

Małgorzata Wszelaka-Rylik

A-21-7

A-21-6

k-g-164

k-g-158

**Własności termodynamiczne cytozyny
i jej metylo-, hydroksy- i metoksy- pochodnych
w wodzie, metanolu i N,N-dwumetyloformamidzie.**

Fi N v ka

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

B.343/2001



00000000258760

H.

Praca doktorska wykonana
w Instytucie Chemii Fizycznej
Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem
Prof. dr hab. Wojciecha Zielenkiewicza

Warszawa 2001



B 343 / 2001

Promotorowi niniejszej pracy Panu Prof. dr.
hab Wojciechowi Zielenkiewiczowi pragnę
wyrazić serdeczne podziękowania za naukową
pomoc oraz życzliwą opiekę.

Serdecznie dziękuję Pani Dr Annie Zielenkiewicz za wprowadzenie mnie w sztukę pomiarów kalorymetrycznych oraz cenne sugestie a także Panu Dr Jarosławowi Poznańskiemu za owocne dyskusje.

Dziękuję Pani Halinie Szczogryn za jej pomoc w wykonaniu pomiarów densymetrycznych.

SPIS TREŚCI

Cel i zakres pracy.....	6
-------------------------	---

CZĘŚĆ OGÓLNA

1. Zasady pirymidynowe i purynowe jako składniki kwasów nukleinowych.....	7
2. Zasady kwasów nukleinowych	14
3. Hydratacja hydrofobowa	18
4. Kalorymetryczne badania roztworów.....	22
5. Częstkowe molowe wielkości	29
6. Termodynamiczne badania zasad kwasów nukleinowych .	30

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

7. Materiały i metody badań	35
7.1. Obiekty badań	35
7.2. Metody doświadczalne badań	38
7.2.1. Wyznaczanie ciepła rozpuszczania $\Delta_{sol}H_m$	38
7.2.2. Wyznaczanie pozornych molowych objętości V_ϕ	39
7.2.3. Wyznaczanie entalpii sublimacji $\Delta_{sub}H_m$	40
7.2.3.1. Konstrukcja przyrządu do oznaczeń ciepła sublimacji metodą przepływu gazu obojętnego nad badaną substancją	41
7.2.3.2. Zasada działania skonstruowanego przyrządu	42
7.2.3.3. Wyniki wzorcowania przyrządu	43
7.3. Sposób przeprowadzania obliczeń	
7.3.1. Wyznaczanie entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$ oraz entalpii oddziaływań $\Delta_{int}H_m$ ciało rozpuszczone – rozpuszczalnik.....	47
7.3.2. Metoda udziałów grupowych	49
7.3.3. Wyznaczanie parametrów strukturalnych cytozyny i jej pochodnych oraz parametrów α, β modelu opisującego własności objętościowe badanych substancji.....	50
7.3.4. Wyznaczenie funkcji przejścia: entalpii solwatacji i cząstkowych molowych objętości.....	52
8. Wyniki oznaczeń i obliczeń.....	53
8.1. Entalpia rozpuszczania, sublimacji oraz solwatacji.....	53
8.2. Entalpia oddziaływań ciało rozpuszczone – rozpuszczalnik.....	55
8.3. Częstkowe molowe objętości. Wyniki oznaczeń.....	57
8.4. Wyniki wyznaczonych funkcji przejścia $V_{2,tr}^0$	60
8.5. Wartości udziałów grupowych wyznaczone z danych $\Delta_{solv}H_m$ oraz V_2^0 badanych substancji w roztworach wodnym, metanolu i DMF	62
8.6. Parametry strukturalne cytozyny i jej pochodnych w badanych roztworach	68

8.7.	Zależności entalpii solwatacji od powierzchni dostępnych dla rozpuszczalnika.....	70
8.8.	Zależności względnych gęstości otoczki solwatacyjnej od polarności badanych związków w roztworach wodnym, metanolu i DMF.....	73
8.9.	Zależności pomiędzy własnościami objętościowymi i entalpowymi badanych związków.....	75
9.	Ogólne wnioski	78
10.	Literatura	80

Cel i zakres pracy.

