

Министерство науки и высшего образования Российской
Федерации

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
"Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский институт)"

Физтех-школа исследований имени Ландау

Кафедра Биофизики

**Исследование влияния фазового перехода
жидкость-жидкость в водных двухфазных системах
на свойства воды**

Выпускная квалификационная работа
(бакалаврская работа)

Направление подготовки: 03.03.01 Прикладные математика и
физика

Работу выполнил:
студент Б02-823 группы



Геворгян Давит Геворгович

Научный руководитель:
к.ф.-м.н.



Николай Сергеевич Ильинский

Москва, 2022

Аннотация

В этой работе исследуется изменение свойств воды, в частности спектр поглощения в инфракрасном диапазоне методом FTIR, в разных фазах двухфазных водных систем. Рассматриваются двухфазные водные системы сформированные с помощью полиэтиленгликоля с молекулярным весом 600 (PEG-600) и триметиламинооксида (ТМАО) в 0.01М натрий-фосфатном буфере (NaPB), pH 7.4, а также из PEG-600 и бычьего сывороточного альбумина (белка BSA) в 0.01М натрий-фосфатном буфере (NaPB), pH 7.4. Обнаружены структурные изменения в контрольных растворах PEG-600 и вклад гидратной оболочки в спектры поглощения в контрольных растворах ТМАО. Результаты подтверждаются проверкой на спектрах разных фаз двухфазных систем.

Содержание

1	Аннотация	2
2	Цели и задачи	4
3	Введение	5
4	Литобзор	7
5	Материалы и методы	8
5.1	Состав смесей	8
5.1.1	Эксперимент с чистыми компонентами	8
5.1.2	Смеси PEG-TMAO	8
6	Результаты	13
6.1	Проверка линейности спектров по концентрациям	13
6.2	Проверка линейной зависимости спектров	14
7	Заключение	18

Цели и задачи

Целью этой работы является обнаружение и исследование изменений в спектре поглощения воды в инфракрасном диапазоне в разных фазах двухфазной системы PEG-600 и ТМАО. Для этого выполняются следующие задачи:

- Приготовить растворы двухфазных систем, а также контрольные растворы титрования чистых компонент
- Измерить FTIR спектры этих растворов и чистых компонент
- Провести исследование полученных спектров
- Сравнить с ожидаемыми результатами при линейном приближении

Введение

Водные двухфазные системы (ATPS), обычно используемые для разделения биологических продуктов [1] и в аналитических приложениях [2], обычно образуются в водных смесях двух полимеров, одного полимера и соли [3] или двух солей [4]. ATPS, образованные одним полимером и органическим соединением, таким как углевод [5] или поверхностно-активное вещество [6], также описаны, но недостаточно изучены. Хотя свойства ATPS, образованных двумя полимерами или одним полимером и солью, изучены относительно хорошо [2], свойства ATPS, образованных одним полимером и органическим соединением, подробно не охарактеризованы.

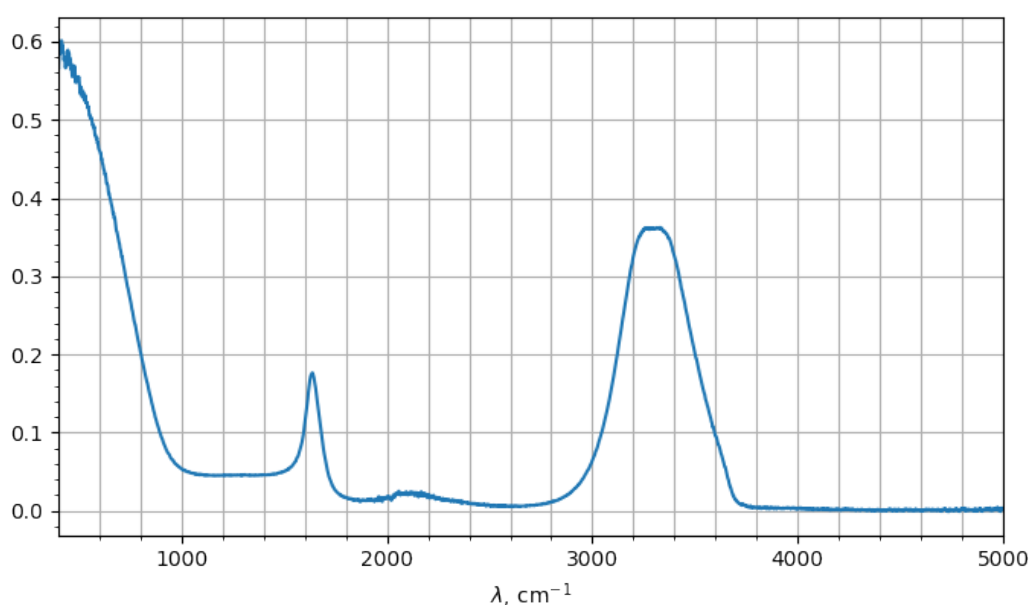


Рис. 1: FTIR спектр воды

Недавно было показано [7], что поведением распределения белка в полимер - полимерном ATPS можно управлять путем добавления N-оксида триметиламина (ТМАО) в относительно высоких концентрациях (до 2М). Замечено, что ТМАО в высоких концентрациях ($>1,5$ М) осаждается из водного раствора полиэтиленгликоля со средней молекулярной массой 8000 (PEG-8000), а в водных смесях с PEG со средней молекулярной массой 600 (PEG-600) может привести к фазовому разделению. Целью данного исследования была характеристика ATPS PEG-600-ТМАО, анализ его свойств и поведения при распределении нескольких белков. Аналогичные свойства были изучены и для уже описанной системы [7], образующейся в водных смесях PEG-600 и хлорида холина. Кроме того, было впервые рассмотрено зависимость растворяющих свойств воды в растворах индивидуальных полимеров от концентраций полимеров, необходи-

мых для фазового разделения в водных смесях с фиксированным количеством хлорида холина.

