

СЛАБО АССОЦИИРОВАННАЯ ВОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ И НА МЕЖФАЗНОЙ ГРАНИЦЕ КРЕМНЕЗЕМОВ

В.М. Гунько, С.П. Туранская, О.В. Нечипор, Е.В. Юхименко,
В.В. Туров, А.А. Чуйко

*Институт химии поверхности Национальной академии наук Украины,
ул. Генерала Наумова 17, 03680 Киев-164*

Свойства воды на мозаичной гидрофобно/гидрофильной поверхности пирогенных кремнеземов, силикагелей и биологических систем (биомакромолекулы, дрожжевые клетки, костные и мышечные ткани) в разных средах (воздух, вода, CCl_4 и $CDCl_3$) в широком температурном диапазоне были изучены с использованием методов 1H ЯМР спектроскопии с послойным вымораживанием жидкой фазы (вблизи 273 К) и межфазной воды ($180 < T < 273$ К) и квантово-химического моделирования. Показано, что объемная вода и вода, локализованная на гидрофобно/гидрофильной межфазной границе, могут иметь разную структуру. Это (i) слабо ассоциированная вода (1H ЯМР химический сдвиг $\delta_H = 1,1 \dots 1,7$ м.д.), которая в то же время является водой высокой плотности (ВВП) с разрушенной структурой водородных связей, состоящей из индивидуальных молекул воды или небольших кластеров, а также воды с сильно искривленными водородными связями и (ii) сильно ассоциированная вода ($\delta_H = 4 \dots 5$ м.д.), входящая в состав больших кластеров, нано- и микродоменов, а также протяженных межфазных слоев с ВВП и водой малой плотности (ВНП). Межфазную воду можно также разделить на слабо- (изменение свободной энергии Гиббса $\Delta G < -0,8$ кДж/моль) и сильносвязанную ($\Delta G > -0,8$ кДж/моль). Молекулярная подвижность слабо ассоциированной воды больше (благодаря частичному разрушению водородных связей или их ослаблению), чем сильно ассоциированной воды. Это приводит к различию в температурной зависимости 1H ЯМР спектров при $T < 273$ К.

The behaviour of water at mosaic hydrophilic/hydrophobic surfaces of different silicas and in biosystems (biomacromolecules, yeast cells, wheat seeds, bone and muscular tissues) was studied in different dispersion media over wide temperature range using 1H NMR spectroscopy with layer-by-layer freezing-out of bulk water (close to 273 K) and interfacial water ($180 < T < 273$ K), and quantum chemical methods. Bulk water and water bound to hydrophilic/hydrophobic interfaces can be assigned to different structural types. There are (i) weakly associated interfacial water (1H NMR chemical shift $\delta_H = 1.1-1.7$ ppm) that can be assigned to high-density water (HDW) with collapsed structure (CS), representing individual molecules in hydrophobic pockets, small clusters and interstitial water with strongly distorted hydrogen bonds or without them, and (ii) strongly associated interfacial water ($\delta_H = 4-5$ ppm) with larger clusters, nano- and microdomains, and continuous interfacial layer with both HDW and low-density water (LDW). The molecular mobility of weakly associated bound water is higher (because hydrogen bonds are distorted and weakened and their number is smaller than that for strongly associated water) than that of strongly associated bound water (with strong hydrogen bonds but nevertheless weaker than that in ice Ih) that results in the difference in the temperature dependences of the 1H NMR spectra at $T < 273$ K.

1. Различные формы воды, их объемные и поверхностные характеристики

Поскольку свойства как объемной, так и граничной воды очень необычны, они детально изучались как экспериментальными, так и теоретическими методами [1 - 17]. Эти свойства сильно зависят от структуры и химии поверхности твердого тела, концентрации твердой фазы в дисперсии, температуры, давления, присутствия полярных и неполярных растворителей, а также атомных или молекулярных ионов. Вода может быть описана в терминах модели двух состояний с высокой плотностью (ВВП с частично разрушенной системой водородных связей ($\rho \geq 1 \text{ г/см}^3$ при нормальных условиях)) и низкой плотностью (ВНП со структурой водородных связей, подобной льду ($\rho < 1 \text{ г/см}^3$)), которые находятся в динамическом равновесии. Это равновесие может быть сдвинуто в ту или иную сторону путем изменения давления, температуры, скорости нагревания или охлаждения, а также растворенными веществами или поверхностными функциональными группами, которые обладают хаотропным (разупорядочивающим) или космотропным (структурирующим) влиянием. Многие аспекты такого явления детально описаны в работах Чаплина [16] и Виггинс [11]. Соответствующие идеальная и искаженная икосаэдрическая модели структуры воды практически эквивалентны двум состояниям воды со структурой гексагонального льда Ih и льда II [16] или моделям воды с низкой и высокой плотностью ВНП/ВВП [11].

Правильный икосаэдрический нанодомен с 280 H_2O (120 H_2O на поверхности) имеет размер ~ 3 нм (ВНП для Ih) и искаженную структуру ВВП [11], соответствующую льду II [16]. Сходные нанодомены могут образовывать и большие структуры, сохраняющие упорядоченную сетку водородных связей [16]. Меньшие кластеры существуют как внутри икосаэдрических, так и между ними, обеспечивая непрерывность жидкой среды. Аналогичные кластеры воды могут формироваться в ограниченном пространстве пор твердых адсорбентов, зазорах между смежными наночастицами или их агрегатами или в пустотах, образованных структурными элементами макромолекул в биосистемах. В частности, додекаэдрические кластеры воды обнаружены на гидрофобной поверхности и на поверхности белков [8, 16]. Малые кластеры воды регистрировали и в порах различных адсорбентов. Следует отметить, что имеются экспериментальные подтверждения икосаэдрической структуры воды. Например, функции распределения расстояний $\text{O}\cdots\text{O}$, $\text{O}\cdots\text{H}$ и $\text{H}\cdots\text{H}$, рассчитанные на основе икосаэдрической модели, хорошо согласуются с рентгеновскими данными и данными дифракции нейтронов [16].

Вода обладает многими необычными свойствами [11, 16]. Так, точка кипения воды слишком высока по сравнению со сходными соединениями (что обусловлено большей прочностью водородных связей), поскольку экстраполяция температуры кипения аналогов дает для воды -75°C . Для воды высоки: точка плавления, критическая температура, поверхностное натяжение, вязкость, теплота испарения и удельная теплоемкость и малы: сжимаемость и термический коэффициент расширения. Для воды характерны очень короткое время спин-спиновой ЯМР релаксации при низкой температуре, большая по сравнению с другими материалами вариabельность стабильной (и метастабильной) кристаллической и аморфной структур льда; более быстрое замерзание горячей воды, чем холодной; аномально высокая подвижность протонов и гидроксил-ионов воды в электрическом поле; высокая диэлектрическая проницаемость и ее аномальное температурное поведение и др. [16].

Ионы (и соответствующие функциональные группы в макромолекулах или на поверхности твердых тел) могут быть разделены на два класса с хаотропными свойствами (например, катионы $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+$ и анионы $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, приводящие к формированию ВВП) и космотропными свойствами ($\text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+}$

$> \text{Ca}^{2+} > \text{H}^+ > \text{Na}^+$ и цитрат³⁻ $>$ сульфат²⁻ $>$ фосфат²⁻, приводящие к формированию ВНП [16]. Функциональные группы на поверхности немодифицированного или модифицированного кремнезема могут быть как хаотропными ($\equiv\text{SiOH}$, $\equiv\text{SiO}^-$), так и космо-тропными ($\equiv\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3$).

Следует отметить, что свойства граничной воды независимо от типа поверхности, с которой она контактирует, являются более сложными и сильно отличаются от таковых для объемной воды. Это обусловлено электростатическими и дисперсионными взаимодействиями, а также пространственными эффектами, которые изменяют структуру сетки водородных связей граничных слоев воды [18], что сказывается на ее структуре [11, 16]. В пористых телах граничная зона между мезопорами (диаметр > 2 нм) и микропорами (диаметр ≤ 2 нм) соответствует размерам икосаэдра ВВП (3 нм). Особенности структуры воды в ограниченном пространстве пор сказываются на молекулярной подвижности и характере релаксационных процессов [19-25].

Ряд методов используют для определения характеристик граничной воды: (i) измерение сил притяжения или отталкивания между двумя поверхностями, расположенными на определенном расстоянии друг от друга [19, 26-28]; (ii) метод контактных углов [29-31]; (iii) дифференциальная сканирующая калориметрия [32, 33]; (iv) измерение тока термостимулированной деполяризации [34-37]; (v) диэлектрическая релаксационная спектроскопия [38, 39]; (vi) термопрограммируемая десорбция (ТПД) [40, 41]; (vii) ИК и рамановская спектроскопия [16, 42-47]; (viii) реология [16, 48]; (ix) ¹H ЯМР спектроскопия с послойным вымораживанием объемной и граничной воды [20, 39, 49-52]; дифракция рентгеновских лучей и нейтронов [16], адсорбция [11], плотность поверхностного заряда и электрокинетический потенциал, а также другие методы [11, 16]. При изучении адсорбции из водных растворов взаимодействием вода – адсорбент обычно пренебрегают, поскольку его достаточно трудно оценивать. Совмещение адсорбционных методов с ¹H ЯМР спектроскопией позволяет глубже постичь взаимодействие между водой, адсорбентом и подвижными или иммобилизованными молекулами адсорбата. Метод ЯМР спектроскопии является уникальным с точки зрения получения информации о подвижности и состоянии молекул в пористой среде [53-57] и адсорбционных слоях [58, 59], о локализации растворенных веществ, динамике молекул воды и их взаимодействиях с биомакромолекулами или твердой поверхностью [60-65]. Измерение времени протонной ЯМР релаксации в широком температурном интервале позволяет определить времена корреляции вращательного и диффузионного движений [66, 67]. ЯМР исследования воды в растворах белков [68, 69], клеток [70], тканей [71, 72] и других системах [16, 73, 74] показывают наличие структурированной воды, которая не замерзает при $T < 273$ К. Эта вода также называется «связанной» водой и соответствует ВВП вблизи гидрофильной поверхности и ВНП вблизи гидрофобной. Она характеризуется значительно большим, по сравнению с объемной водой, временем корреляции вращательного движения [11, 16, 75]. По спектрам ¹H ЯМР молекул, адсорбированных на твердой поверхности, путем сравнения химических сдвигов протонов молекул, находящихся в свободном и связанном состояниях, можно идентифицировать разные типы структуры адсорбционных комплексов. Характеристики адсорбированной воды, возмущенной поверхностью, могут быть рассчитаны с использованием температурных зависимостей интенсивности ¹H ЯМР сигнала граничной воды в суспензиях при $T < 273$ К [49-52, 76-80].

Первые ¹H ЯМР исследования, направленные на определение химических сдвигов атомов водорода в молекуле воды (δ_{H} относительно тетраметилсилана), были проведены Поплом и др. [81, 82]. Было обнаружено различие в ¹H ЯМР спектрах воды в жидком и газообразном состояниях, что обусловлено участием молекул воды в водородных связях. Число водородных связей, приходящихся на одну молекулу воды ($n_{\text{НВ}}$), можно оценить, предполагая слабую зависимость прочности связи от величины $n_{\text{НВ}}$. Точное

измерение величины δ_H как функции температуры было проведено для жидкого и газообразного состояний воды в широком диапазоне температур [83]. Было установлено, что δ_H для неассоциированных молекул воды составляет 0,56 м.д. относительно газообразного метана и соответствует разнице между соответствующими величинами тензоров изотропного экранирования $\sigma_{iso} = (\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz})/3$. Позже величина δ_H воды, адсорбированной на различных кремнеземах, была измерена с помощью твердотельного ЯМР (CP-MAS NMR) с вращением образца под магическим углом [20, 84, 85]. Было показано, что $\delta_H \approx 4$ м. д. для воды, адсорбированной на кремнеземе при комнатной температуре. Величина δ_H поверхностных гидроксильных групп кремнезема $\equiv SiOH$ равна 1,7-1,8 м. д. для свободных силанольных групп и до 8 м. д. для силанольных групп, участвующих в образовании водородных связей $\equiv SiO-H \cdots X$. В общем, величина δ_H адсорбированной воды зависит от прочности водородных связей (что влияет на тензор экранирования), числа водородных связей, приходящихся на одну молекулу, а также влияния электростатического поля и токов, обусловленных твердой поверхностью и примесями, обладающими парамагнитными или диамагнитными свойствами, а также подвижными ионами. Каждая молекула воды может принимать участие в формировании четырех водородных связей (двух $O-H \cdots X$ и двух $H_2O \cdots H-Y$). Для молекул воды, растворенных в неполярном или слабо полярном органическом растворителе, $\delta_H = 1,1 \dots 1,7$ м.д. При этом вода находится в виде индивидуальных молекул [82, 86]. Измерения показывают, что для льда $\delta_H = 7$ м.д. [85]. В этом случае каждая молекула воды принимает участие в образовании четырех водородных связей, а угол $\angle OHO$ близок к 180° (ВНП). Уменьшение величины $\angle OHO$ может приводить к переходу ВНП \rightarrow ВВП и уменьшению величины δ_H [52].

Поведение воды в ограниченном пространстве полостей биомакромолекул или клеток отличается от поведения объемной воды вследствие искажения структуры сетки водородных связей. Известно, что молекулы воды в ограниченном пространстве микропор могут формировать небольшие кластеры (от димера до пентамера) [87]. Теплота адсорбции воды в таких порах может быть относительно небольшой (15-30 кДж/моль) [88], поэтому органические молекулы или поверхностные функциональные группы могут сильно влиять на поведение воды в гидрофобном окружении [89]. Сходные эффекты будут иметь место и для внутриклеточной воды [11, 16, 90]. Подвижность тетракоординированных молекул воды, связанной белками, сходна с подвижностью для льда, хотя энтропийный вклад в изменение свободной энергии Гиббса соответствует промежуточному значению между жидкой водой и льдом [91]. Объем внутримембранной воды в нативных клетках составляет небольшую часть внутриклеточной воды. Известно, что растворенные молекулы и ионы могут располагаться как с внешней, так и с внутренней стороны мембраны клетки и оказывать влияние на равновесие ВВП/ВНП, трансмембранный транспорт, каталитическую способность энзимов, процессы метаболизма и др. [11, 16, 92].

Среднее число соседей у молекулы воды в жидкой воде может находиться между 4 и 5 (не все молекулы воды участвуют в образовании водородных связей) [16, 93, 94] и оно увеличивается с повышением температуры при одновременном увеличении длины H -связей. Это приводит к искажению структуры сетки водородных связей в ВВП по сравнению со льдом ($\delta_H = 7$ м. д. для идеальной ВНП), а химический сдвиг в жидкой воде уменьшается до $\delta_H \approx 4,8$ м. д. (ВВП) при нормальных условиях и до 3-3,5 м. д. вблизи температуры кипения. Для молекул воды, «выпавших» из сетки водородных связей и отвечающих пику радиальной функции распределения расстояний между атомами кислорода $r_{O \dots O} \approx 0,37$ нм в соответствии с XRD измерениями [16], величина δ_H должна быть намного меньше средней величины. Молекулы воды, не участвующие в

образовании прочных водородных связей, например, в слабо полярной среде хлороформа, имеют химический сдвиг $\delta_{\text{H}} \approx 1,1 \dots 1,7$ м. д. [95]. Химический сдвиг может изменяться при взаимодействии с заряженными группами или ионами вследствие того, что изменяются электронная плотность на атоме водорода и экранирование протона.

Состояние воды на различных поверхностях исследовали методом ^1H ЯМР спектроскопии с вымораживанием объемной и адсорбированной воды [39, 49-52, 89, 95]. Характеристики взаимодействия воды с биомакромолекулами или клетками, например, изменение свободной энергии Гиббса в системе клетка–вода может быть оценено достаточно просто [60-65, 90, 96], что показано в следующем разделе. Упомянутые внутриклеточные явления были исследованы лишь частично вследствие того, что характеристики разных типов клеток сильно различаются, а взаимодействие с водой специфических внутриклеточных структур при различных температурах и уровнях гидратированности трудно предвидеть [11, 16].

2. Использование ^1H ЯМР спектроскопии для измерения характеристик межфазной воды

Спектры ЯМР записывали на спектрометрах высокого разрешения Bruker WP-100 SY (Германия) и Varian 400 Mercury (США). Для получения ^1H ЯМР спектров использовался 90° зондирующий импульс. Температура образца регулировалась термopриставкой Bruker VT-1000. Погрешность измерений составляла $\pm 10\%$ по интенсивности ^1H ЯМР сигнала и ± 1 К по температуре. Для предотвращения переохлаждения изучаемых систем, измерения концентрации незамерзающей воды проводили после предварительного охлаждения образца до 190-200 К [49-52]. Сигнал от воды, входящей в состав льда (как и протонов макромолекул), не вносил вклад в регистрируемый ^1H ЯМР сигнал подвижной воды ввиду малых времен ($\sim 10^{-6}$ с) поперечной релаксации протонов в твердых телах.

