Lett., **36**, 65–71.
3. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Mikhaleva I. I., Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Meshcheryakova E. N., Tulchinsky V. M. (1974) Int. J. Peptide Prot. Res., **6**, 465–498.
4. Сумская Л. В., Балашова Т. А., Чумбуридзе Т. С., Мельник Е. И., Михалева И. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1977) Биоорг. химия, **3**, 5–21.
5. Madison V., Deber Ch. M., Blout E. (1977) J. Amer. Chem. Soc., **99**, 4788–4798.
6. Deranleau D. A. (1969) J. Amer. Chem. Soc., **91**, 4044–4054.
7. Lenkinski E. R., Elgavish G. A., Reuben J. (1978) J. Magn. Res., **32**, 367–376.
8. Щербакова Э. С., Гольдштейн И. П., Гурьянова Е. И., Кочешков К. А. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., **6**, 1262–1267.
9. Powell M. J. D. (1964) Computer J., **7**, 155, 303.
10. Химмельблау Д. (1975) Прикладное нелинейное программирование, «Мир», М.

11. Грудн Ф. (1976) Программирование на языке «Фортран IV», «Мир», М.
12. Россотти Ф., Россотти Х. (1965) Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворах, «Мир», М.
13. Взаимодействия в растворах окислительно-восстановительных систем, под ред. Б. П. Никольского и В. В. Пальчевского (1977) с. 29–35, Изд-во ЛГУ.
14. Бек М. (1973) Химия равновесий реакций комплексообразования, «Мир», М.
15. Frensdorff H. K. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 600–606.
16. Гурьянова Е. Н., Гольдштейн И. П., Ромм И. П. (1973) Донорно-акцепторная связь, «Химия», М.
17. Химмельблау Д. (1973) Анализ процессов статистическими методами, «Мир», М.
18. Худсон Д. (1967) Статистика для физиков, «Мир», М.
19. Ellis K. J., Duggleby R. G. (1978) *J. Biochem.*, **171**, 513–517.
20. Фишер Р. (1958) Статистические методы для исследователей, Госстатиздат, М.
21. Румшиский Л. З. (1971) Математическая обработка результатов экспериментов, с. 19–34, «Наука», М.
22. Gurevich A. Z. (1978) Second NMR Symposium. Abstracts, Chlum/Trěboně, 19.

Поступила в редакцию
3.VII.1979

A METHOD FOR THE CALCULATION OF CYCLOPEPTIDE IONOPHORE COMPLEXING CONSTANTS

GUREVICH A. Z.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A method has been developed for calculating complexing equilibrium constants of cyclopeptide ionophores on the basis of CD and NMR parameters. The method permits determination of the stoichiometry of complexation (1:1, 2:1 or consecutive 1:1 and 2:1 ionophore:metal aggregates) and also, in ambiguous cases, selection of correct mathematical model according to the *F*-criterion. Examples are given on computer determination of the parameters for enniatin B complexation with various cations, including data on the concentration dependence of individual forms in a mixture of varying stoichiometry.