В настоящем исследовании мы стремимся выяснить, в какой степени добавление водорастворимого полимера в водный раствор нарушает структуру воды при высоких концентрациях полимера. Термодинамический анализ фазовых переходов водный декстран-ПВП (поливинилпирролидон) с точки зрения классической теории Флори-Хаггинса показал, что изменения взаимодействия полимер-вода, вызванные изменениями температуры, а также добавлением мочевины и соли, определяются водой. - водные взаимодействия [8]. Такие изменения в идеале можно исследовать с помощью колебательной спектроскопии. Широкая полоса в ИК-спектре (рис.1) между 3000 и 3600 см^{-1} может быть отнесена к множеству колебательно смешанных валентных мод ОН ($\nu_{\text{ОН}}$).

Литобзор

Недавние исследования ясно показали, что цитоплазма, митохондрии, хлоропласты и ядра эукариотических клеток, а также цитоплазма бактериальных клеток содержат многочисленные белковые безмембранные органеллы (PMLO). Хотя типичный PMLO содержит белковые молекулы, а также РНК (и/или ДНК), содержание и состав лишь нескольких PMLO частично перекрываются. Кроме того, не все белки способны к фазовым переходам жидкость-жидкость (по крайней мере, в физиологических условиях). Следовательно, важный вопрос связан с биофизическими свойствами, которые определяют способность белков подвергаться LLPT и организовывать сборку и разборку очень разных PMLO, расположенных в очень разных частях клетки. [9]

Что касается объяснения FTIR спектра воды, есть много моделей. Более старые модели связывали часть полосы с большим волновым числом с асимметричными, а нижнюю часть с симметричными модами растяжения молекул воды [10]. Считалось, что спектральные распределения частей с высоким и низким волновыми числами отражают неоднородность водородных связей и межмолекулярного экситонного взаимодействия. Более поздние теоретические работы Скиннера и его сотрудников существенно изменили эту картину [11]. В то время как молекулы, вносящие вклад в синюю сторону полосы, по-прежнему считаются менее связанными водородными связями, чем те, которые вносят вклад в красную сторону спектра, межмолекулярная связь преобладает над внутримолекулярной колебательной связью между двумя модами растяжения отдельной молекулы [12]. Как следствие, делокализация мод происходит практически во всей области волновых чисел полосы ν_{OH} с максимумом вблизи центра полосы поглощения. Рассчитанное взвешенное распределение волновых чисел показывает максимум при бл. 3200 см^{-1} . Интерпретация профиля полосы ν_{OH} дополнительно усложняется некондоновской связью с вращательными и поступательными движениями, что приводит к изменению переходных дипольных моментов. Результаты расчета, выполненного Шмидтом и др. предполагают, что они вызывают спектроскопические красные смещения [12]. Наконец, интерпретация спектров воды дополнительно усложняется ангармонической связью типа ферми-резонанса между изгибными модами ν_{OH} и воды, которая вносит основной вклад в область низких волновых чисел полосы ν_{OH} [13]. [14]

Материалы и методы

Комнатная температура (20-25°C)

ИК-Фурье-спектрометр Bruker ALPHA II с платиновым НПВО, эталон - атмосфера

Сверхчистая дистиллированная вода (invitrogen 10977-035)

PEG-600 Sigma 202401

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/202401?lang=en®ion=RU>

ТМАО Sigma 317594

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/317594?lang=en®ion=RU>

Состав смесей

Эксперимент с чистыми компонентами

- Сверхчистая дистиллированная вода (UP вода)
- 0.5M NaPB pH 7.4 (40.5мл 0.5M Na₂HPO₄ (3.55г на 50мл воды UP), 9.5мл 0.5M Na₂HPO₄ (35г на 50мл воды UP))
- ТМАО 59,8% в воде UP (2.98 г с добавлением 2 мл воды UP)
- PEG-600 81% wt. в UP-воде (4.58 г с добавлением 1 мл UP-воды)

Смеси PEG-ТМАО

Первая попытка

Используя фазовую диаграмму PEG-ТМАО на рис.(2) из [15] мы приготовили 5 смесей

- PEG-60_ТМАО-5wt%-in-0.05M-NaPB
- PEG-20_ТМАО-18.6wt%-in-0.05NaPB
- PEG-20_ТМАО-40wt%-in-0.05NaPB
- PEG-30_ТМАО-30wt%-in-0.05NaPB
- PEG-56_ТМАО-16wt%-in-0.05NaPB