Podstawowym celem pracy było wyznaczenie entalpii oddziaływań cytozyny i jej metylo-, metoksy- i hydroksy- pochodnych z wodą. Jako metodę postępowania przyjęto określenie entalpii solwatacji na podstawie doświadczalnie wyznaczonych entalpii rozpuszczania i sublimacji oraz półempirycznie określonych entalpii tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku.

Dane doświadczalne entalpii solwatacji w roztworach: wodnym, metanolu i N,N-dwumetyloformamidu umożliwiły określenie entalpii przejścia woda – metanol, woda – DMF.

Model oddziaływań badanych substancji z rozpuszczalnikiem oparto na założeniu, że woda jako zarówno dobry akceptor jak i donor protonów oddziałuje z atomami tlenu, azotu i wodorami polarnymi badanych substancji. Metanol, jako lepszy donor niż akceptor protonów oddziałuje z atomami azotu i tlenu, natomiast DMF tylko z atomami wodoru, co jest wynikiem jego akceptorowych własności. Przy tak przyjętym założeniu określono powierzchnie dostępne dla rozpuszczalnika, jako sumę powierzchni atomów oddziałujących z danym rozpuszczalnikiem. Tak określone powierzchnie skorelowano z entalpią solwatacji.

W celu potwierdzenia podanego powyżej modelu oddziaływań badana substancja – rozpuszczalnik, badania poszerzono na określenie cząstkowych molowych objętości. Wyznaczono parametr α , charakteryzujący własności objętościowe badanego układu, zdefiniowano polarność badanych substancji w różnych rozpuszczalnikach i określono korelacje $\alpha = f(P)$.

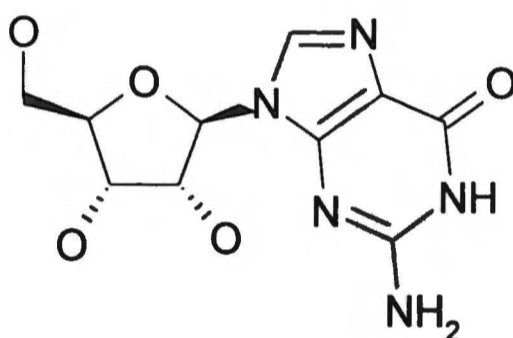
Założono, że dla badanych związków istnieje korelacja pomiędzy własnościami objętościowymi a entalpowymi.

Ze względu na niskie prężności pary badanych związków, jak i małe ilości dostępne do badań, skonstruowano nowy przyrząd do wyznaczania entalpii sublimacji. Zasada wykorzystana w jego konstrukcji oparta jest na metodzie przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą.

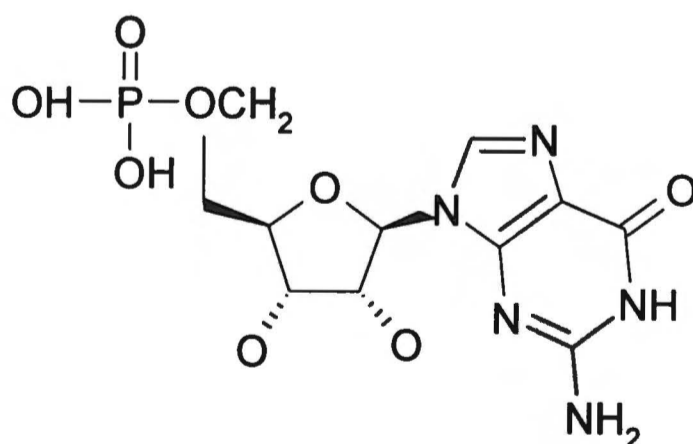
1. Zasady pirymidynowe i purynowe jako składniki kwasów nukleinowych.