Измерения проводились с использованием стандартных ЯМР ампул (5 мм в диаметре) и вкладышей диаметром 4 мм, содержащих 400-500 мг клеток, 150 мг кости, 20-40 мг пирогенного оксида или 200-250 мг силикагеля. Вкладыши использовали для предотвращения растрескивания основной ампулы при замораживании водных суспензий. Дейтерохлороформ (использовался как внешний стандарт при определении химического сдвига протонов) помещали в зазор между основной и внутренней ампулами. Образцы с дрожжевыми клетками, не модифицированным или модифицированным кремнеземом, помещались в ампулу, после чего к ним добавляли требуемое количество воды. Затем содержимое образца усреднялось встряхиванием при комнатной температуре в течение 30 мин.

Измерение химических сдвигов протонов внутриклеточной воды проводили на воздухе (с использованием внешнего стандарта CHCl_3 , $\delta_{\text{H}} = 7,26$ м.д.) или в среде CDCl_3 . В хлороформе способно растворяться относительно небольшое количество воды (массовая доля $< 0,6\%$ при $T < 295$ К). Поэтому можно было считать, что вода, растворенная в хлороформе, не вносит существенного вклада в общий сигнал ^1H ЯМР. Использование инертного растворителя позволяло точно определять химический сдвиг δ_{H} связанной воды, устраняло неоднородное уширение сигнала ЯМР и замедляло молекулярный обмен молекул воды, связанной с разными активными центрами поверхности [49-52]. Автоматическое интегрирование давало возможность определить интегральную интенсивность (I) выбранного сигнала и измерить: (i) интегральную интенсивность сигнала I каждого образца, содержащего определенное количество воды при различных температурах; затем произвести вычисление калибровочной функции для известного количества воды, добавляемой к выбранному образцу при разных температурах; (ii) произвести съемку

спектров исследуемой системы при разных температурах; (iii) определить зависимость количества незамерзающей воды как функции температуры путем сравнения интенсивностей соответствующих сигналов изучаемых образцов; (iv) определить взаимосвязь между изменением свободной энергии Гиббса незамерзающей воды при заданной температуре (определяемую путем сравнения с изменением свободной энергии Гиббса для льда) с количеством воды в образце; (v) проинтегрировать эту функцию для получения суммарного изменения свободной энергии Гиббса межфазной воды. Все эти стадии позволяют получить количественные результаты с ошибкой, не превышающей $\pm 15\%$.

Условием замерзания внутриклеточной воды или воды на межфазной границе твердое тело/жидкость является равенство свободных энергий Гиббса межфазной воды и льда. Понижение температуры замерзания структурированной воды ($T_f < 273,15$ К) обусловлено уменьшением ее свободной энергии Гиббса, вызванным молекулярными взаимодействиями на границе раздела фаз ($\Delta G = G - G_0 < 0$, где G_0 свободная энергия льда при 273,15 К), возмущающими сетку водородных связей жидкой воды. Изменения свободной энергии Гиббса льда изменяются с температурой в соответствии с соотношением

$$\Delta G_{ice} = -0,036(273,15 - T). \quad (1)$$

Тот факт, что при температуре ниже 273,15 К связанная поверхностью вода может оставаться в незамерзшем состоянии, предполагает, что свободная энергия Гиббса межфазной воды остается меньшей, чем для объемной воды или объемного льда. Это обусловлено взаимодействием воды с твердой поверхностью или биомакромолекулами:

$$G_w^i < G_{ice}. \quad (2)$$

Дальнейшее понижение температуры смещает это неравенство к точке T_c , в которой замерзает некоторая порция связанной воды. При T_c :

$$\Delta G_w = \Delta G_{ice}, \quad (3)$$

где

$$\Delta G_w^i = G_w^i(T) - G_w^0, \quad (4)$$

(G_w^0 соответствует свободной энергии Гиббса невозмущенной объемной воды при 273,15 К, а индекс i показывает, что величина относится к межфазной границе), а

$$\Delta G_{ice} = G_{ice}(T) - G_{ice}^0, \quad (5)$$

G_{ice}^0 - свободная энергия Гиббса льда при 273,15 К. Предполагается, что ΔG_{ice} не зависят от присутствия твердой поверхности. Подвижность молекул воды, особенно вращательные характеристики молекул жидкой воды на межфазной границе, определяются средним числом водородных связей [49-52]. Протонный обмен в кластерах воды может быть представлен следующей схемой:



в которой обмен протонами осуществляется между кластерами А и В поверхностных комплексов через переходное состояние $(H_2O)^*$. В предположении мономолекулярного механизма скорость обмена определяется уравнением аррениусовского типа:

$$(T_2)^{-1} = (T_2)_0^{-1} \exp(-\Delta G_a/RT), \quad (7)$$

где $(T_2)_0^{-1}$ - предэкспоненциальный фактор и при высокой температуре $T_2 \rightarrow T_{2,0}$. Уравнение (7) может быть преобразовано с учетом того, что свободная энергия активации

$$\Delta G_a = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger. \quad (8)$$

и тогда могут быть оценены термодинамические параметры обменных процессов (в пренебрежении вкладов от $P\Delta V$ и $V\Delta P$ на межфазной границе при динамическом равновесии перехода ВВП/ВНП). Функция распределения свободной энергии активации для процесса ядерной релаксации $f(\Delta G_a)$ может быть вычислена с использованием уравнения (7) как ядра интегрального уравнения Фредгольма первого рода

$$k(T) = \int_0^{\Delta G_{\max}} k'(T, \Delta G_a) f(\Delta G_a) d(\Delta G_a), \quad (9)$$

которое можно решить с использованием метода регуляризации при условии $f(\Delta G_a) \geq 0$ для любых ΔG_a и фиксированном параметре регуляризации ($\alpha = 0.01$). Площадь, ограниченная кривой $\Delta G(C_{uw})$ (температурные зависимости $\Delta G(T)$ и $C_{uw}(T)$ легко могут быть преобразованы в соотношение между ΔG и C_{uw}), определяет суммарное изменение свободной энергии Гиббса для внутриклеточной или межфазной воды:

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G dC_{uw}, \quad (10)$$

где C_{uw}^{\max} - общее количество незамерзающей воды при $T \rightarrow 273$ К, а K - константа, зависящая от размерности используемых в уравнении параметров [49-52]. Параметры сильно- и слабо-связанной (которая в то же время является ВВП) и слабо-связанной (ВВП/ВНП) воды могут быть рассчитаны с использованием графика зависимости $\Delta G(C_{uw})$. Слабо-связанная вода соответствует той части незамерзающей воды, для которой свободная энергия лишь немного понижена межмолекулярными взаимодействиями с твердой поверхностью или молекулами биополимеров. Она замерзает при температуре вблизи 273 К. Сильно-связанная вода может находиться в незамерзшем состоянии при значительном понижении температуры. Для гидрофильной поверхности она соответствует слою воды, максимально возмущенному в результате взаимодействия с поверхностью [16, 49-52]. Толщина слоя каждого типа связанной воды (C_{uw}^s и C_{uw}^w для сильно- и слабо-связанной воды соответственно) и максимальное понижение свободной энергии в этих слоях воды (ΔG_s и ΔG_w) могут быть оценены с использованием линейной экстраполяции участков зависимости $\Delta G(C_{uw})$, отвечающих этим слоям, к осям координат. Следует отметить, что для определения количества воды используются две величины, обычно относимые к единице массы твердого вещества: (i) вода, оставшаяся незамерзшей при температуре измерений (C_{uw}) и (ii) общая величина воды в образце (C_{H_2O}). Часть незамерзающей воды, отвечающая $\Delta G > -0.8$ кДж/моль, может быть отнесена к слабо-связанной воде. Применение ^1H ЯМР спектроскопии с послойным вымораживанием объемной и межфазной воды детально описано в работах [39, 49-52, 77- 80, 89, 95].

В более узких порах вода замерзает при более низких температурах, что описывается уравнением Гиббса-Томпсона [21]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl} T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (11)$$

где $T_m(R)$ - температура плавления льда, локализованного в порах радиуса R , $T_{m,\infty}$ - температура плавления объемного льда, ρ - плотность твердой фазы, σ_{sl} - энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью и ΔH_f - объемная энтальпия плавления. Это уравнение может быть использовано для вычисления распределения пор по размерам из температурной зависимости величины C_{uw} , полученной на основе метода ^1H ЯМР спектроскопии с послойным вымораживанием воды, для водных суспензий твердых тел или гидратированных биологических объектов, когда применение других методов анализа пористой структуры затруднительно.

2.1. Квантово-химические расчеты

Молекулярные и кластерные структуры рассчитывали с использованием пакета программ GAMESS (текущая версия и версия 6.4 для PC) [97], а также пакетов программ NWChem 4.5 [98] и Gaussian 94 [99]. Величины магнитного экранирования $\sigma_{H,iso}$ (или химический сдвиг $\delta_{H,iso}$ относительно тетраметилсилана) и анизотропии экранирования

$$\Delta\sigma_{aniso} = \sigma_{11} - (\sigma_{22} + \sigma_{33}) \quad (12)$$

вычисляли методом масштабно-независимых атомных орбиталей (GIAO) [100] с использованием метода Хартри-Фока или теории функционала плотности (DFT) (DFT использовали с B3LYP) [99]. Константу ядерного магнитного экранирования можно представить как асимметричный тензор с девятью независимыми компонентами

$$\sigma_{\alpha\beta}^N = \frac{\partial^2 E}{\partial B_\alpha \partial \mu_{N\beta}}, \quad (13)$$

где $\alpha, \beta = x, y, z$ указывают компоненты внешнего магнитного поля \mathbf{B} и ядерного магнитного момента μ_N . Тензор магнитного экранирования ядра N может быть записан в виде:

$$\sigma^N = Tr[\mathbf{D}^{(0)} \mathbf{H}_N^{(11)}] + Tr[\mathbf{D}^{(10)} \mathbf{H}_N^{(01)}], \quad (14)$$

где Tr определяет след матрицы, верхние индексы представляют порядок возмущения под влиянием внешнего магнитного поля, а ядерные магнитные моменты $\mathbf{D}^{(0)}$ и $\mathbf{D}^{(10)}$ являются невозмущенным и возмущенным моментами первого порядка и \mathbf{H} – одно-электронные интегралы в гамильтониане [100, 101]. Уравнение (14) справедливо при использовании различных теоретических подходов (HF SCF, MP-n, CC, DFT) с различием в определении $\mathbf{D}^{(0)}$ и $\mathbf{D}^{(10)}$, кроме того, это уравнение справедливо как для случая использования базиса независимых φ_μ , так и зависимых от поля $\varphi_\mu(\mathbf{B})$ атомных орбиталей (АО). В методе GIAO последняя функция определяется как

$$\varphi_\mu(\mathbf{r}, \mathbf{B}) = \exp\{-i/2c\}[\mathbf{B} \times (\mathbf{R}_\mu - \mathbf{R}_G)]\mathbf{r}\} \varphi_\mu(\mathbf{r}, 0), \quad (15)$$

где c - скорость света, $\varphi_\mu(\mathbf{r}, 0)$ описывает систему независимых от поля базисных функций, центрированных при \mathbf{R}_μ . Метод GIAO позволяет получить масштабно-независимые результаты для тензора магнитного экранирования. Детально этот метод описан в [100, 101].

Свободную энергию сольватации ΔG_s , а также структурные и электронные параметры молекул и кластеров в разбавленных растворах рассчитывали с использованием сольватационных моделей SM5.42/HF/6-31G(d), SM5.42/HF/6-31+G(d) и SM5.42/B3LYP/6-31G(d) и пакета программ GAMESOL (версия 3.1) [102]. Свободная энергия сольватации молекул может быть определена с использованием их геометрических параметров в газообразном состоянии

$$\Delta G_s(R) = \Delta G_{EP} + \Delta G_{CDS}, \quad (16)$$

где

$$\Delta G_{EP} = \Delta G_E + \Delta G_P, \quad (17)$$

$$G_{CDS} = \sum_k A_k \sigma_k, \quad (18)$$

ΔG_{EP} – электростатическая компонента ΔG_s ; ΔG_E - энергия деформации зарядовой плотности молекулы под влиянием растворителя; ΔG_P - энергия взаимодействия молекул с растворителем в процессе его реорганизации; A_k – доступная поверхность k -го атома, σ_k - поверхностное натяжение k -го атома (функция пространственной геометрии

раствора и параметров растворителя). Величина ΔG_s может быть определена с учетом релаксации геометрии системы при сольватации

$$\Delta G_s = G(l, \mathbf{R}_e(l)) - G(g, \mathbf{R}_e(g)) = E(l, \mathbf{R}_e(l)) + G_P(\mathbf{R}_e(l)) + G_{CDS}(\mathbf{R}_e(l)) - E(g, \mathbf{R}_e(g)), \quad (19)$$

где индексы l и g отвечают жидкой и газовой фазе соответственно, а \mathbf{R}_e отвечает равновесной геометрии системы [102]. Для изучения эффектов сольватации использовали также метод IEFPCM [103, 104].

3. Вода в биосистемах

3.1. Дрожжевые клетки

Мозаичные гидрофобно/гидрофильные структуры являются неотъемлемой частью большинства биосистем, поскольку в макромолекулах (белки, ДНК и др.) соседствуют полярные и неполярные фрагменты. В качестве полярных фрагментов могут выступать кислород- и азотсодержащие, а также другие группы, молекулы (например вода) и ионы (катионы металлов, Cl^- и др.). Они соседствуют с неполярными молекулами (например, липидами) или фрагментами молекул (например, неполярные боковые группы протеинов или CH_2 цепочки фосфолипидов). Другими словами, во внутриклеточном пространстве контактируют различные хаотропные и космотропные молекулы или молекулярные фрагменты, находящиеся во внутриклеточной воде. В клетках могут быть созданы условия для формирования межфазных слоев слабо ассоциированной воды [90]. Для предотвращения формирования протяженных водных структур со свойствами, близкими к свойствам объемной воды, характеризующейся химическим сдвигом $\delta_H = 4-5$ м. д., концентрация воды в системе должна быть меньше некоторой критической величины. Наиболее подходящим объектом для изучения слабо ассоциированной воды являются частично обезвоженные клетки, находящиеся в состоянии анабиоза.

В работе [90] методом ^1H ЯМР спектроскопии изучены высушенные и увлажненные дрожжевые клетки, которые характеризуются высокой устойчивостью к процессам высушивания, замораживания и регидратации. При регидратации к навеске 100-200 мг клеточной массы добавляли 10-200 мг воды и после перемешивания в течение 0,5 ч образцы использовали для ^1H ЯМР измерений. Спектр ^1H ЯМР внутриклеточной воды при малой ее концентрации представляет собой широкий сигнал с максимумом при $\delta_H = 1-2$ м. д. С ростом концентрации внутриклеточной воды химический сдвиг воды увеличивается до 35 м. д. (рис. 1). С понижением температуры ширина сигнала воды увеличивается из-за частичного замерзания внутриклеточной воды и уменьшения ее молекулярной подвижности.

Данные, приведенные на рис. 1, *a*, показывают, что ^1H ЯМР спектры воды максимально высушенных дрожжевых клеток (содержащих приблизительно 70 мг воды на 1 г сухого вещества) имеют малый химический сдвиг δ_H . Следовательно, эта внутриклеточная вода является слабо ассоциированной, т.е. существует в виде малых кластеров или индивидуальных молекул, локализованных между структурными элементами внутриклеточной системы. Величина δ_H увеличивается до 3-5 м.д. с увеличением общего содержания воды до $C_{\text{H}_2\text{O}} = 320$ мг/г (рис. 1, *b*)

Ширина ^1H ЯМР сигнала внутриклеточной воды заметно уменьшается при замене воздуха на хлороформ-*d* (рис. 2). Это позволяет проследить за изменениями химического сдвига и формы сигнала связанной воды. Если концентрация воды в клетках не превышает $C_{\text{H}_2\text{O}} = 270$ мг/г, то сигнал воды имеет химический сдвиг $\delta_H = 1,1 - 1,7$. Его интенсивность увеличивается с увеличением количества воды в клетках. Уменьшение интенсивности этого сигнала с понижением температуры, обусловленное замерзанием внутри-

клеточной воды, наблюдается только при $T < 210$ К. Ширина сигнала во всем диапазоне температур, доступном измерению, изменяется незначительно, что свидетельствует о довольно высокой подвижности молекул связанной воды при низких температурах.