Вторая попытка

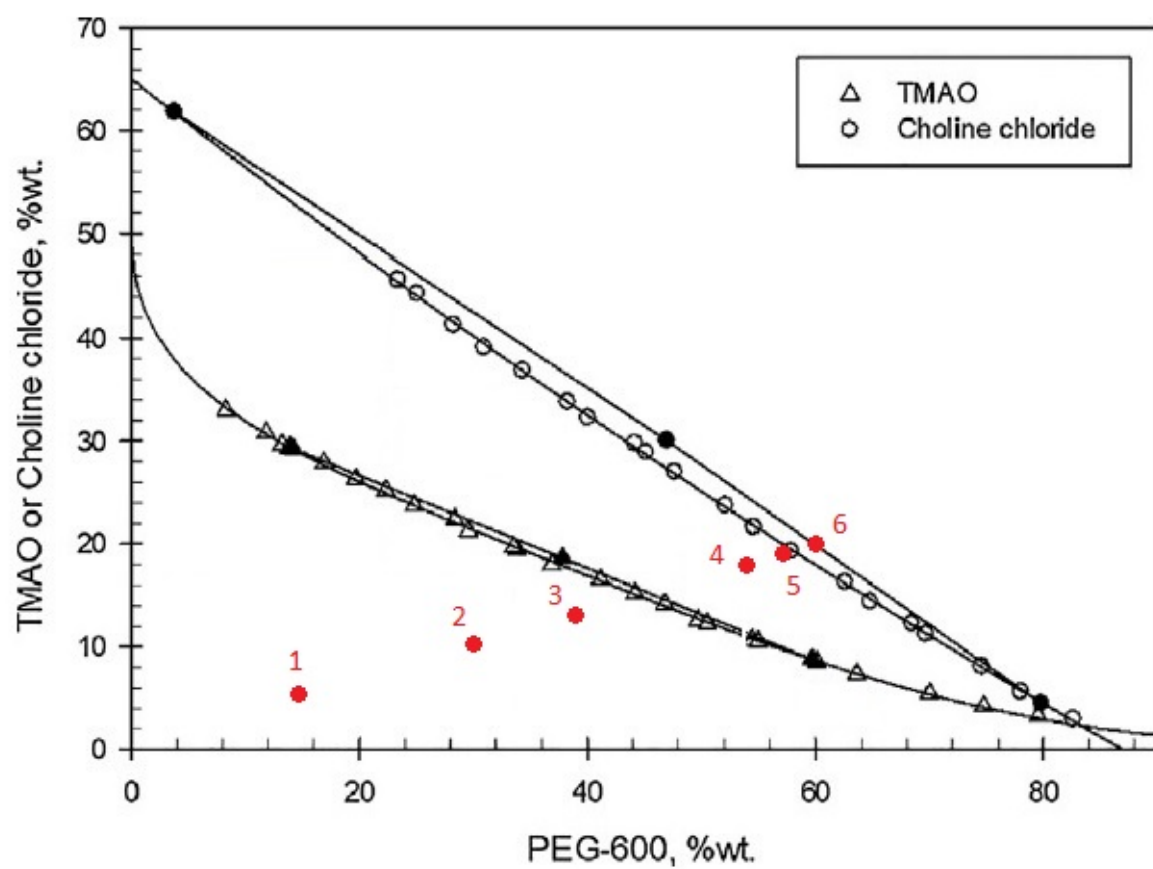


Рис. 2: Бинодали PEG-600 с ТМАО и хлоридом холина (график из [15]). Красными точками обозначены растворы сделанные в настоящей работе

ТМАО (%wt)	PEG-600 (%wt)	На фаз. диаграмме
5	15	ниже бинадали
10	30	ниже бинадали
13	39	ниже бинадали
18	54	две фазы
19	57	две фазы
20	60	две фазы

Таблица 1: Концентрации PEG и ТМАО

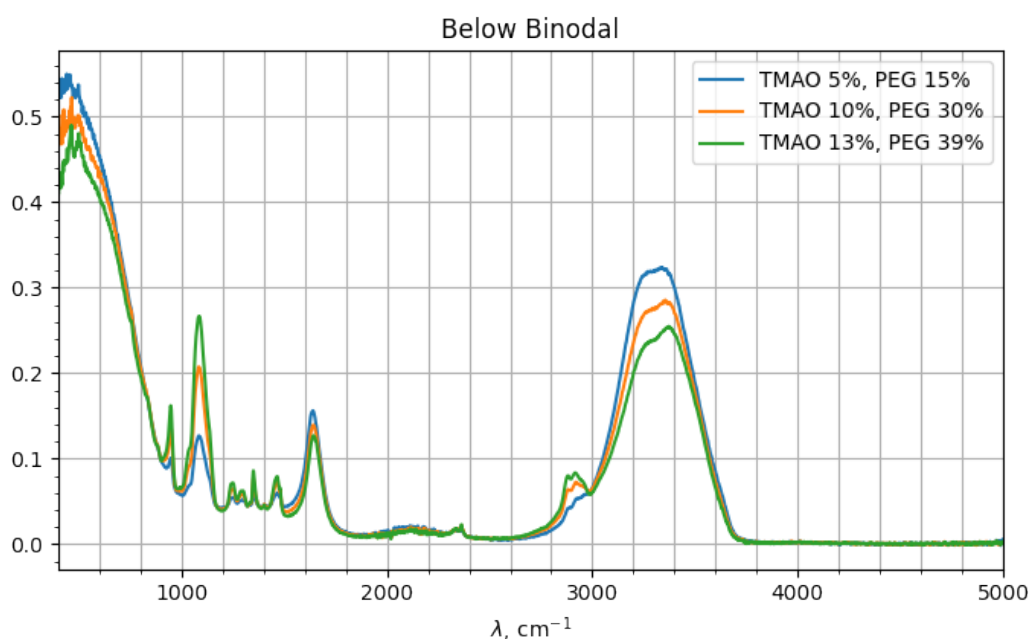


Рис. 3: FTIR спектры растворов ниже бинадали

Используя ту же фазовую диаграмму на рис.(2) из [15] мы приготовили 6 растворов. Концентрации этих растворов в таблице(1) и показаны на рис.(2) красными точками. Все растворы сделаны в 0.01М натрий-фосфатном буфере (NaPB), pH 7.4.

Как и ожидалось, в растворах ниже бинадали не наблюдается фазовое разделение, а в растворах выше наблюдается разделение на верхнюю и нижнюю фазы. Были выбраны следующие концентрации выше бинадали, так как при попытках сделать менее концентрированные растворы выше бинадали верхние фазы были в очень маленьких объемах и было неудобно забирать образцы для FTIR спектроскопии.

На рис.(3) представлены FTIR спектры поглощения растворов ниже бинадали, а на рис.(4) представлены спектры поглощения каждой фазы двухфазовых систем полученных из смесей выше бинадали.

Для контроля были еще сделаны 13 растворов ТМАО и 15 растворов

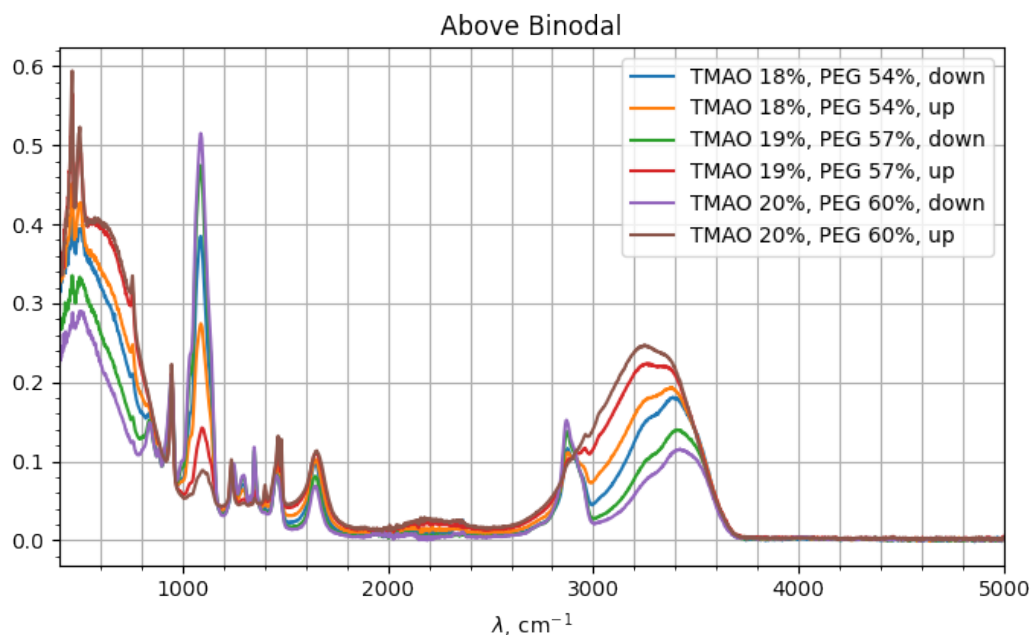


Рис. 4: FTIR спектры растворов выше бинодали

PEG-600 в разных концентрациях в 0.01M натрий-фосфатном буфере (NaPB), pH 7.4. Их спектры FTIR представлены на рис.(10) и рис.(9). Были еще измерены спектры сверхчистой дистиллированной воды (UP) и 0.01M раствора натрий-фосфатного буфера (NaPB), pH 7.4.

Для обработки данных была написана программа, которая методом наименьших квадратов приближает спектр линейной комбинацией спектров чистых компонент и возвращает коэффициенты этой линейной комбинации. Эта программа нужна чтобы не допустить ошибки, связанные с неправильными расчетами концентраций.