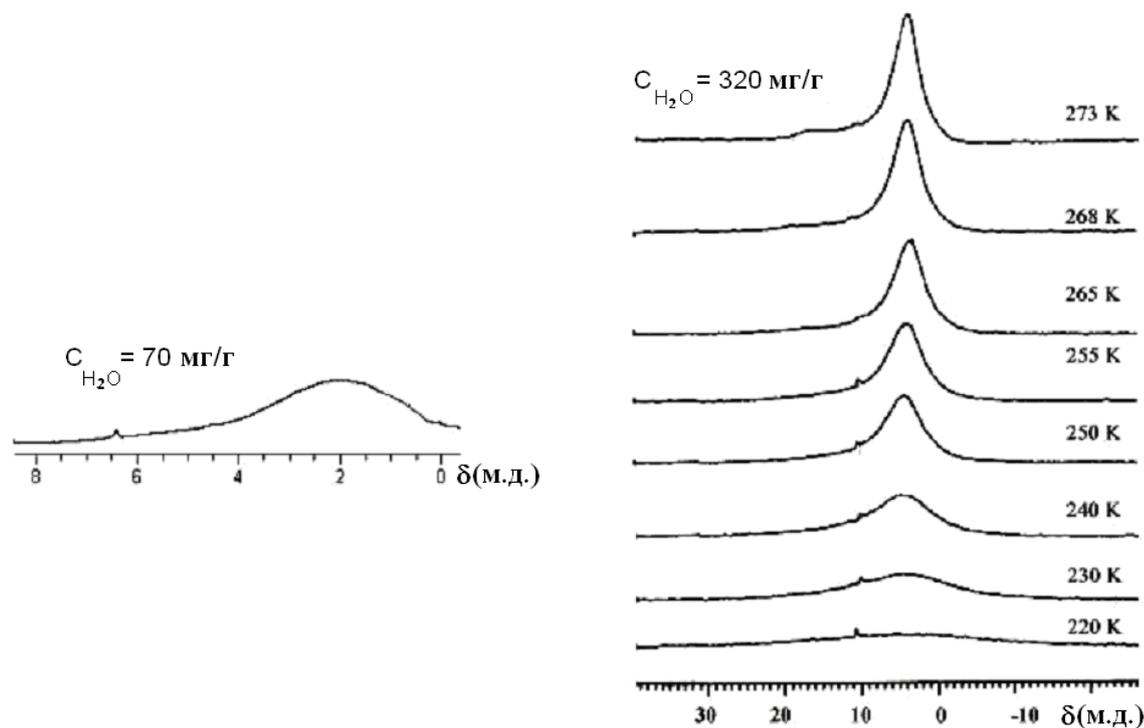


Рис. 1. ^1H ЯМР спектры воды в дрожжевых клетках на воздухе: (а) максимально дегидратированных при 293 К и (б) содержащих $C_{\text{H}_2\text{O}} = 320$ мг/г, при различных температурах

Величина химического сдвига воды в сильно дегидратированных клетках близка к химическому сдвигу молекул воды, которые не принимают участия в Н-связях с оптимальной структурой, соответствующих ВВП. Следовательно, эта вода слабо ассоциирована и входит в состав комплексов с искаженными связями или является внеструктурной водой в ВВП. При увеличении концентрации внутриклеточной воды до $C_{\text{H}_2\text{O}} = 320$ мг/г наблюдается уменьшение интенсивности сигнала 2 при $\delta_{\text{H}} = 1,1-1,7$ м. д. и при этом появляется более широкий сигнал воды с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 5$ м. д. (сигнал 1, обусловленный преимущественно ВВП). Интенсивность этого сигнала сильно уменьшается с понижением температуры и он перестает регистрироваться в спектрах при $T < 230$ К (рис. 2, с и 2, d). Еще меньше интенсивность сигнала 2 для образца при $C_{\text{H}_2\text{O}} = 400$ мг/г. Таким образом, состояние воды сильно изменяется в узком диапазоне гидратированности дрожжевых клеток ($270 < C_{\text{H}_2\text{O}} < 400$ мг/г), в результате чего вода переходит из слабо ассоциированного в сильно ассоциированное состояние с другим равновесным отношением концентраций ВВП/ВНП, количеством внеструктурной воды или концентрацией небольших кластеров воды с сильно нарушенной структурой водородных связей.

Поскольку некоторое количество воды может растворяться в жидком хлороформе, а химический сдвиг такой воды совпадает с химическим сдвигом сигнала 2, на рис. 2, с (нижний спектр) приведен спектр хлороформа-d с растворенной водой. В этом случае интенсивность сигнала растворенной в объеме хлороформа воды значительно меньше, чем интенсивность сигнала 2. Принимая во внимание тот факт, что объем дисперсной

среды в клеточной суспензии значительно меньше, чем объем хлороформа, насыщенного водой (рис. 2, с нижний спектр), реальное соотношение интенсивности сигналов 2 и воды, растворенной в хлороформе, еще меньше. Поэтому можно считать вклад от растворенной воды в сигнал 2 незначительным.

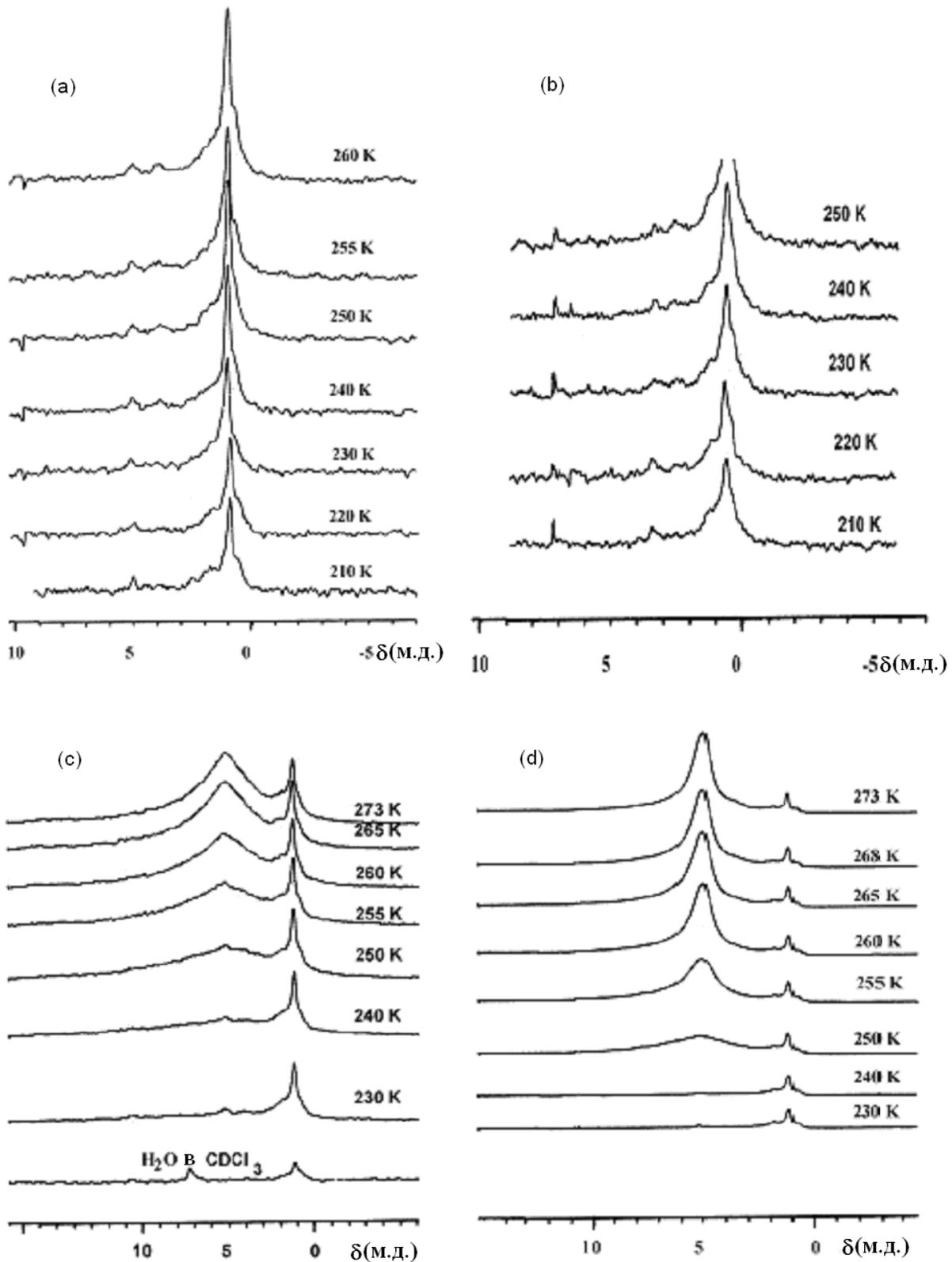


Рис. 2. ^1H ЯМР спектры воды в дрожжевых клетках при различной температуре в среде CDCl_3 при $C_{\text{H}_2\text{O}} =$ (a) 110, (b) 270, (c) 320 и (d) 400 мг/г

Зависимость межфазной энергии системы дрожжевые клетки/вода от содержания воды показана на рис. 3. Как видно, величина γ_s уменьшается с уменьшением C_{H_2O} . Поскольку вклад от слабо ассоциированной воды растет с уменьшением гидратированности клеток, можно заключить, что уменьшение межфазной энергии обусловлено уменьшением концентрации сильно ассоциированной воды. Следует отметить, что в противоположность минеральным адсорбентам в клетках фаза, связанная с гидрофобно/гидрофильной поверхностью не может быть детерминирована. Роль хаотропных и космотропных функциональных групп, оказывающих разное структурирующее влияние на внутриклеточную воду и определяющих закономерности изменения свободной энергии Гиббса системы, могут играть компактно упакованные фрагменты белков, липопротеинов и липидов, структура которых может стабилизироваться в присутствии определенного количества слабо ассоциированной воды. Отмеченные небольшие изменения свободной энергии Гиббса могут свидетельствовать о высокой жизнестойкости дрожжевых клеток в процессах высушивания, регидратации и замораживания.

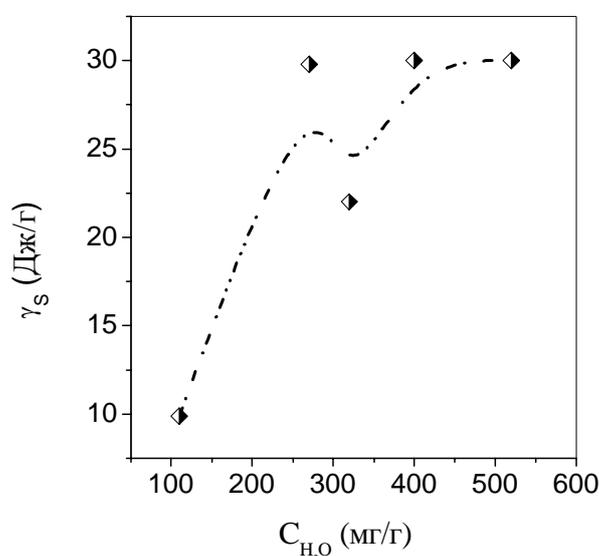


Рис. 3. Зависимость межфазной свободной энергии Гиббса в системе дрожжевые клетки/вода от концентрации внутриклеточной воды

Расчет распределения по размерам «пор» (т. е. карманов, образованных макро-молекулами и заполненных структурированной водой) в дрожжевых клетках, проведенный на основе использования уравнения Гиббса-Томпсона (11) и графика зависимости $C_{uw}(T)$ для клеток в воздушной среде и среде $CDCl_3$, показывает, какова структура пор, заполненных незамерзающей водой (рис. 4). Следует отметить, что расчет PSD_{uw} имеет смысл только при $R < 10-15$ нм, когда межфазная вода «чувствует» возмущающее действие поверхностных сил или функциональных групп макромолекул. При $C_{H_2O} \leq 400$ мг/г на воздухе вода заполняет относительно узкие поры с $R < 1$ нм; хотя в среде $CDCl_3$ значительная часть связанной воды смещается в пустоты с размером $R > 1$ нм. В случае максимальной гидратированности при $C_{H_2O} = 520$ мг/г (в обеих средах) присутствует максимальное содержание связанной воды в порах с радиусом $R > 1$ нм, хотя на воздухе относительная доля связанной воды, локализованной в узких порах, выше. При минимальной гидратированности поведение связанной воды несколько другое, поскольку содержание воды в узких порах изменяется меньше, чем в порах с радиусом $R = 1...3$ нм. Это предполагает возможность проникновения $CDCl_3$ в высушенные и увлажненные дрожжевые клетки и частичное заполнение хлороформом как узких ($R < 1$ нм), так и широких ($R > 1$ нм) пор. В результате в порах может образовываться смесь хлороформа с внутриклеточ-

точной водой, т.е. наблюдается увеличение межфазного смешивания воды и CDCl_3 . Это согласуется с уменьшением свободной энергии Гиббса адсорбированной воды и CCl_4 (табл. 1).

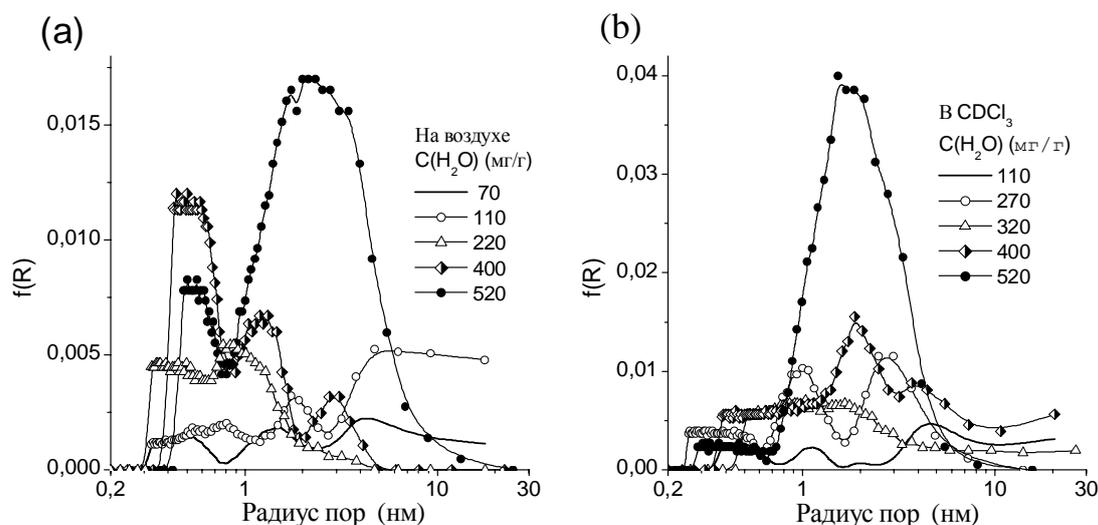


Рис. 4. Функция распределения пор, заполненных незамерзающей внутриклеточной водой, по размерам в дрожжевых клетках на воздухе (а); в среде хлороформа-*d* (b)

В табл. 1 приведены также характеристики воды, адсорбированной на поверхности частично модифицированных кремнезёмов, которые можно рассматривать как модель мозаичной поверхности с гидрофильными и гидрофобными участками.

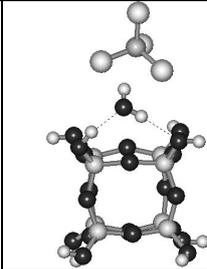
Малые кластеры воды, адсорбированные на такой поверхности, локализируются в зазоре между триметилсилильными (ТМС) группами, взаимодействуя как с остаточными силанольными группами, так и с ТМС-группами (рис. 5, 6). Расстояние между гидрофобными центрами уменьшается с ростом концентрации привитых групп, что может приводить к уменьшению размера кластеров воды, локализованных между ТМС-группами. Эта структура может рассматриваться как аналог той, которая существует в дрожжевых клетках (рис. 4). Поэтому некоторые общие закономерности, обнаруженные для столь разных материалов, как дрожжевые клетки и частично модифицированный кремнезём, можно объяснить сходством свойств ограниченных полостей, образованных структурными элементами клеток и мозаичной структурой гидрофобно/гидрофильных центров кремнезёма.

Квантово-химические расчеты ЯМР спектров молекул воды, локализованных между различными гидрофобными группами, показывают, что величина δ_{H} для атома водорода, не связанного водородными связями, находится между 0,8 и 1,6 м. д. (рис. 5, 6).