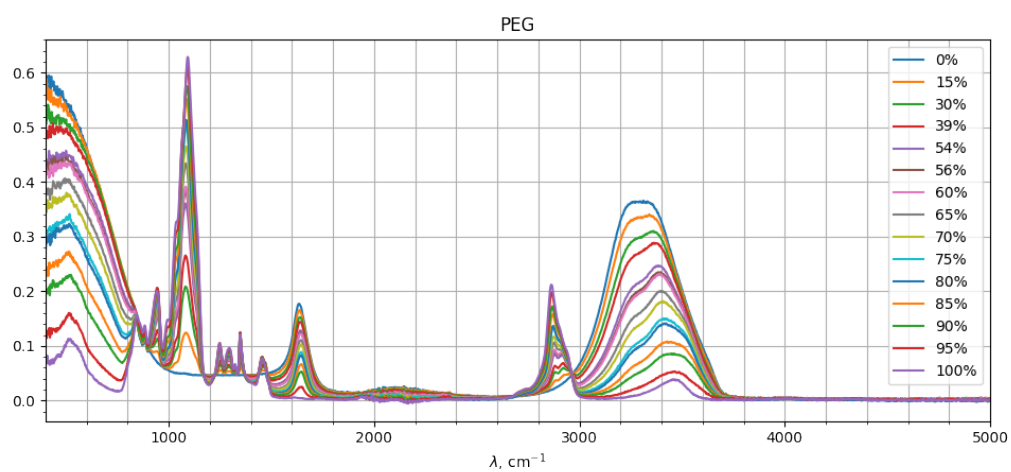


Рис. 5: FTIR спектры растворов титования PEG-600

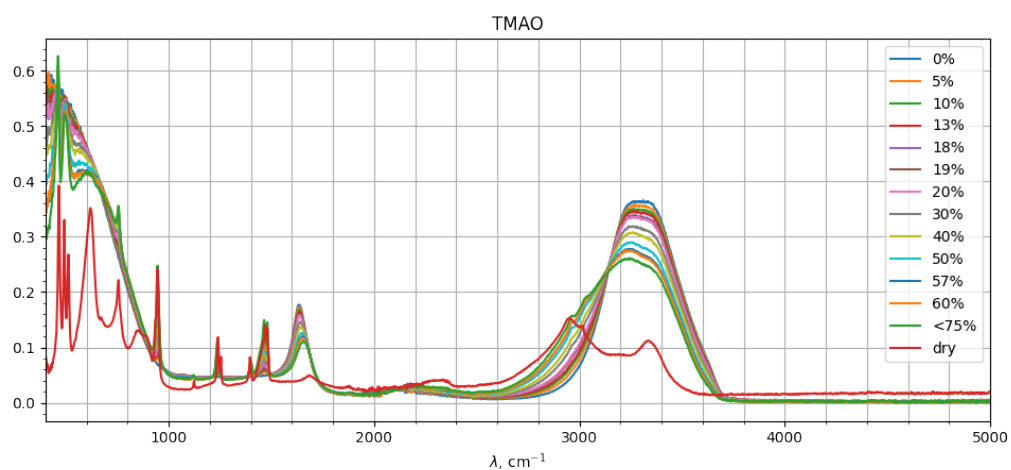


Рис. 6: FTIR спектры растворов титования ТМАО

Результаты

Мы провели измерения FTIR спектров некоторых смесей ТМАО-PEG-600 и контрольных растворов титрования отдельно ТМАО и PEG-600 с целью проверить, можем ли мы использовать FTIR для определения фазового разделения в водных двухфазных системах и выявить, различаются ли свойства воды в разных фазах и может ли это повлиять на фазовое разделение.

Первое, что можно заметить, это то что спектры сверхчистой дистиллированной воды (UP) не отличается от спектра 0.01M натрий-фосфатного буфера (NaPB), pH 7.4 в пределах погрешности, что означает, что буфер не имеет прямого вклада в спектры. Это значительно облегчая дальнейшие исследования.

Можно заметить, что спектры растворов ТМАО при увеличении концентрации не сходятся к спектру сухого ТМАО. Как объяснение этому явлению предлагается изменение электронной оболочки связанный с разрушением кристаллической решетки при растворении.

Проверка линейности спектров по концентрациям

Чтобы детектировать какие-либо структурные изменения компонент, мы будем сравнивать спектры смесей полученные экспериментально с линейными комбинациями спектров чистых компонент. В качестве начального шага мы проверим линейность зависимости спектров поглощения от концентрации. В качестве меры нелинейности будем использовать корень из среднего квадратичного отклонения.

Можно заметить, что спектры растворов ТМАО при увеличении концентрации не сходятся к спектру сухого ТМАО в отличие от спектров растворов PEG, которые непрерывно зависят от концентрации. Поэтому для ТМАО мы будем находить предел спектров когда концентрация стремится к единице используя линейную модель и метод наименьших квадратов. А для растворов PEG мы будем сравнивать их спектры с линейной комбинацией спектров чистых компонент с коэффициентами равными их концентрациям.

Как видно из рис.(7) зависимость спектров ТМАО линейна в отличие от PEG, у которого отклонение местами даже больше чем значение самого спектра.

На рис.(8) представлен график предела спектров ТМАО при концентрации стремящимся к единице. Как видно, расхождение спектров большое и в качестве объяснения этому предлагается эффект изменения электронной оболочки связанный с разрушением кристаллической решетки при растворении ТМАО в воде.