Атом водорода, участвующий в образовании водородной связи, характеризуется химическим сдвигом δ_{H} , лежащим между 3,0 и 5,6 м.д. Это значение δ_{H} согласуется с экспериментальной величиной химического сдвига и приведенной выше интерпретацией ^1H ЯМР спектров. Экспериментальные результаты и данные квантово-химических расчетов кластеров воды в газовой фазе с учетом эффектов растворителя (табл. 1) подтверждают указанные выше причины появления в спектрах ^1H ЯМР сигнала воды с $\delta_{\text{H}} = 1,1-1,7$ м. д. Заметим, что значительное уменьшение $\Delta\sigma_{\text{H,aniso}}$ по сравнению с молекулами, взаимодействующими с немодифицированной поверхностью, наблюдается для молекул воды, расположенных между ТМС группами (табл. 1). Это обусловлено уменьшением эффекта поляризации силилированной поверхности под влиянием адсорбированных молекул в противоположность влиянию CCl_4 , который уменьшает общий заряд

($q_{H_2O} = 0,044$ по сравнению с $q_{H_2O} = 0,061$) для молекул воды, адсорбированных между двумя ТМС группами. Такое изменение тензора анизотропии магнитного экранирования является дополнительным фактором появления сигнала необычной воды с химическим сдвигом $\delta_H = 1,1-1,7$ м. д.

Таблица 1. Изменение свободной энергии сольватации (кДж/моль), обусловленное формированием адсорбционных комплексов воды с молекулами CCl_4 на кластерах исходного и частично гидрофобизированного кремнезема в воде, четыреххлористом углероде и хлороформе (SM5.42R/6-31G(d)), а также величины $\delta_{H,iso}$ и $\Delta\sigma_{H,aniso}$, рассчитанные с учетом эффекта сольватации

Комплекс		$\Delta\Delta G_s$ (в воде)	$\Delta\Delta G_s$ (в CCl_4)	$\delta_{H,iso}$ (м.д.)	$\Delta\sigma_{H,aniso}$ (м.д.)
$H_2O*CCl_4*Si_8O_{12}(OH)_8$		-24,5	-40,4	2,17 0,72	22,02 22,42
$H_2O*Si_8O_{12}(OH)_6(OSi(CH_3)_3)_2$		-21,5	-28,9 в $CHCl_3$ -26,5	1,17 0,64	18,53 13,13

В малых кластерах воды (2- 6 молекул воды, отвечающих кластерам воды, адсорбированной в микропорах гидрофобных адсорбентов), по крайней мере половина атомов водорода не принимает участия в образовании водородных связей и находится в контакте с молекулами $CDCl_3$, или неполярными (слабо полярными) функциональными группами клеток, или гидрофобной поверхностью. В соответствии с *ab initio* расчетами химических сдвигов в газовой фазе (см. рис. 5, 6, а также ссылки [52, 105]) и предположением их корректности (используя линейную аппроксимацию $\delta_H = a + bq_H$, где a и b константы, а q_H заряд на атоме, определенный на основе *ab initio* расчетов величины δ_H для различных ассоциатов молекул воды [52, 105, 106]), в случае наличия эффектов растворителя величина δ_H «свободных» атомов водорода (в молекуле воды) может находиться между 0,5 и 2,5 м. д. в зависимости от полярности окружающей среды, числа молекул воды в кластере и их участия в водородных связях.

Отметим, что свободная энергия сольватации кластера воды в хлороформе растет с увеличением его размера. Следовательно, имеется две тенденции при взаимодействии воды с клеточными структурами или поверхностью частично триметилсилилированного кремнезема в среде хлороформа. Первая – это образование все больших и больших кластеров воды или микродоменов ($\delta_H = 4...5$ м.д.) с увеличением степени гидратированности клеток (сравн. интенсивности сигналов при 4-5 и 1,1-1,7 м. д. на рис. 2) или кремнезёмов. Вторая – диспергирование воды в форме небольших кластеров (с незначительным числом водородных связей), димеров и одиночных молекул ($\delta_H = 1,1...1,7$ м. д.) в клеточной (или SM1-3/хлороформ-d) среде. При этом диспергированность воды повышается с уменьшением степени гидратации, поскольку сигнал при 4-5 м. д. становится меньше, чем при $\delta_H = 1,1...1,7$ м. д. (рис. 2). Кроме того, часть необычной воды может

соответствовать внеструктурной воде (например, молекулы локализованы внутри гексагональных и других структур обычной воды). Первая тенденция становится доминирующей при высокой гидратированности клеток, особенно в воздушной среде, когда сигнал с $\delta_{\text{H}} = 2$ м. д. (слабо ассоциированной воды) наблюдается только при минимальной гидратированности клеток ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 70$ мг/г) (рис. 1 и 2).

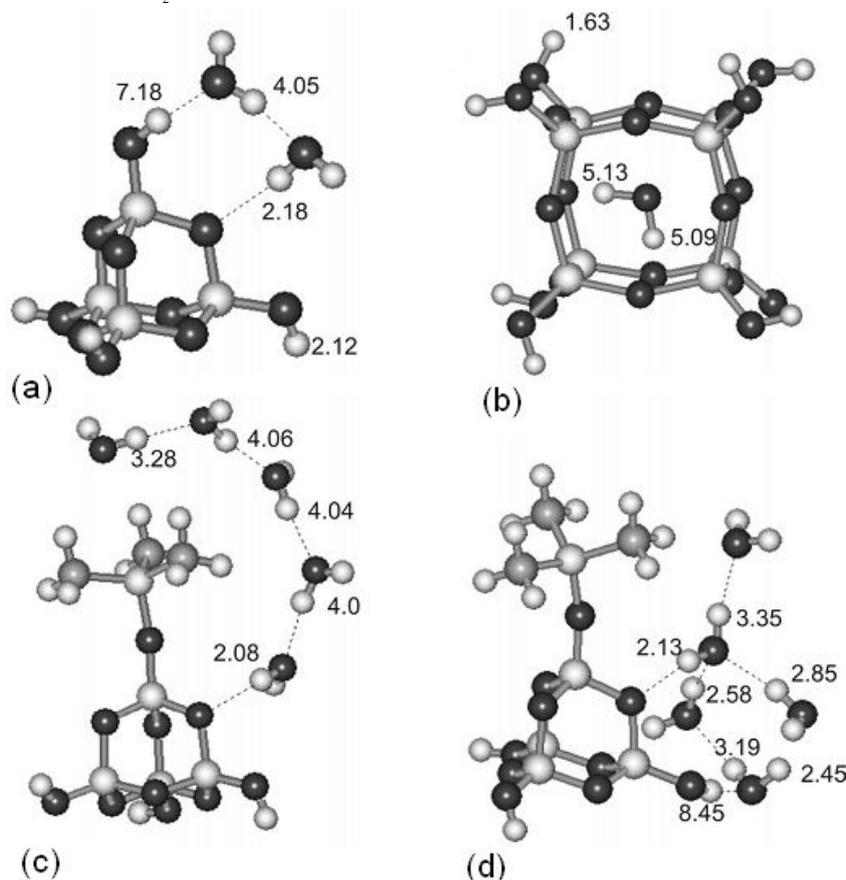


Рис. 5. Химический сдвиг $\delta_{\text{H,iso}}$ для адсорбированных молекул воды и протонов силанольных групп, рассчитанный методом GIAO с базисами BLYP3/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p); первый из указанных базисов использовался для расчета ЯМР спектров, а второй - для оптимизации геометрии.

Следовательно, хлороформ или неполярные (слабо полярные) функциональные группы вызывают разрушение водных наноклапель до небольших кластеров или индивидуальных молекул (замерзающих при более низкой температуре, чем микрокапельки воды, которые меньше возмущены взаимодействием с функциональными группами поверхности) и формирование межфазной эмульсии. Это сопровождается появлением в ^1H ЯМР спектрах сигнала воды с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 1,1 \dots 1,7$ м. д., обусловленным молекулами слабо ассоциированной воды.

Таким образом, значительная часть внутриклеточной воды в частично дегидратированных клетках может находиться в слабо ассоциированном состоянии, которое возможно в ограниченной области концентрации внутриклеточной воды. С понижением температуры обычная вода частично замерзает, в то время как слабо ассоциированная вода остается в подвижном состоянии вплоть до 200 К.

3.2. Костная ткань

Костная ткань является одной из наиболее слабо гидратированных тканей в организме. Массовая доля воды, которая преимущественно входит в состав клеточных

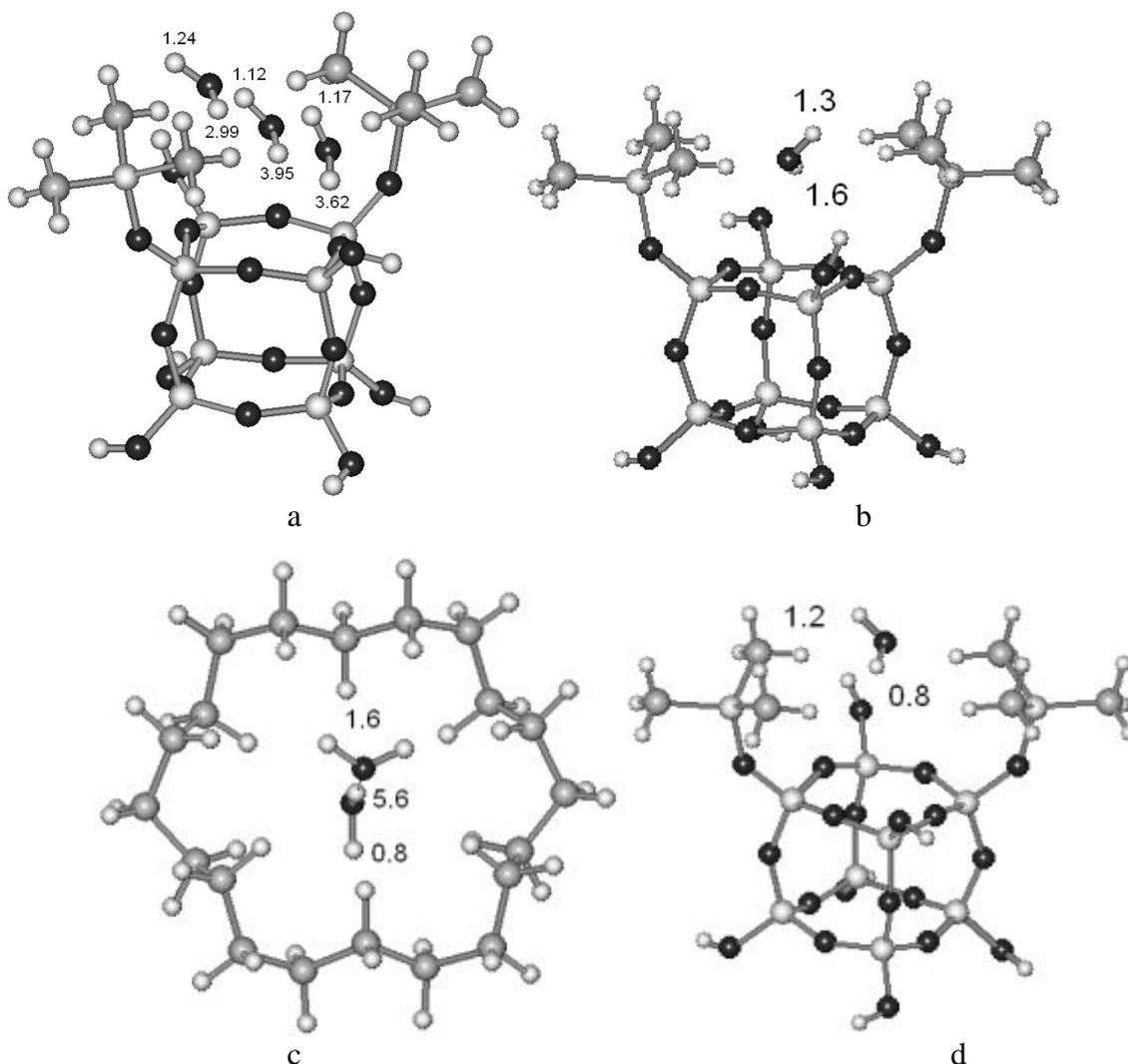


Рис. 6. Химический сдвиг δ_{H} (м. д.) в молекулах воды, локализованных между (*a*, *b*, *c*) двумя триметилсилильными группами на кластере кремнезема (B3LYP/6-31G(d,p)//HF/6-31G(d,p)) и (*d*) неполярной молекуле $\text{C}_{20}\text{H}_{40}$ (B3LYP/6-31G(d,p)//HF/3-21G)

структур и гидратных оболочек биомакромолекул (преимущественно коллагена), в ней составляет не более 50 %. Следовательно, костная ткань может содержать необычную воду при $\delta_{\text{H}} = 1,1-1,7$ м. д. Поскольку эта ткань сильно гетерогенна, для получения усредненных характеристик связанной воды исследовали одновременно несколько хвостовых костей крыс (три кости помещались в измерительную ЯМР ампулу). Такое усреднение повышало достоверность полученных результатов. На рис. 7 показаны ^1H ЯМР спектры воды в образце кости (150 мг) на воздухе (*a*) и в среде дейтерохлороформа (*b*) при различных температурах. Как видно, спектр состоит из двух сигналов, один из которых (сигнал 1) имеет химический сдвиг $\delta_{\text{H}} = 5$ м. д. (обычная ВВП), а второй - $\delta_{\text{H}} = 1,4$ м. д. – слабо ассоциированная вода. Интенсивность сигнала 1 уменьшается с понижением температуры в диапазоне $250 < T < 271$ К благодаря частичному замерзанию связанной воды, в то время как сигнал 2 остается практически без изменения. Замерзание воды, ответственной за сигнал 2, происходит только при $T < 250$ К. Замена воздушной среды на среду хлороформа (рис. 7, *b*) приводит к значительному уменьшению ширины сигналов, в то время как температурное поведение их интенсивности остается таким же, как и на

воздухе. Сигнал 1 (рис. 7) аналогичен описанному выше сигналу воды, структурированной сеткой водородных связей, аналогичной таковой в жидкой воде. Сигнал 2 отвечает слабо ассоциированной воде, такой же, как в дрожжевых клетках, влажных порошках частично триметилсилилированного кремнезема. Слабо ассоциированная вода замерзает при температуре значительно ниже, чем та, которая ответственна за сигнал 1. При прогреве костной ткани до 380 К в течение 1 ч обычная вода удаляется первой. Следовательно, слабо ассоциированная вода имеет все признаки сильносвязанной воды. Этот парадокс обусловлен высокой термодинамической стабильностью системы, содержащей гидрофобные и гидрофильные фрагменты биомолекулярных структур, разделяющих малые кластеры слабо ассоциированной воды. Увеличение содержания воды влечет за собой повышение вклада от ВВП [11, 16] вследствие того, что эти кластеры агрегируются в большие структуры. Следует отметить, что необходимым условием появления слабо ассоциированной воды на поверхности модифицированных кремнезёмов, является присутствие слабо полярной среды (хлороформа). Хотя хлороформ не проникает в глубину костной ткани, он уменьшает магнитную анизотропию гетерогенной системы. Необычная вода с химическим сдвигом $\delta_H = 1,1 \dots 1,7$ м. д. представляет собой значительную часть внутриклеточной воды в слабо гидратированных клетках.

3.3. Дегидратированная мышечная ткань

Небольшое количество слабо ассоциированной воды может быть обнаружено и в частично дегидратированной мышечной ткани. На рис. 8 показаны ^1H ЯМР спектры воды в частично дегидратированной мышечной ткани курицы (после удаления 80 % воды, находящейся в ткани, путем высушивания при 330 К на воздухе). Спектр воды состоит из двух сигналов с химическим сдвигом $\delta_H = 4,6-5,1$ м. д. (сигнал 1, который благодаря несимметричности формы пика может быть разделен на два сигнала с химическими сдвигами δ_H 4,63 и 5,05 м.д.) и $\delta_H = 1,1-1,7$ м. д. (сигнал 2). Интенсивность сигнала 2 намного меньше, чем сигнала 1. Этот результат согласуется с данными, полученными для дрожжевых клеток. В случае их частичной дегидратации в спектрах присутствуют два аналогичных сигнала. Интенсивность второго сигнала слабая вследствие того, что воды в ткани достаточно для формирования относительно больших микродоменов, что влечет за собой появление интенсивного сигнала 1. Разложение сигнала 1 на два сигнала показывает наличие воды, близкой по свойствам к объемной воде при $\delta_H = 4,63$ м. д. Его химический сдвиг совпадает с химическим сдвигом жидкой воды при температуре измерения (рис. 8). Более широкий сигнал при $\delta_H = 5,05$ м. д. может быть связан с сильно ассоциированной водой, взаимодействующей с полярными и заряженными внутриклеточными функциональными группами, обладающими хаотропным или космотропным эффектом, и с малыми ионами (например, Cl^- , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , и др.), которые вызывают уширение пика. Анионы, дотируя электронную плотность, могут вызывать уменьшение экранирования протонов молекул воды окружения [52, 106].

3.4. Самоорганизация воды в гидратированном альбумине

Сывороточный альбумин человека (САЧ) является одним из основных и наиболее изученных белков плазмы крови [107-111]. В водной среде молекулы альбумина имеют форму деформированного сфероида, размеры которого зависят от рН среды. Пространство глобулы, не занятое полипептидными цепями и боковыми группами, заполнено водой. Благодаря близости к функциональным группам белковой молекулы, практически вся вода внутри глобулы испытывает их возмущающее влияние и, следовательно, является связанной, что находит отражение в снижении температуры замерзания этой воды. В зависимости от гидрофильно-гидрофобных свойств участков белковой молекулы, молекулы воды могут находиться в гидрофобном или гидрофильном окружении. Вопросы

гидратации белков подробно рассмотрены в работах [112-115]. Влияние гидрофобных фрагментов на связанную воду может проявляться в необычных свойствах системы. Так, на зависимости плотности раствора альбумина от его концентрации в области малого содержания белка регистрируется минимум плотности, который связывают с гидрофобным эффектом [116].

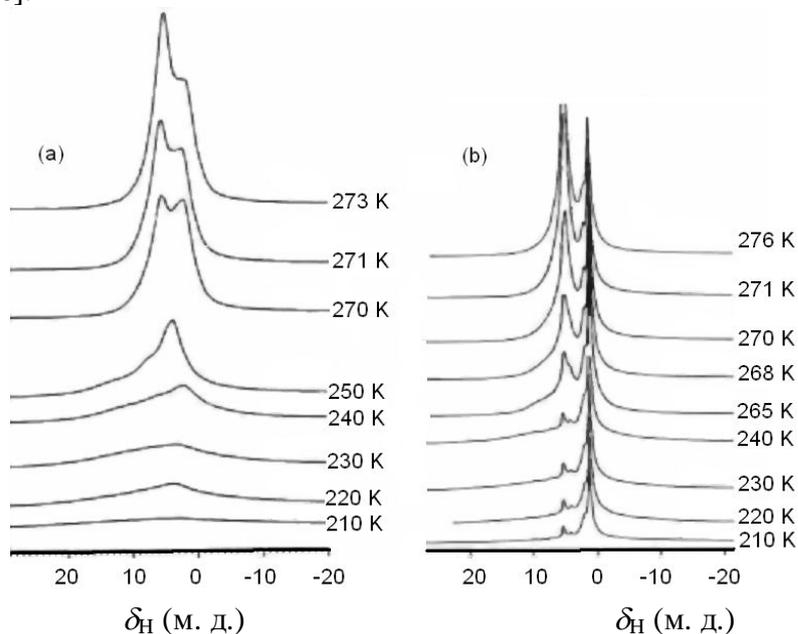


Рис. 7. ^1H ЯМР спектры воды в частично гидратированных костях при различной температуре на воздухе (a) и в среде CDCl_3 (b)

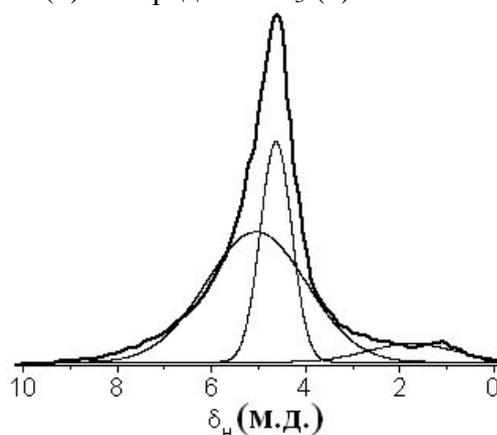


Рис. 8. Разложение ^1H ЯМР спектра воды в частично дегидратированной мышечной ткани (на воздухе) (пик при $\delta_{\text{H}} = 1,76$ м. д. (интенсивность 7,4%), 4,63 м. д. (34,5%), и 5,05 м. д. (58,1%) при комнатной температуре

Можно ожидать, что слабополярные органические растворители могут сильно влиять на воду, связанную в САЧ [117, 118]. В результате лиофильной сушки белка его конформация практически не меняется [119], однако добавки слабополярных молекул могут приводить к изменению соотношения объемов внутренних полостей белковой глобулы, гидратированных по механизмам гидрофобной и гидрофильной гидратации.

На рис. 9 приведены спектры ^1H ЯМР воды, связанной с САЧ при массовых долях дейтерохлороформа в диапазоне 0–46% при разных температурах. Концентрация воды для всех образцов была постоянной и равной $C_{\text{H}_2\text{O}} = 193$ мг/г. В отсутствие хлороформа спектры представляют собой синглет, ширина которого с понижением температуры увеличивается от 1 до 20 кГц, а величина химического сдвига в точке максималь-

ной интенсивности близка к 5 м. д. (сигнал 1), что совпадает с химическим сдвигом объемной воды. Большая ширина сигнала адсорбированной воды обусловлена малой молекулярной подвижностью воды, связанной с молекулами САЧ [59]. При добавлении хлороформа на фоне широкого сигнала начинает проявляться более узкий сигнал с химическим сдвигом $\delta_H = 1,3$ м. д. (сигнал 2). Его интенсивность увеличивается с ростом концентрации хлороформа (C_{CDCl_3}). С понижением температуры интенсивность сигнала 2 остается постоянной в широком температурном диапазоне.

Если величина C_{CDCl_3} достаточна для выделения хлороформа в отдельную фазу (рис. 10) (массовая доля в суспензии 80 %) интенсивность сигнала 1 при $T < 275$ К становится заметно ниже, чем при такой же температуре в порошках (рис. 9), а интенсивности сигналов 1 и 2 становятся близкими по величине. Спектральные характеристики сигнала 2 практически не зависят от температуры. Как видно из рис. 10, сигнал 2 наблюдается даже в том случае, когда замерзает основная часть жидкого хлороформа.

Данные рис. 9, 10 могут быть интерпретированы следующим образом: сигнал 1 относится к воде, входящей в состав полиассоциатов с сеткой водородных связей, аналогичной сетке водородных связей в объемной воде, а сигнал 2 соответствует молекулам воды, находящимся в слабо ассоциированном состоянии. Ранее слабо ассоциированные формы воды на межфазной границе гидратированных твердых тел с гидрофобной средой регистрировались для смесей пирогенного кремнезема с гидрофобным кремнеземом [95] и триметилсилилированных кремнезёмов, в которых степень замещения поверхностных гидроксильных групп на триметилсилильные не превышала 50 % [90].

На рис. 11 приведены температурные зависимости концентрации незамерзающей воды (рис. 11, а) и рассчитанные на их основе зависимости $\Delta G(C_{uw})$ для гидратированных порошков САЧ с разным содержанием хлороформа и 20 % суспензии САЧ в хлороформе (рис. 11, в). В области $\Delta G < -1$ кДж/моль, на зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ для порошков САЧ наблюдаются вертикальные участки, которые обусловлены незамерзающей водой при $T > 250$ К (рис. 11, а). В соответствии с критериями сильносвязанной и слабосвязанной воды, приведенными выше, гидратированные порошки САЧ содержат только сильносвязанную воду. В среде хлороформа наблюдается резкое уменьшение концентрации связанной воды при $T > 220$ К и переход части сильносвязанной воды в слабосвязанную (которая замерзает вблизи 273 К). На рис. 11, б, г приведены аналогичные результаты для САЧ, адсорбированного на поверхности ВДК А-300. Как видно из рисунка, в этом случае превращение части сильносвязанной воды в слабосвязанную в среде хлороформа не наблюдается.

Можно предположить, что в гидратированных молекулах САЧ слабо ассоциированная вода находится в структурных полостях, ограниченных гидрофобными группами. Благодаря структурным ограничениям или особенностям межмолекулярных взаимодействий в этих полостях, молекулам воды термодинамически выгоднее существовать в слабо ассоциированном состоянии.

Следует отметить, что химический сдвиг слабо ассоциированной воды совпадает с химическим сдвигом воды, растворенной в хлороформе [52]. Однако растворимость воды в хлороформе не превышает 0,6 % при комнатной температуре и быстро уменьшается с понижением температуры. Концентрация слабо ассоциированной воды на рис. 10 в пересчете на жидкий хлороформ составляет 1,7 %, что на порядок больше предельной концентрации растворенной воды при $T = 190$ К. Учитывая, что основная часть хлороформа при такой температуре замерзает, следует заключить, что концентрация слабо ассоциированной воды в хлороформе, не замерзшем из-за взаимодействия с молекулами САЧ, должна была бы достигать нескольких десятков процентов.

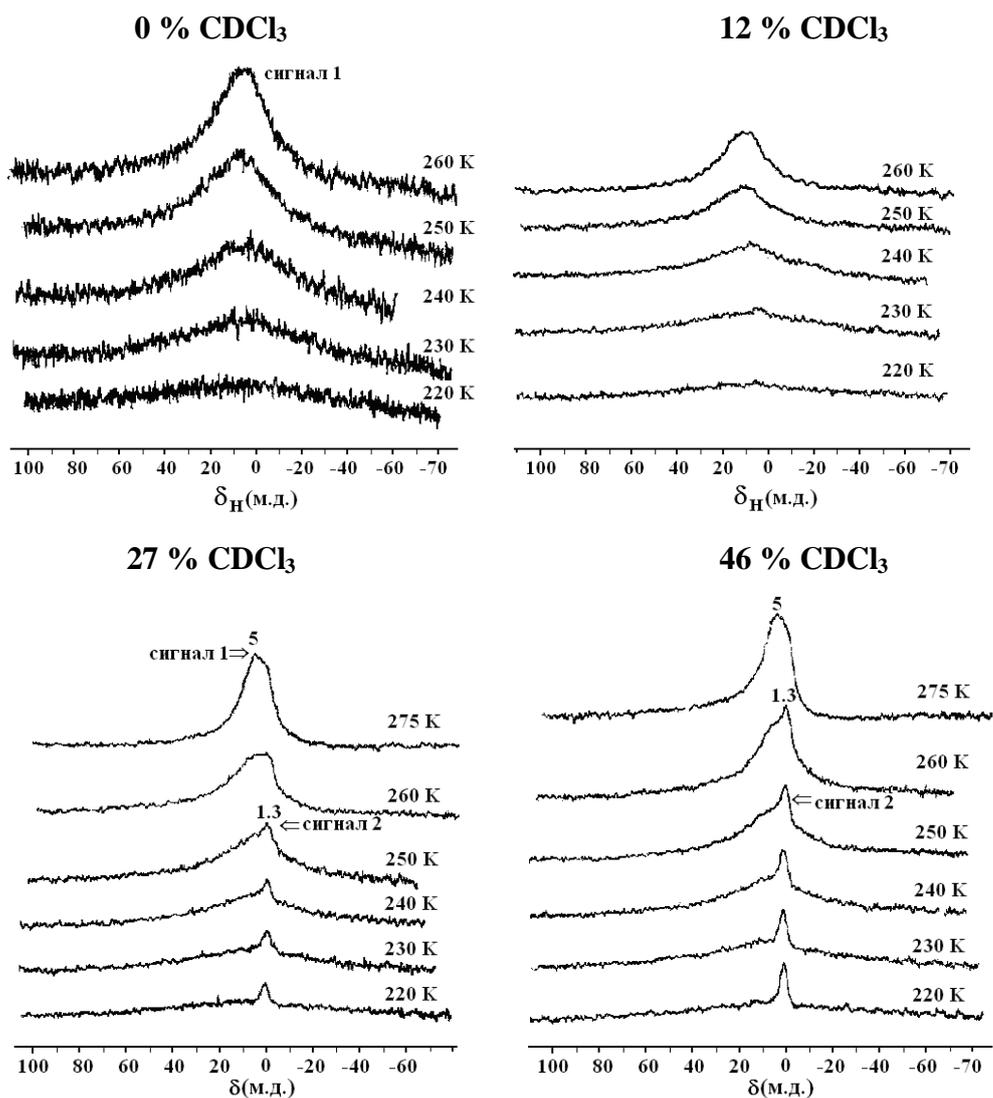


Рис. 9. Влияние добавок хлороформа на форму спектров ^1H ЯМР воды, связанной с альбумином ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 193$ мг/г)

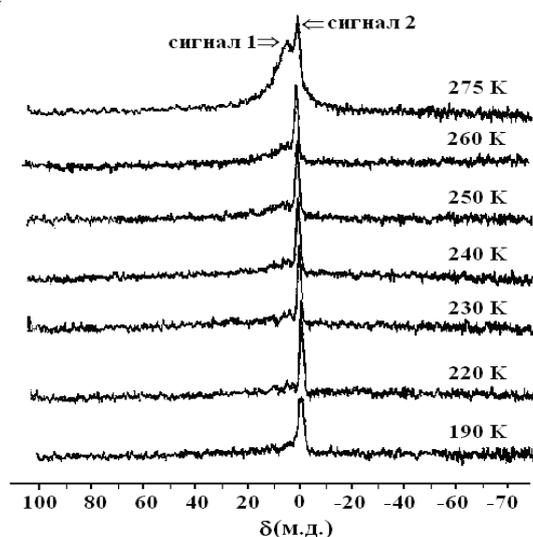


Рис. 10. Температурные изменения спектров ^1H ЯМР воды ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 193$ мг/г), адсорбированной на САЧ при массовой доле $C_{\text{CDCl}_3} = 80\%$

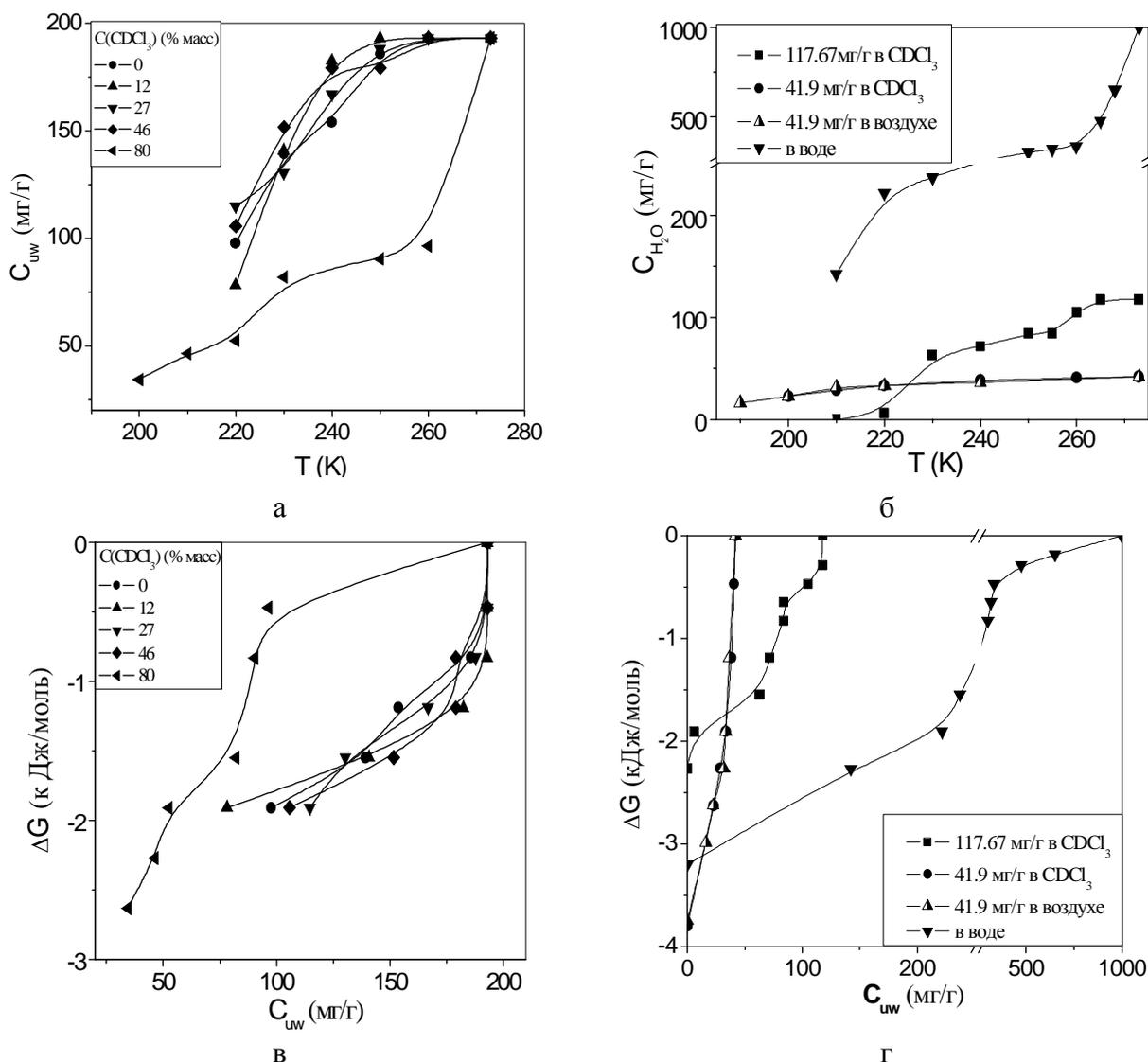


Рис. 11. Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды и зависимости свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды в системе САЧ/вода/хлороформ [а, в] и (САЧ-ВДК)/вода/хлороформ [б, г] ($C_{H_2O} = 193$ мг/г) при разном количестве $CDCl_3$.