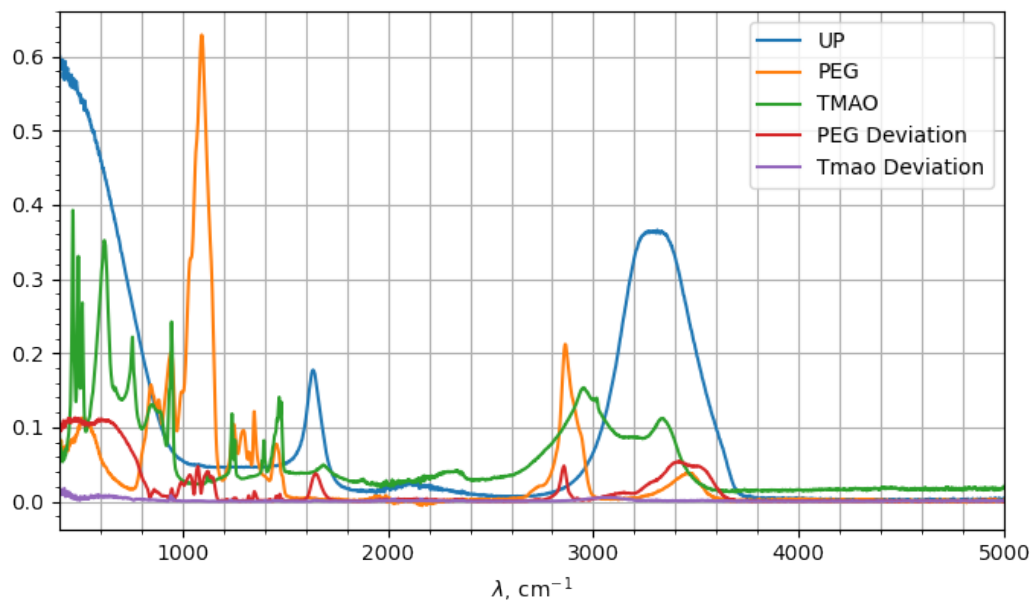


Рис. 7: Корень из среднего квадратичного отклонения от линейной модели для PEG и TMAO

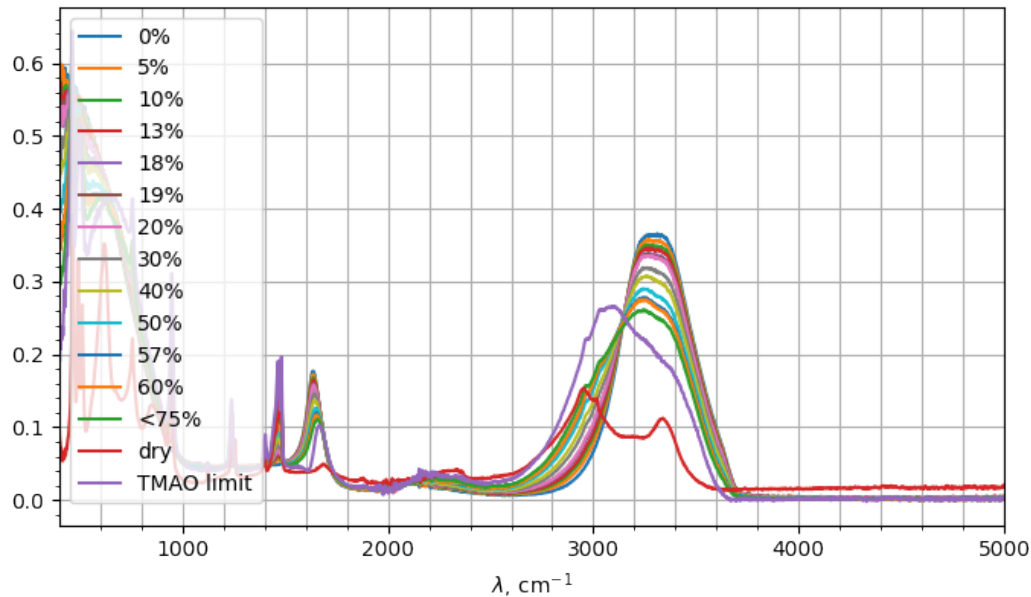


Рис. 8: Предел спектров TMAO при линейном приближении

Проверка линейной зависимости спектров

Чтобы исключить ошибки, связанные с неправильными расчетами концентраций мы будем их считать исходя только из спектров. Чтобы избежать других возможных нерассмотренных эффектов, мы не будем счи-

UP, расч.	PEG-600, расч.	UP	PEG-600
1.00	0.00	1.00	0.00
0.95	0.11	0.85	0.15
0.88	0.23	0.70	0.30
0.82	0.31	0.61	0.39
0.70	0.46	0.46	0.54
0.67	0.49	0.43	0.57
0.65	0.51	0.40	0.60
0.57	0.58	0.35	0.65
0.51	0.64	0.30	0.70
0.41	0.72	0.25	0.75
0.38	0.73	0.20	0.80
0.28	0.82	0.15	0.85
0.21	0.87	0.10	0.90
0.076	0.96	0.05	0.95
0.00	1.00	0.00	1.00

Таблица 2: Рассчитанные коэффициенты вместе с концентрациями для растворов PEG

UP, расч.	ТМАО, расч.	PEG, расч.	UP	ТМАО	PEG
0.87	0.068	0.11	0.80	0.05	0.15
0.75	0.12	0.23	0.60	0.10	0.30
0.65	0.14	0.32	0.48	0.13	0.39

Таблица 3: Рассчитанные коэффициенты вместе с концентрациями для растворов ниже бинодали

тать, что сумма коэффициентов приближающих линейных комбинаций спектров чистых компонент равна единице.