В процессе лиофильной сушки большинство молекул САЧ сохраняют свою нативную глобулярную структуру, в которой с воздухом граничат преимущественно гидрофильные участки, легко адсорбирующие воду и формирующие гидратную оболочку белковых молекул в воздушной и водной средах. При добавлении хлороформа его молекулы сосредотачиваются преимущественно на не связанных с водой гидрофобных участках (или в гидрофобных полостях). В порошках гидрофобная и гидрофильная составляющие пространственно разделены и до определенной величины C_{CDCl_3} присутствие хлороформа слабо влияет на гидратные свойства белковых молекул. Скачкообразное изменение характеристик воды, связанной с САЧ, при переходе от порошков к суспензии (рис. 11, а, в), вероятно, обусловлено таким изменением конформации белковых молекул, которое обеспечивает минимум свободной энергии системы при переходе от воздушной среды к слабо полярной среде $CDCl_3$. При этом более доступными для внешней среды $CDCl_3$ становятся гидрофобные области молекул САЧ, в то время как гидрофильные центры изменяют свое пространственное расположение таким образом, чтобы

обеспечивалась их минимальная свободная энергия в неполярной среде. Этот процесс сопровождается общим уменьшением гидратированности молекул САЧ (рис. 11, а, в) и, вероятно, формированием дополнительных внутримолекулярных водородных связей между функциональными группами САЧ. Для САЧ, адсорбированного на поверхности высокодисперсного кремнезема (рис. 11, б, г), подобный эффект не наблюдается, что, вероятно, обусловлено слабой конформационной лабильностью адсорбированного альбумина.

В соответствии с данными рис. 10 при $T < 240$ К в спектрах ^1H ЯМР воды для суспензии САЧ в CDCl_3 наблюдается только сигнал 2. Концентрация связанной воды, ответственной за этот сигнал, составляет 80 мг/г (рис. 11, а). Поскольку молекулы хлороформа хорошо сольватируют гидрофобные группы молекул САЧ (дисперсионное взаимодействие), которые ответственны за гидрофобную гидратацию САЧ, то, по-видимому, в гидрофобных полостях молекул САЧ присутствуют как молекулы воды, так и хлороформа. Учитывая большое количество слабо ассоциированной воды, можно ожидать, что вода и хлороформ внутри гидрофобных областей белковой глобулы способны образовывать сильно структурированную смесь. Поэтому свойства воды, участвующей в гидрофобной гидратации в присутствии хлороформа, сильно отличаются от свойств воды, структурированной сеткой водородных связей.

На рис. 12 приведены распределения концентрации незамерзающей воды по радиусам пор (внутренних полостей, заполненных незамерзающей водой) для гидратированных порошков САЧ в присутствии CDCl_3 . В исходном порошке САЧ на зависимости $\text{PSD}_{\text{uw}}(R)$ регистрируются два максимума. Один отвечает радиусу пор $R = 0,35$ нм, а второй – $R = 1$ нм. С ростом концентрации хлороформа первый из этих максимумов увеличивается и несколько сдвигается в область больших значений R . В среде хлороформа происходит скачкообразное изменение формы кривой распределения. Интенсивность максимума при $R = 0,35$ нм уменьшается в несколько раз, и появляются новые максимумы при $R = 0,8$ нм и $R = 8$ нм. Вероятно, в том случае, когда альбумин находится в виде гидратированного порошка и при относительно небольших добавках слабо полярного растворителя, основная часть воды находится в микрополостях с радиусом $R = 0,35$ нм, образованных гидрофильными участками белковой молекулы, с которыми молекулы воды могут образовывать прочные водородные связи. Под влиянием хлороформа размер этих полостей несколько увеличивается. По-видимому, это вызвано конформационными изменениями белковой молекулы, стабилизирующими рост объема гидрофобных областей, в которых вода находится в слабо ассоциированном состоянии и проявляется в спектрах ^1H ЯМР в виде сигнала 2.

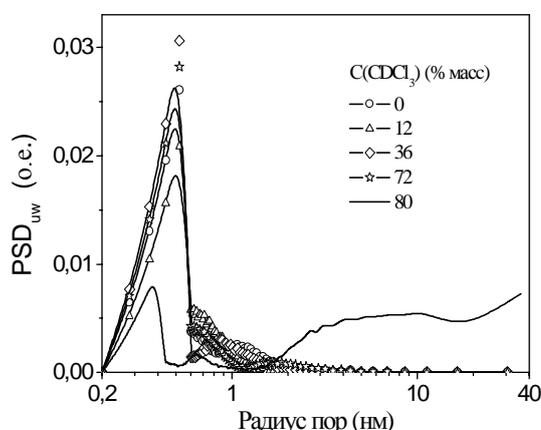


Рис. 12. Зависимость распределения по размерам полостей, заполненных незамерзающей водой, от содержания хлороформа в гидратированных порошках САЧ и его суспензии.

В случае, когда хлороформ образует непрерывную фазу, происходит такое изменение конформации молекул белка, при которой вода удаляется из узких гидрофильных областей во вновь образовавшиеся полости большего размера, но с меньшим количеством гидрофильных центров. Такая вода становится слабосвязанной, поскольку уменьшается ее взаимодействие с границей раздела фаз, но остается сильно ассоциированной, так как формирует сетку водородных связей с другими молекулами воды. Часть воды остается в гидрофобных областях с радиусом $R = 0,35$ нм и, следовательно, остается сильно связанной (испытывает сильное возмущающее действие со стороны поверхности), но слабо ассоциированной (имеет химический сдвиг $\delta_H = 1,4$ м.д.). Такое особое состояние воды стабилизируется средой слабо полярного дейтерохлаороформа. Вероятно, необходимым условием для перехода воды в слабо ассоциированное состояние является наличие на поверхности или в окружающем пространстве достаточного числа гидрофобных участков, взаимодействующих с молекулами воды в основном по дисперсионному механизму, и пространственных ограничений, препятствующих формированию трехмерной сетки водородных связей. Адсорбция на поверхности кремнезема резко уменьшает конформационную лабильность молекул САЧ, а, следовательно, и объем внутренних полостей, в которых возможна гидрофобная гидратация белковой молекулы в слабо полярной среде.

3.5. Проросшая пшеница

Растения ведут циклический образ жизни, который состоит из активной и пассивной фаз. Пассивная фаза отвечает состоянию анабиоза, в котором жизненные функции сильно замедлены или практически полностью остановлены, что обычно обусловлено отсутствием условий внешней среды, пригодных для нормального функционирования. Многие семена растений способны оставаться в пассивной фазе годами и даже десятилетиями, сохраняя при этом способность к прорастанию. При благоприятных условиях процесс прорастания семян может происходить достаточно быстро – в течение нескольких дней. Основными факторами, влияющими на активизацию семян, являются высокая влажность и подходящий температурный режим. Однако, присутствие в воде, используемой для проращивания семян, небольшого количества минеральных веществ, может, в некоторых случаях, существенно влиять на всхожесть семян и другие параметры прорастания, ускоряя или замедляя переход из пассивной в активную фазу. При этом значительный интерес представляет изучение влияния минеральных добавок на изменение структуры воды в семенах на ранних стадиях прорастания.

В табл. 2 приведены параметры прорастания семян в водной среде и в воде с добавкой ВДК (массовая доля 1 %). Из этих данных следует, что кремнезем существенно замедляет процесс развития ростков, хотя практически не сказывается на всхожести семян.

На рис. 13 показаны спектры ^1H ЯМР воды в исходных семенах и семенах, которые проращивали в течение 24 и 48 ч, при разных температурах. В спектрах воды, находящейся внутри сухих семян (влажность 17 %), при $T > 260$ К регистрируются два сигнала: более интенсивный (сигнал 2) с химическим сдвигом $\delta = 1,4$ м. д. и менее интенсивный (сигнал 1) с химическим сдвигом $\delta = 5$ м. д. С понижением температуры ниже 273 К интенсивность сигнала 1 быстро уменьшается и в спектрах регистрируется только сигнал 2. В соответствии с принципами, изложенными выше, сигнал 1 относится к сильно ассоциированной воде, микроструктура которой аналогична структуре жидкой воды. Химический сдвиг сигнала 2 совпадает с химическим сдвигом воды в газовой фазе или растворенной в слабо полярных органических растворителях. Этот тип воды отвечает признакам слабо ассоциированной воды. Такая вода полностью не замерзает, даже при охлаждении образца до $T = 220$ К. После проращивания семян относительная интен-

сивность сигнала 2 резко уменьшается, хотя он продолжает регистрироваться в спектрах во всем диапазоне изменения температуры. В случае проращивания семян в 1 %-ной суспензии ВДК (рис. 14) вид спектров аналогичен приведенным на рис. 13, однако тенденция уменьшения интенсивности сигнала 2 в процессе проращивания выражена несколько слабее.

Таблица 2. Параметры прорастания пшеницы

Измеряемый параметр	семена + H ₂ O	семена + H ₂ O + 1% SiO ₂	% к контролю
коэффициент прорастания семян, %	72	79	+7
всхожесть, %	73	79	+6
Длина ростков, см	9,8	8	-20
Сырая масса надземной части, г	0,9	0,5	-44,4
Сырая масса корней, г	0,4	0,23	-42,5

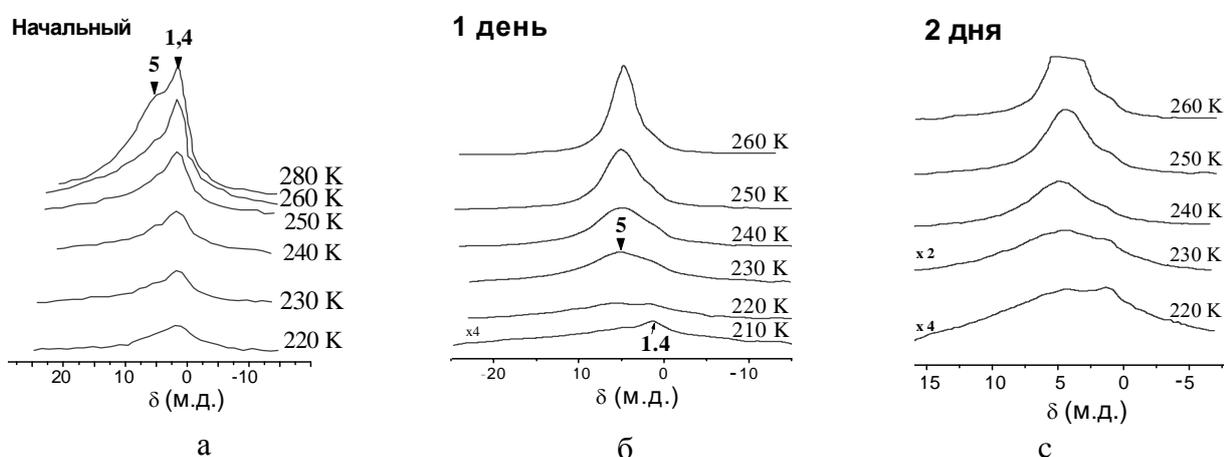


Рис. 13. Температурные зависимости формы спектров ¹H ЯМР воды в семенах пшеницы, проращенных в чистой воде при разном времени проращивания: *а* – 0 ч; *б* – 24 ч; *в* – 48 ч.

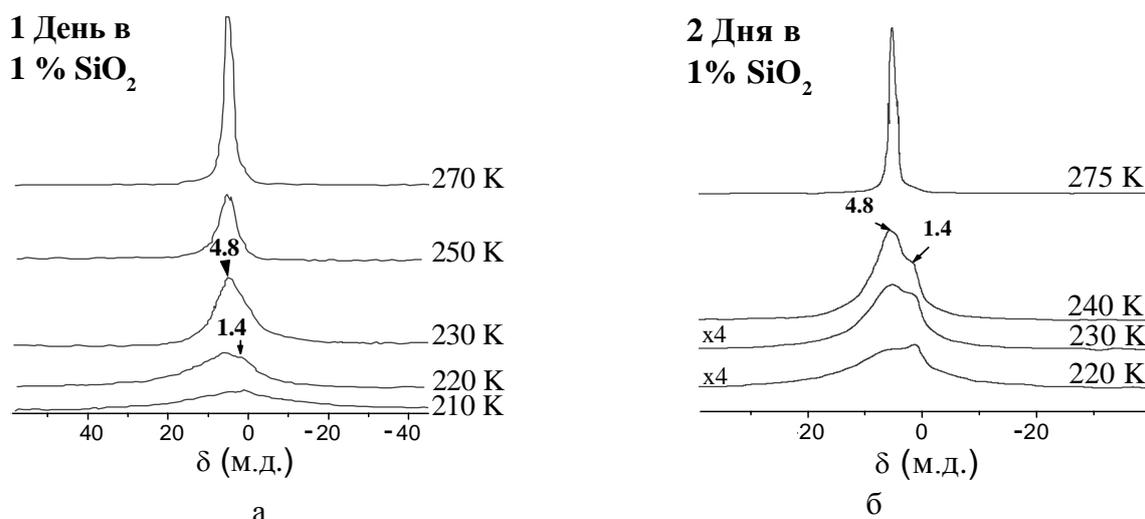


Рис. 14. Температурные зависимости формы спектров ¹H ЯМР воды в семенах пшеницы проращенных в воде, содержащей 1 % ВДК при разном времени проращивания: *а* – 24 ч; *б* – 48 ч

Характеристики слоев связанной воды в семенах пшеницы, пророщенных в водной среде и в воде с добавкой ВДК, приведены в табл. 3. На рис. 15 представлены распределения по размерам внутренних полостей в процессе прорастания пшеницы, рассчитанные в соответствии с формулой (11). В исходных зернах вода заполняет полости, имеющие размеры 0,3, 0,8 и 1,9 нм, причем объемы этих полостей отличаются незначительно. После 24 ч проращивания объем полостей с радиусом 0,3 нм возрастает в несколько раз, а затем (после 48 ч проращивания) их размер увеличивается до 0,5 нм. Одновременно увеличивается объем полостей с размерами 0,8 и 1,9 нм. Кроме того, вода заполняет полости с радиусом больше 10 нм.

Из табл. 3 следует, что при проращивании семян пшеницы увеличивается как концентрация сильносвязанной, так и слабосвязанной воды. Поглощение воды зернами, проращиваемыми в чистой воде, идет в полтора раза быстрее, чем в присутствии ВДК. Следовательно, кремнезем существенно замедляет активизацию семян в процессе их проращивания. Различия проявляются также в величине ΔG^s . После двух дней проращивания в присутствии кремнезема эта величина совпадает с таковой для исходных семян. Поскольку максимальная величина изменения свободной энергии в слое сильносвязанной воды характеризует энергию взаимодействия с поверхностью первого, граничащего с ней монослоя воды [50], можно предположить, что в присутствии кремнезема возрастает энергия взаимодействия воды с межфазной границей биоструктур. В процессе проращивания семян величина γ_s возрастает за счет увеличения общего количества воды в семенах, однако межфазная энергия, отнесенная к единице массы связанной воды (γ_s/c_{uw}^{max}), уменьшается, что отражает опережающий рост концентрации слабосвязанной воды.

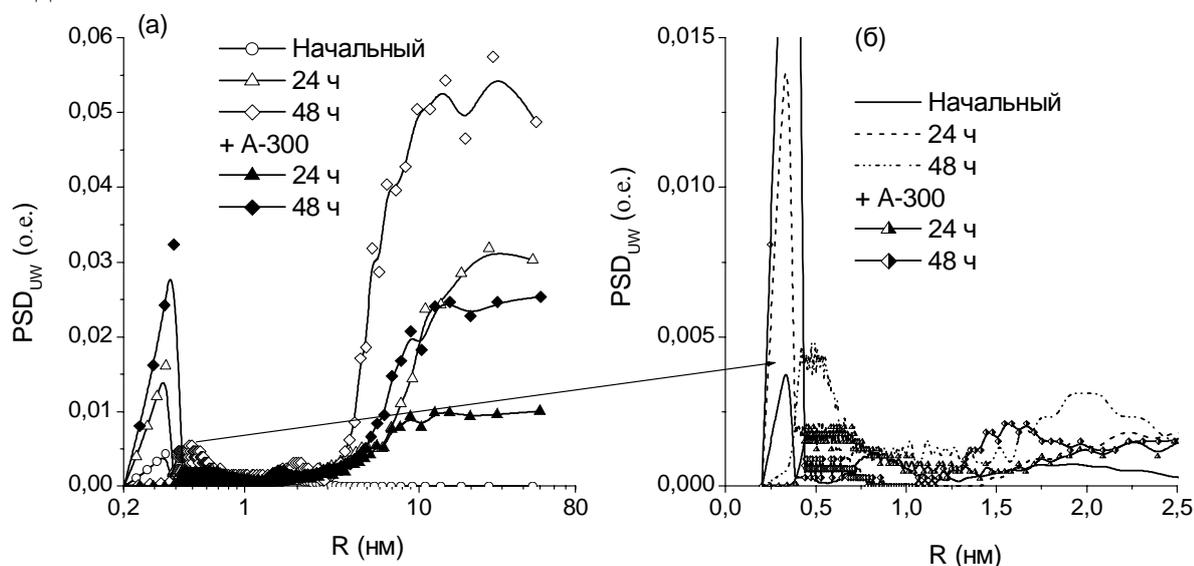


Рис. 15. Распределение по размерам внутренних пустот в семенах пшеницы при разном времени проращивания, построенные на основе зависимостей $\Delta G(C_{uw})$ в ЯМР экспериментах с послойным вымораживанием жидкой фазы

Следует отметить, что полученные характеристики воды в семенах являются брутто-параметрами, отнесение которых к отдельным частям растения затруднительно. Однако, поскольку уже после первых суток проращивания визуально наблюдается появление ростка, значительную часть слабосвязанной воды и формирование внутренних полостей с радиусом более 10 нм можно отнести именно к ростковой части семян. С другой стороны, наблюдаемая в непророщенных семенах слабо ассоциированная вода, вероятно, находится в полостях с радиусом менее 1 нм (рис. 15). Формирование упорядоченной сетки водородных связей в нанополостях затруднительно, благодаря чему значи-

тельная часть воды находится в виде индивидуальных молекул или малых кластеров. Увеличение размеров внутренних полостей, заполненных структурированной водой, после 48 часов проращивания способствует переходу значительной части воды из слабо ассоциированного в сильно ассоциированное состояние.

Таблица 3. Характеристики межфазной воды в проросшей пшенице

Образец	Дни прорастания	ΔG^s , кДж/моль	ΔG^w , кДж/моль	C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	γ_s , Дж/г	γ_s/C_{uw}^{\max} , Дж/г
Проращивание в воде	0	-3,5	-	72	0	7.4	0.10
	1	-3,5	0,25	190	230	28	0.07
	2	-3	0,25	320	560	38	0.04
в воде + 1% SiO ₂	1	-2,5	0,5	150	130	15	0.05
	2	-3,5	0,25	220	230	26	0.057

Влияние ВДК на скорость прорастания семян может быть обусловлено тремя основными факторами: (i) увеличением вязкости среды прорастания, что замедляет диффузию воды внутрь семян; (ii) взаимодействием наноразмерных частиц ВДК с ростовой почкой и таким изменением микроструктуры воды в зоне контакта, которое тормозит переход от пассивной к активной фазе развития растения; (iii) частичным растворением кремнезема в водной среде и ингибирующим влиянием на скорость прорастания растворенной кремниевой кислоты.

Первый из перечисленных факторов представляется малоэффективным, поскольку вязкость суспензий ВДК существенно превосходит вязкость чистой воды только при массовой доле кремнезема, большей 4 %. В ряде работ [120, 121] показано, что небольшие концентрации (до 0,1 %) кремнезема способны стимулировать жизнедеятельность большинства клеточных культур, причем это наблюдается и для суспензий А-300, насыщающих водную фракцию кремниевой кислотой. Поэтому наиболее вероятным представляется вклад второго фактора, хотя для доказательства прямого влияния частиц кремнезема на скорость развития ростовой почки требуются специальные исследования.

Таким образом, большая часть воды в непророщенных семенах пшеницы находится в слабо ассоциированном состоянии, в котором молекулы воды практически не участвуют в образовании сильных водородных связей. Вероятно, это обусловлено тем, что внутренние пустоты, в которых находится вода, имеют радиус, сравнимый с размерами молекул воды. Внутрисеменная вода в то же время является сильносвязанной, так как ее свободная энергия Гиббса сильно отличается от свободной энергии объемной воды. В процессе прорастания семян и увеличении концентрации воды она становится сильно ассоциированной, и вода, поглощенная семенами, в равной мере относится к сильно- и слабосвязанной воде. Присутствие кремнезема заметно уменьшает скорость прорастания семян, предположительно за счет взаимодействия частиц кремнезема с ростовыми почками.

4. Заключение

Связанная вода на гидрофобно/гидрофильной межфазной границе может существовать в виде нескольких структурных типов, различающихся по энергии взаимодействия с твердой поверхностью или макромолекулами (сильносвязанная или слабосвязанная) и по степени участия в образовании Н-связей с другими молекулами (сильно ассоциированная и слабо ассоциированная). Эти типы воды могут быть проанализированы в терминах воды высокой (ВВП) и низкой (ВНП) плотности или деформированной (кол-

лапсированная структура, КС) и нативной (расширенная структура, РС) структуры водородных связей. Молекулярная подвижность слабо ассоциированной воды с химическим сдвигом $\delta_H = 1,1-1,7$ м. д. меньше зависит от температуры, чем подвижность сильно ассоциированной воды. Слабо ассоциированная вода имеет максимально разрушенную сетку Н-связей и она относится к КС и ВВП типам воды. Однако слабо ассоциированная вода может являться только частью общего количества ВВП, локализованной на границах кластеров или в структурных полостях твердой или высокомолекулярной фазы. Различие в строении слабо и сильно ассоциированной воды приводит к отличию температурных зависимостей ^1H ЯМР спектров при $T < 273$ К. Погружение мозаичной гидрофобно/гидрофильной системы (например, частично триметилсилилированный кремнезем, дрожжевые клетки, кости, или мышечная ткань, содержащие относительно небольшое количество связанной воды) в слабополярный растворитель (CDCl_3) позволяет увеличить вклад от слабо ассоциированной воды. Такая вода наблюдается в ^1H ЯМР спектрах в виде отдельного пика с $\delta_H = 1,1-1,7$ м.д., что свидетельствует о медленном молекулярном обмене между обоими типами воды. Температура замерзания слабо ассоциированной воды существенно ниже, чем сильно ассоциированной и может достигать 170 К.

Необычные свойства слабо ассоциированной воды проявляются в ее способности образовывать со слабо полярными гидрофобными растворителями сильно структурированные смеси значительно более концентрированные, чем это возможно в жидкой фазе. Причиной такого эффекта может служить космотропное и хаотропное влияние на межфазную воду близко расположенных участков твердой поверхности или гидрофобных и гидрофильных групп биомакромолекул, находящихся в структурных карманах, заполненных водой или смесью воды с органическим растворителем. Слабо полярный растворитель способен экранировать неполярные функциональные группы поверхности от межфазной воды. Другими словами, мозаичная гидрофобно/гидрофильная поверхность создает условия для «мозаичной» смеси хлороформа и воды. Особенности взаимодействия воды и органических молекул определяются соотношением термодинамических параметров взаимодействия с поверхностью. Так, свободная энергия Гиббса для межфазной воды, растворенной в CHCl_3 (как и в бензоле и толуоле), отрицательна ($\Delta G \approx -5$ кДж/моль для хлороформа и $\Delta G \approx -4$ кДж/моль для бензола и толуола) в противоположность растворению воды в неполярном растворителе (например, $\Delta G \approx 11$ кДж/моль при растворении воды в гептане или $\Delta G > 0$ для других алифатических растворителей). Отрицательная свободная энергия растворения делает энергетически выгодным дробление кластеров воды, связанной с полярными силанольными или другими полярными группами на отдельные молекулы или небольшие кластеры, разделенные слабополярными органическими молекулами, CH_3 -группами гидрофобной поверхности твердых тел или функциональными группами внутриклеточных биоструктур. Полярность молекул как воды, так и слабо полярных органических растворителей может увеличиваться вблизи полярных участков поверхности, что приводит к улучшению их смешиваемости на мозаичной поверхности, вопреки уменьшению коэффициента активности адсорбированной воды; т. е. растворение неполярных или слабо полярных растворителей в межфазной воде ниже, чем объемной воде. Использование растворителей, менее полярных, чем хлороформ, может ухудшать условия появления необычной межфазной воды с $\delta_H = 1,1-1,7$ м. д. если $\Delta G_s \rightarrow 0$ или $\Delta G_s > 0$. Тем не менее, в случае малого содержания межфазной воды, вода в виде отдельных молекул или малых кластеров наблюдается даже в отсутствие слабо полярного растворителя. В этом случае роль слабо полярной среды могут выполнять неполярные или слабо полярные функциональные группы поверхности. Это приводит к появлению в ^1H ЯМР спектрах сигнала с химическим сдвигом $\delta_H =$

1,1-1,7 м. д. при небольшой гидратированности дрожжевых клеток, костей и мышечной ткани.

Таким образом, мягкие ткани в организме могут содержать определенное количество слабо ассоциированной воды. Очевидно, такая вода является типичной для наномозаичных гидрофобно-гидрофильных биосистем, таких, как клетки, кости, мышечная ткань, семена и др. Вероятно, что слабо ассоциированная вода выполняет важную функцию в клеточных и мультиклеточных системах. Такой функцией может являться стабилизация конформации биомакромолекул, принимающих участие в трансмембранном переносе гидрофобных и высокомолекулярных соединений, для которых проникновение через слой, содержащий одиночные молекулы или малые кластеры воды требует меньшей реорганизации межмолекулярных связей по сравнению со слоем сильно ассоциированной воды. Поскольку слабо ассоциированная вода не замерзает при охлаждении биобъектов вплоть до 190 К, такая вода может участвовать в защите организмов при криоконсервировании. Возможно, путем создания условий перехода межклеточной воды в слабо ассоциированное состояние могут быть созданы новые методы криоконсервирования живых тканей. Таким образом, настоящее исследование свойств необычной межфазной воды позволяет в определенной мере уточнить концепцию воды высокой и низкой плотности в аспекте ее использования для изучения межфазных явлений на мозаичных гидрофобно/гидрофильных структурах или внутриклеточных функциональных группах.

Литература

1. Narten A. H., Danford M. D., Levy H. A. X-Ray diffraction study of liquid water in the temperature range 4-200°C // *Faraday Discuss.* – 1967. – V. 43. – P.97-107.
2. Iijima T., Nishikawa K. Structure model of liquid water as investigated by the method of reciprocal space expansion // *J. Chem. Phys.* – 1994. – V. 101. – P.5017-5023.
3. Speedy R. J. Waterlike anomalies from repulsive interactions // *J. Chem. Phys.* – 1997. – V. 107. – P.3222-3229.
4. Cho C. H., Singh S., Robinson G. W. Understanding all of water's anomalies with a non-local potential // *J. Chem. Phys.* – 1997. – V. 107. – P.7979-7988.
5. Tanaka H. Simple physical explanation of the unusual thermodynamic behavior of liquid water // *Phys. Rev. Lett.* – 1998. – V. 80. – P.5750-5753.
6. Dougherty R. C., Howard L. N. Equilibrium structural model of liquid water: Evidence from heat capacity, spectra, density, and other properties // *J. Chem. Phys.* – 1998. – V. 109. – P.7379-7393.
7. Mishima O., Stanley H. E. The relationship between liquid, supercooled and glassy water // *Nature.* – 1998. – V. 396. – P.329-335.
8. A mechanistic view of the non-ideal osmotic and motional behavior of intracellular water / I. L. Cameron, K. M. Kanal, C. R. Keener, G. D. Fullerton // *Cell Biol. Int.* – 1997. – V. 21. – P.99-113.
9. Wiggins P. M. High and low density intracellular water // *Cell. Mol. Biol.* – 2001. – V. 47. – P.735-744.
10. Wiggins P. M. Water in complex environments such as living systems // *Physica A.* – 2002. – V. 314. – P.485-491.
11. Wiggins P. M. & MacClement B.A.E. Two states of water found in hydrophobic clefts: their possible contribution to mechanisms of cation pumps and other enzymes // *Internat. Rev. Cytol.* – 1987. – V. 108. – P.249-303.
12. Whalley E., Klug D. D., Handa Y. P. Entropy of amorphous ice // *Nature.* – 1989. – V. 342. – P.782-783.

13. Robinson G. W., Cho C. H., Urquidi J. Isobestic points in liquid water: Further strong evidence for the two-state mixture model // *J. Chem. Phys.* – 1999. – V. 111. – P.698-702.
14. Bartell L. S. On possible interpretations of the anomalous properties of supercooled water // *J. Phys. Chem.* – 1997. – V. 101. – P.7573-7583.
15. Local structural heterogeneities in liquid water under pressure / M. Campolat, F. W. Starr, A. Scala, M. R. Sadr-Lahijany, O. Mishima, S. Havlin, H. E. Stanley // *Chem. Phys. Lett.* – 1998. – V. 294. – P.9-12.
16. Chaplin M. F. A proposal for the structuring of water // *Biophys. Chem.* – 2000. – V. 83. – P.211-221.
17. Kusalik P. G., Svishchev I. M. The spatial structure in liquid water // *Science.* – 1994. – V. 265. – P.1219-1221.
18. Delaney J. S. Predicting aqueous solubility from structure // *Drug Discovery Today.* – 2005. – V. 10. – P.289-295.
19. Israelachvili J. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd edition. – New York: Academic Press, 1994.
20. Hug J. E., van Swol F., Zukoski C. F. The freezing of colloidal suspensions in confined spaces // *Langmuir.* – 1995. – V. 11. – P.111-118.
21. Proceedings of the 15th European Experimental NMR Conference (EENC 2000), (12-17 June 2000, University of Leipzig, Germany).
22. Fawcett W. R. *Liquids, Solutions, and Interfaces: From Classical Macroscopic Descriptions to Modern Microscopic Details.* – Oxford University Press, 2004.
23. Collins K. D., Washabaugh M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces // *Quart. Rev. Biophys.* – 1985. – V. 18. – P.323-422.
24. Water organisation at the solid-aqueous solution interface / L. J. Michot, F. Villieras, M. François, I. Bihannic, M. Pelletier, J-M. Cases // *Comptes Rendus Geosciences.* – 2002. – V. 334. – P.611-631.
25. Interaction of water with self-assembled monolayers: Neutron reflectivity measurements of the water density in the interface region / D. Schwendel, H. Hayashi, R. Dahint, A. Pertsin, M. Grunze, R. Steitz, F. Schreiber // *Langmuir.* – 2003. – V. 19. – P.2284-2293.
26. Israelachvili J., Adams G.E. Measurement of Forces Between two Mica Surfaces in Aqueous Electrolyte Solutions in the Range 0-100 nm // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1978. – V. 174. – P.975-1001.
27. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids } The Interaction of Soil Particles Having an Electrical Double Layer. / E.J.W. Verwey, J.Th.G. Overbeek, K. van Ness, Eds. – Elsevier, 1948.
28. Derjagin B. V., Churaev N.V., Muller V.M. *Surface Forces.* - Consultants Bureau: New York, 1987.
29. Van Oss C. J. *Interfacial Forces in Aqueous Media.* - Marsel Dekker, New York, 1994.
30. Freitas A. M., Sharma M. M. Effect of Surface Hydrophobicity on the Hydrodynamic Detachment of Particles from Surfaces // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – P.2466-2476.
31. Determination of physicochemical parameters of solids covered with conditioning films from groundwaters using contact angles. Comparative analysis of different thermodynamic approaches utilizing a range of diagnostic liquids / R. P. Shneider B. R. Chadwick, J. Jankowski, I. Acworth // *Colloids and Surf. A.* – 1997. – V. 126. – P.1-23.
32. Lee K. Y., Ha W. S. DSC studies on bond water in silk fibroin/S-carboxymethyl keratine // *Polymer.* – 1999. – V. 40. – P.4131-4134.
33. Lee S. J., Kim S. S., Lee Y. M. Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly(ethyleneglycol) macromer and chitosan // *Carbohydrate Polymers.* – 2000. – V. 41. – P.197-205.
34. Sessler G. M., (Ed.) *Electrets, Topics in Applied Physics*, V. 33, Springer, Berlin, 1980.