Рассчитанные коэффициенты для контрольных растворов PEG приведены в таблице (2), вместе с их концентрациями. Результаты таких же расчетов вместе с концентрациями растворов ниже бинодали и отдельных фаз смесей выше бинодали приведены в таблицах (3) и (4) соответственно. В этих расчетах был использован предельный спектр ТМАО вместо спектра сухого ТМАО, который мы нашли в предыдущей части.

На рис.(9) и (10) представлены спектры поглощения некоторых растворов PEG и ТМАО соответственно вместе с их линейными приближениями. Для расчета приближений PEG были использованы коэффициенты из таблиц(2). Как видно, даже при снятии ограничения на сумму коэффициентов, все равно линейная модель плохо описывает спектры PEG в отличие от ТМАО, для которого линейное приближение работает хорошо.

UP, расч.	ТМАО, расч.	PEG, расч.	UP	ТМАО	PEG	фаза
0.29	0.036	0.76	0.20	0.20	0.60	ниж.
0.36	0.057	0.68	0.24	0.19	0.57	ниж.
0.45	0.13	0.52	0.28	0.18	0.54	ниж.
0.43	0.25	0.38	0.28	0.18	0.54	верх.
0.42	0.44	0.16	0.24	0.19	0.57	верх.
0.39	0.54	0.077	0.20	0.20	0.60	верх.

Таблица 4: Рассчитанные коэффициенты вместе с начальными концентрациями для растворов выше бинодали

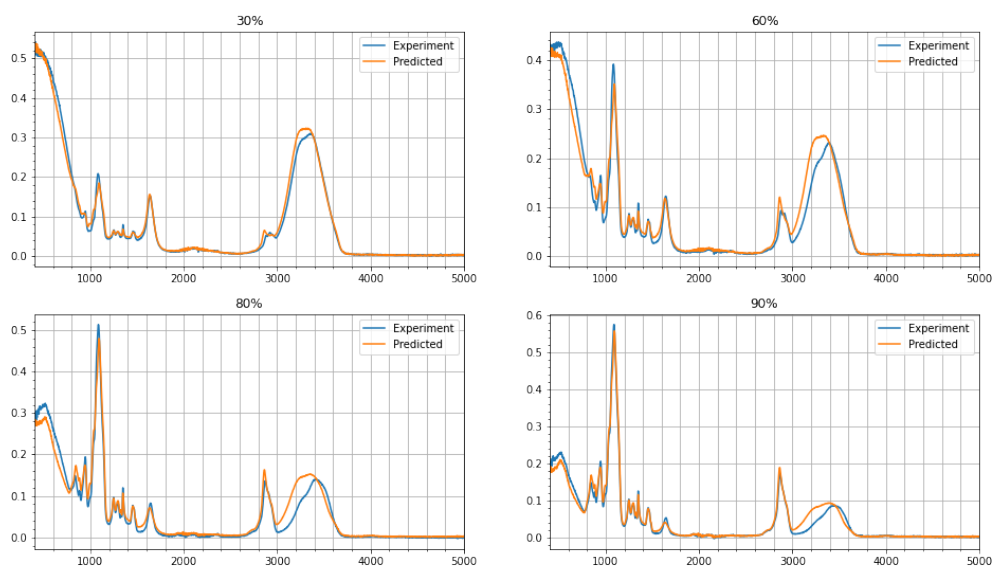


Рис. 9: Сравнение линейной модели с экспериментом для PEG

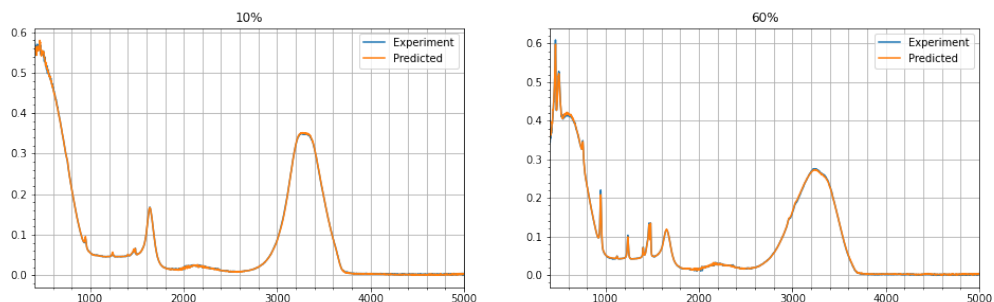


Рис. 10: Сравнение линейной модели с экспериментом для ТМАО

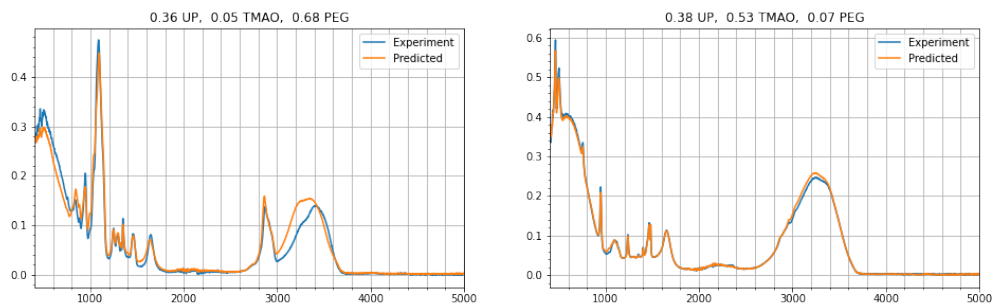


Рис. 11: Сравнение линейной модели с экспериментом для разных фаз при фазовом разделении смесей выше бинодали

Если смотреть на спектры разных фаз при фазовом разделении смесей выше бинодали и их линейные приближения на рис.(11), также можно заметить что чем больше коэффициент PEG, тем хуже линейная модель предсказывает экспериментальные спектры.

Заключение

Получены двухфазные системы из PEG-600 и ТМАО. В контрольных растворах PEG-600 наблюдается линейная независимость спектров поглощения полученных методом FTIR, что свидетельствует о структурных изменениях. Спектры FTIR ТМАО линейно зависят от концентрации, но, при стремлении концентрации к единице, спектры растворов не стремятся к спектру сухого ТМАО. Это наверное можно объяснить вкладом гидратной оболочки и структурными изменениями в самих молекулах ТМАО. В смесях PEG-600 и ТМАО, как и ожидалось, линейная модель начинает работать хуже с возрастанием концентрации PEG-600.

Список литературы

- [1] Ruben R. G. Soares, Ana M. Azevedo, James M. Van Alstine, and M. Raquel Aires-Barros. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. Biotechnology Journal, 10(8):1158–1169, July 2015.
- [2] Boris Y. Zaslavsky, Vladimir N. Uversky, and Arnon Chait. Analytical applications of partitioning in aqueous two-phase systems: Exploring protein structural changes and protein–partner interactions in vitro and in vivo by solvent interaction analysis method. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1864(5):622–644, May 2016.
- [3] Per-Åke Albertsson. Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems. In Advances in Protein Chemistry, pages 309–341. Elsevier, 1970.
- [4] Sonia PM Ventura, Francisca A e Silva, Maria V Quental, Dibyendu Mondal, Mara G Freire, and Joao AP Coutinho. Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. Chemical Reviews, 117(10):6984–7052, 2017.
- [5] Aake Sjöberg, Gunnar Karlström, and Folke Tjerneld. Effects on the cloud point of aqueous poly (ethylene glycol) solutions upon addition of low molecular weight saccharides. Macromolecules, 22(12):4512–4516, 1989.
- [6] Nivedita K Pandit, Jayesh Kanjia, Kalpesh Patel, and Dean G Pontikes. Phase behavior of aqueous solutions containing nonionic surfactant-polyethylene glycol mixtures. International journal of pharmaceutics, 122(1-2):27–33, 1995.
- [7] Luisa A Ferreira, Zhonghua Wu, Lukasz Kurgan, Vladimir N Uversky, and Boris Y Zaslavsky. How to manipulate partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of trimethylamine n-oxide (tmao). Fluid Phase Equilibria, 449:217–224, 2017.
- [8] B Yu Zaslavsky, TO Bagirov, AA Borovskaya, ND Gulaeva, LH Miheeva, AU Mahmudov, and MN Rodnikova. Structure of water as a key factor of phase separation in aqueous mixtures of two nonionic polymers. Polymer, 30(11):2104–2111, 1989.
- [9] April L. Darling, Boris Y. Zaslavsky, and Vladimir N. Uversky. Intrinsic disorder-based emergence in cellular biology: Physiological and pathological liquid-liquid phase transitions in cells. Polymers, 11(6):990, June 2019.

- [10] Bożena Ratajska-Gadomska and Wojciech Gadomski. Water structure in nanopores of agarose gel by raman spectroscopy. The Journal of chemical physics, 121(24):12583–12588, 2004.
- [11] JR Schmidt, SA Corcelli, and JL Skinner. Pronounced non-condon effects in the ultrafast infrared spectroscopy of water. The Journal of chemical physics, 123(4):044513, 2005.
- [12] HJ Bakker and JL Skinner. Vibrational spectroscopy as a probe of structure and dynamics in liquid water. Chemical reviews, 110(3):1498–1517, 2010.
- [13] William B Carpenter, Joseph A Fournier, Rajib Biswas, Gregory A Voth, and Andrei Tokmakoff. Delocalization and stretch-bend mixing of the hoh bend in liquid water. The Journal of Chemical Physics, 147(8):084503, 2017.
- [14] Jessica Pavelec, David DiGuseppi, Boris Y. Zaslavsky, Vladimir N. Uversky, and Reinhard Schweitzer-Stenner. Perturbation of water structure by water-polymer interactions probed by FTIR and polarized raman spectroscopy. Journal of Molecular Liquids, 275:463–473, February 2019.
- [15] Luisa A. Ferreira, Vladimir N. Uversky, and Boris Y. Zaslavsky. Phase equilibria, solvent properties, and protein partitioning in aqueous polyethylene glycol-600-trimethylamine n-oxide and polyethylene glycol-600-choline chloride two-phase systems. Journal of Chromatography A, 1535:154–161, February 2018.