35. Dielectric properties of hydrated lyophilized hemoglobin as determined with the method of thermally stimulated depolarization / M. Reichle, T. Nedetzka, A. Mayer, H. Vogel // *J. Phys. Chem.* – 1970. – V. 74 – P.2659-2666.
36. Temperature and hydration-dependence of molecular mobility in seeds / P. Pissis, A. A. Konsta, S. Ratkovic, S. Todorovic, J. Laudat // *J. Thermal Anal.* – 1996.– V. 47. – P.1463-1483.
37. Tischenko V. A., Gun'ko V. M. Water Electret Relaxation at Disperse Silica Surface // *Colloids Surf. A.* – 1995. – V. 101. – P.287-294.
38. Dignan M. J., Rao B. Dielectric model for porous adsorbents // *J. Canad. Chem.* – 1975. – V. 53. – P.2252-2261.
39. Active Site Nature of Pyrogenic Alumina/Silica and Water Bound to Surfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. I. Zarko, E. F. Voronin, V. A. Tischenko, V. V. Dudnik, E. M. Pakhlov, A. A. Chuiko // *Langmuir.* – 1997. – V. 13. – P.1529-1544.
40. Zhuravlev L. T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model // *Colloids Surf. A.* – 2000. – V. 173 – P.1–38.
41. Temperature-Programmed Desorption of Water from Fumed Silica, Titania, Silica/Titania, and Silica/Alumina / V. M. Gun'ko, V. I. Zarko, B. A. Chuikov, V. V. Dudnik, Yu.G. Ptushinskii, E. F. Voronin, E. M. Pakhlov, A. A. Chuiko // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proces.* – 1998. – V. 172. – P.161-179.
42. Dabrowski A., Tertykh V. A. (Eds.) Adsorption on New and Modified Inorganic Sorbents. – Amsterdam: Elsevier, 1996.
43. Legrand L. P. (Ed.) *The Surface Properties of Silicas.* – New York: Wiley, 1998.
44. Kiselev A. V., Lygin V. I. *IR Spectra of Surface Compounds and Adsorbed Substances.* – Moscow: Nauka, 1972.
45. Bisset A., Dines T. J. Resonance Raman spectroscopic study of methyl red and ethyl red adsorbed on silica // *J. Chem Soc. Faraday Trabs.* – 1995. – V. 91. – P.499-505.
46. Machida K. *Raman spectroscopy: Sixty Yers On, Vibrational spectra and structure*, ed. J.R. Durig. // Amsterdam: Elsevier, 1989. – V. 17A. – P.421.
47. Giering T., Haarer D. Structural relaxation in amorphous water studied by hole-turning spectroscopy // *Chem. Phys. Lett.* – 1996. – V. 261. – P.677-484.
48. Hydration effects under near-infrared radiation / M. Komorowska, M. Gałwa, B. Herter, U. Wesołowska // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2002. – V. 26. – P.223–233.
49. The Effect of Second Phase Distribution in Disperse X/Silica (X= Al₂O₃, TiO₂, and GeO₂) on its Surface Properties / V. M. Gun'ko, V. I. Zarko, V. V. Turov, R. Leboda, E. Chibowski // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – P.5694-5702.
50. Turov V. V., Leboda R. Application of ¹H NMR Spectroscopy Method for Determination of Characteristics of Thin Layers of Water Adsorbed on the Surface of Dispersed and Porous Adsorbents // *Adv. in Colloid and Interface Sci.* – 1999. – V. 79. – P.173-211.
51. Turov V. V., Barvinchenko V. N. Structurally Ordered Layers of Water at the SiO₂/Ice Interface and Influence of Adsorbed Molecules of Protein Hydrolysate on them // *Colloids Surf. B.* – 1997. – V. 8. – P.125-132.
52. Gun'ko V. M., Turov V. V. Structure of Hydrogen Bonds and ¹H NMR Spectra of Water at the Interface of Oxides // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – P.6405-6415.
53. Griffinc P.C., Stilbs P. Adsorbtion fractionation studies by size-resolved pulse-gradient spin-echo-NMR // *Langmuir.* – 1995. – V. 11. – P.898-904.
54. Veeman W.S. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications // *Geoderma.* – 1997. – V. 80. – P.225-242.
55. Grandjean J., Robert J.-L. Multynuclear magnetic resonance studies on aqueous suspensions of synthetic saponite // *J. Colloid and Interface Sci.* – 1997. – V. 187. – P.267-273.

56. Application of the thermal frequency response method and of pulsed field gradient NMR to study water diffusion in zeolite NaX / V. Bourdin, A. Germanus, P. Grenier, J. Karger // *Adsorption*. – 1996. – V. 2. – P.205-216.
57. Su M.Y., Nalcioglu O. Spine-lattice and spin-spin relaxation in porous media: A generalized two site relaxation model // *J. Colloid and Interface Sci.* – 1993. – V. 160. – P.332-337.
58. Majer C. Nuclear magnetic resonance on dispersed nanoparticles // *Progr. In NMR Spectroscopy*. – 2002. – V. 40. – P.307-366.
59. Mank V.V., Lebovka N. I. *NMR Spectroscopy of Water in Heterogeneous Systems*. – Kiev: Naukova Dumka, 1988.
60. Wüthrich K., (Ed.) *NMR in Structural Biology*. – Singapore: World Scientific, 1995.
61. Pouliquen D., Gallois Y. Physicochemical properties of structured water in human albumin and gammaglobulin solutions // *Biochemie*. – 2001. – V. 83. – P.891-898.
62. Korpella M.A. ¹H NMR spectroscopy of human blod plasma // *Progr. In NMR Spectr.* – 1995. – V. 27. – P.475-554.
63. Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipids bilayers, as monitored by ¹H NMR measurements / L.E. Fraceto, A. Spisni, S. Schreier, E. Paula // *Biophysical Chem.* – 2005. – V. 115. – P.11-18.
64. Holte L.L., Gawrisch K. Determining ethanol distribution in phospholipid multilayer with MAS-NOESY spectra // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – P.4660-4674.
65. Wider G. Technical aspects of NMR spectroscopy with biological macromolecules and studies of hydration in solutions // *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spectros.* – 1998. – V. 32. – P.193-275.
66. Packer K. J. The dynamic of water in heterogeneous systems // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 1977. – V. 278. – P.59-87.
67. Fung B.M. Correlation of relaxation time with water content in muscle and brain tissues // *Biochsm. Biophys. Acta.* – 1977. – V. 497. – P.317-322.
68. Kuntz I. D., Brassfield T. S., Law G. D., Purcell G.V. Hydration of macromolecules // *Science*. – 1969. – V. 163. – P.1329-1331.
69. Gallier J., Rivet P., de Certaines J. D. ¹H and ²H study of bovine serum albumine solutions // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – V. 915. – P.1-18.
70. Zipp A., Kuntz I.D., James T.L. An investigation of 'bound' water in erythrocytes by proton magnetic resonance spin-lattice, spin-spin and rotatingframe spine-lattice relaxation time measurement // *J. Magn. Reson.* – 1976. – V. 24. – P.411-424.
71. Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamale, and synthetic hydroxyapatitet / Y. WU, J. Ackerman, H.-M. Kim, C. Rey, A. Barroug, M. Glimcher // *J. Bone and Mineral Research*. – 2002. – V. 17. – P.472-480.
72. Garcia-Martin M. L., Ballesteros P., Cerdan S. The methabolizm of water in cells and tissue as detected by NMR method // *Progress in NMR Spectroscopy*. – 2001. – V. 39. - P.41-77.
73. Smith I. C.P., Stewart L. C. Magnetic resinance spectroscopy in medicwne: clinical impact // *Progress in NMR Spectroscopy*. – 2002. – V. 40. – P.1-34.
74. Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance / E.E. Wilson, A. Awonusi, M.D. Morris, D.H. Kohn, M. MJ. Tecklenburg, L.W. Beck // *J. Bone and Mineral Research*. – 2005. – V. 20. – P.625-634.
75. De Certaines J. D., (Ed.). *Magnetic Resonance Spectroscopy of Biofluids, a New Tool in Clinical Biology*. – Singapore: World Scientific, 1989.
76. NMR study of phase transitions in pure water and binary H₂O/HNO₃ films adsorbed on surface of pyrogenic silica / A. Bogdan, M. Kulmala, B. Gorbunov, A. Kruppa // *J. Colloid. Interface Sci.* – 1996. – V. 177. – P.79-87.
77. Turov V.V., Leboda R. In: *Chemistry and Physics of Carbon*, L.R. Radovic, (Ed.), Marcel Dekker, New York. – 2001. – V. 27. – P.67-124.

78. Гунько В. М., Туров В. В., Лебода Р. Структурно-адсорбционные характеристики углеродно-оксидных материалов // Теорет. и эксперим. химия. – 2002. – Т. 38, № 4. – С.199-225.
79. Effect of Adsorption of Nitro Aromatic Compounds on Characteristics of Bound Water Layers in Aqueous Suspensions of Activated Carbons / R. Lebeda, V.V. Turov, W. Tomaszewski, V. M. Gun'ko, J. Skubiszewska-Zięba // Carbon. – 2002. – V. 40. – P.389-396.
80. Influence of Organics on Structure of Water Adsorbed on Activated Carbons / V.V. Turov, V. M. Gun'ko, R. Lebeda, T.J. Bandosz, J. Skubiszewska-Zięba, D. Palijczuk, W. Tomaszewski, S. Ziętek // J. Colloid Interface Sci. – 2002. – V. 253. – P.23-34.
81. Schneider W.G., Bernstein H.J., Pople J.A. // J. Chem Phys. – 1958. – V. 28. – P.601.
82. Pople J.A., Schneider W.G., Bernstein H.J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. – New York: McGraw-Hill Book Company, 1959.
83. Hindman J.C. Proton rasonanse shift of water in the gas and liquid states // J. Chem. Phys. – 1966. – V. 44. – P.4582-4592.
84. Study of Constitutive Superficial Water of Precipitated Amorphous Silicas using ^1H NMR: Broad-Line at 4K and MAS at 300 K / C. Doremieux-Morin, L. Heeribout, C. Dumousseaux, J. Fraissard, H. Hommel, A.P. Legrand // J. Amer. Chem. Soc. – 1996. – V. 118. – P.13040-13045.
85. Kinnej D.R., Chuang I.S., Maciel G.E. Interior Hydroxyl of the Silica Gel System as Studied by ^{29}Si CP-MAS NMR Spectroscopy // J. Amer. Chem. Soc. – 1993. – V. 115. – P.8695-8705.
86. Gordon A.J., Ford R.A. The Chemist's Companion. – New York: Wiley, 1972.
87. Kaneko K. Molecular assembly formation in a solid nanospace // Colloid and Surace: A. – 1996. – V. 109. – P.319-333.
88. Water in porous carbons / J. K. Brennan, T.J. Bandosz, K.T. Thomson, K.E. Gubbins // Colloids Surf. A. – 2001. – V. 187-188. – P.539-568.
89. Structural characteristics of a carbon adsorbent and influence of organic solvents on interfacial water / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, J. Skubiszewska-Zięba, R. Lebeda, M.D. Tsapko, D. Palijczuk // Appl. Surf. Sci. – 2003. – V 214. – P.178-189.
90. Structured Water in Partially Dehydrated Yeast Cells and at Partially Hydrophobized Fumed Silica Surface / V.V. Turov, V.M. Gun'ko, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, S.P. Gorbik, E.M. Pakhlov, R. Lebeda, O.V. Shulga, A.A. Chuiko // J. Colloid Interface Sci. – 2005. – V. 283. – P.329-343.
91. Haymet A.D.J., Ward L. G., Harding M. M. Winter flouder 'antifreeze' proteins: Synthesis and ice growth inhibitionof analogous that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen –bonding interactions // J. Am. Chem. Soc. – 1999. – V. 121. – P.941-948.
92. Conformational and associative behaviours of the third helix of Antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments / J.P. Berlose, O. Convert, D. Derossi, A. Brunissen, G. Chassaing // Eur. J. Biochem. – 1996. – V. 242. – P.372-386.
93. Dill K. A., Bromberg S. Molecular Driving Forces. – New York: Garland Science, 2003.
94. Скришевский А.Ф. Структурный анализ жидкостей. – М.: Высш. школа, 1971.
95. Turov V.V., Mironyuk I.F. Adsorption layers of water on the surface of hydrophilic, hydrophobic and mixed silicas // Colloids Surf. A. – 1998. – V. 134. – P.257-263.
96. Kozlov P.V., Burdygina G.I. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification // Polymer. – 1983. – V. 24. – P.651-666.
97. General Atomic and Molecular Electronic Structure System (GAMESS) / M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.J. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery // J. Comput. Chem. – 1993. – V. 14. – P.1347.

98. A Computational Chemistry Package for Parallel Computers, Version 4.5 (2003) / T. P. Straatsma, E. Apra, T. L. Windus, M. Dupuis, E. J. Bylaska, W. De Jong, S. Hirata, D. M. A. Smith, M. T. Hackler, L. Pollack, R. J. Harrison, J. Nieplocha, V. Tipparaju, M. Krishnan, E. Brown, G. Cisneros, G. I. Fann, H. Fruchtl, J. Garza, K. Hirao, R. Kendall, J. A. Nichols, K. Tsemekhman, M. Valiev, K. Wolinski, J. Anchell, D. Bernholdt, P. Borowski, T. Clark, D. Clerc, H. Dachsel, M. Deegan, K. Dyall, D. Elwood, E. Glendening, M. Gutowski, A. Hess, J. Jaffe, B. Johnson, J. Ju, R. Kobayashi, R. Kutteh, Z. Lin, R. Littlefield, X. Long, B. Meng, T. Nakajima, S. Niu, M. Rosing, G. Sandrone, M. Stave, H. Taylor, G. Thomas, J. Van Lenthe, A. Wong, and Z. Zhang // NWChem, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352-0999, USA.
99. Gaussian 94, Revision E.1 / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez, J. A. Pople // Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1995.
100. Wolinski K., Hilton J.F., Pulay P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations // *J. Am. Chem. Soc.* – 1990. – V. 112. – P.8251.
101. Keith T.A., Bader R.F.W. Calculation of magnetic response properties using a continuous set of gauge transformations // *Chem. Phys. Lett.* – 1993. – V. 210. – P.223.
102. GAMESOL–version 3.1 / J. D. Xidos, J. Li, T. Zhu, G. D. Hawkins, J. D. Thompson, Y.-Y. Chuang, P. L. Fast, D. A. Liotard, D. Rinaldi, C. J. Cramer, and D. G. Truhlar // University of Minnesota, Minneapolis, 2002.
103. Cancès M. T., Mennucci B., Tomasi J. *J. Chem. Phys.* – 1997. – V. 107. – P.3032.
104. Cossi M., Barone V., Mennucci B., Tomasi J. *Chem. Phys. Lett.* – 1998. – V. 286. – P.253.
105. Influence of Partial Hydrophobization of Fumed Silica by Hexamethyldisilazane on Interaction with Water / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.M. Bogatyrev, B. Charnas, J. Skubiszewska-Zięba, R. Leboda, S.V. Pakhovchishin, V.I. Zarko, L.V. Petrus, O.V. Stebelska, M.D. Tsapko // *Langmuir.* – 2003.– V. 19. – P.10816-10828.
106. Characterization of Fumed Alumina/Silica/Titania in the Gas Phase and Aqueous Suspension / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, V.V. Turov, R. Leboda, E. Chibowski, E.M. Pakhlov, E.V. Goncharuk, M. Marciniak, E.F. Voronin, A.A. Chuiko // *J. Colloid. Interface Sci.* – 1999. – V. 220. – P.302-323.
107. Чагер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. – Бухарест: Из-во Академии наук СРР, 1975. – С.184.
108. Principles of Biochemistry, A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, Worth, 2004.
109. Spectroscopic investigation of the interaction between human serum albumin and three organic acids / Yuan Liu, Meng-Xia Xie, Min Jiang, Ying-Dian Wang // *Spectrochimica Acta A.* – 2005. – V. 61. – P.2245-2251.
110. Norde W., Giacomelli C.E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states // *J. Biotechnology.* – 2000. – V. 79. – P.259-268.
111. Prat L.R., Pohorille A. Hydrophobic effects and modeling of biophysical aqueous solution interfaces // *Chem. Rev.* – 2002. – V. 102. – P.2671-2692.
112. Tiwans J.K. Moisture content in proteins: its effects and measurement // *J. Chromatogr. A.* – 1995. – V. 705. – P.115-127.

113. Pouliquen D., Gallois Y. Physicochemical properties of structured water in human albumin and gammaglobulin solutions // *Biochemie.* – 2001. – V. 83. – P.891-898.
114. Robinson G.W., Cho C.H. Role of hydration water in protein unfolding // *Biophys. J.* – 1999. – V. 77. – P.3311-3318.
115. Vogler E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1998. – V. 74. – P.61-117.
116. Hydrophobic volume effects in Albumin solutions / P. Schade, H. Klein, I. Egry, X. Ademovic, D. Klij // *J. Colloid Interface Sci.* – 2001. – V. 234. – P.445-447.
117. Sirotkin V.A., Borisover M.D., Solomonov B.N. Heat effects and water adsorption by human serum albumin on its suspension in water-dimethyl sulfoxide mixtures // *Thermochemica Acta.* – 1995. – V. 256. – P.175-183.
118. Sirotkin V.A., Borisover M.D., Solomonov B.N. Effect of chain length on interactions of aliphatic alcohols with suspended human serum albumin // *Biophysical Chemistry.* – 1997. – V. 69. – P.239-248.
119. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. – М.: Мир, 1980. – 582 с.
120. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев.: Наук. думка, 2003. – 415 с.
121. Курдиш И.К. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми материалами и его биотехнологическое значение. // *Микробиол. журнал.* – 1999. – Т. 61. – С.60-70.