Kwasy nukleinowe są heteropolimerami występującymi we wszystkich żywych komórkach. Łańcuchy kwasu rybonukleinowego (RNA) i dezoksyrybonukleinowego (DNA) zbudowane są odpowiednio z rybonukleotydów oraz 2'-dezoksyrybonukleotydów. Nukleotydy są ufosforylowanymi nukleozydami, a te zawierają: cukier (β -D-rybozę (RNA) i (β -D-2'-dezoksy-D-rybozę (DNA)) oraz zasadę purynową lub pirymidynową.

a)



b)

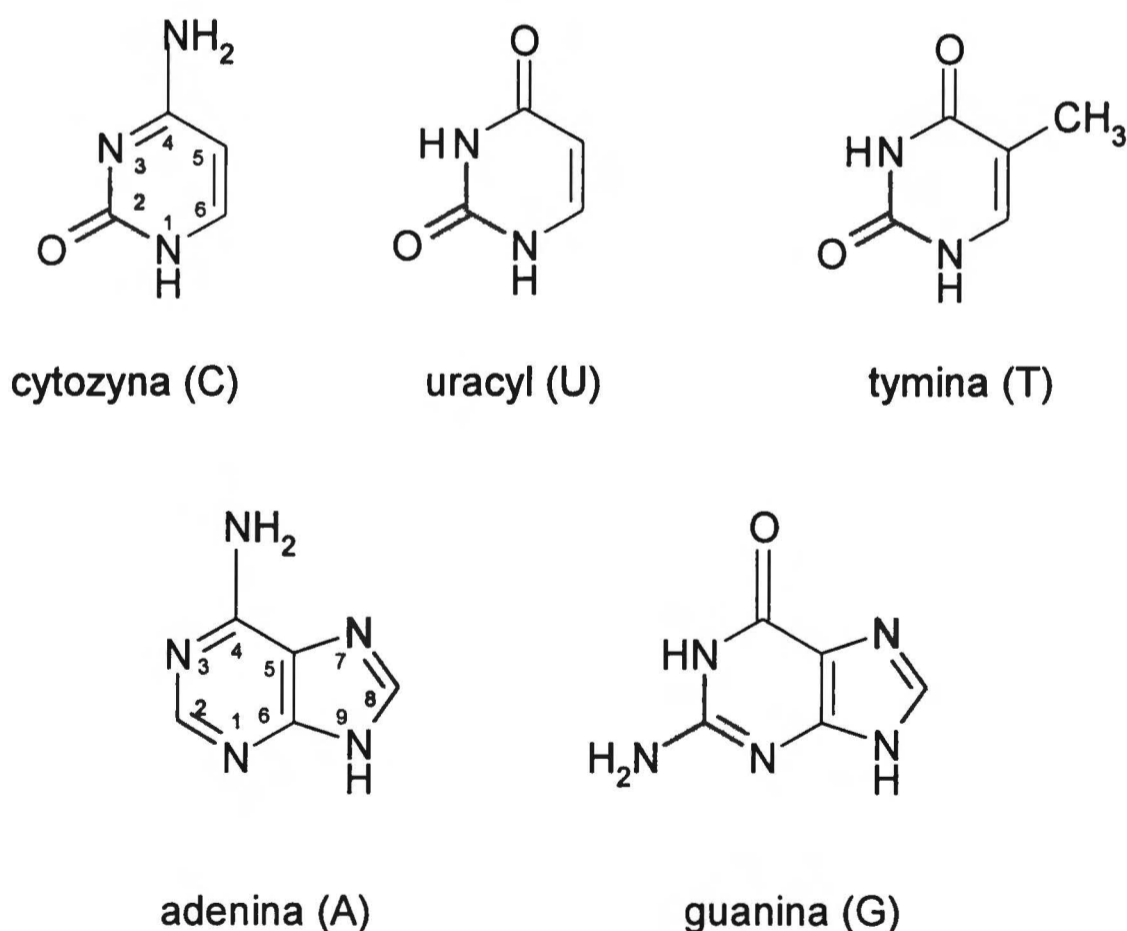


Rysunek 1. Wzory strukturalne: a) nukleozydu: guanozyny, b) nukleotydu guaniny tj. kwasu 2'-dezoksy-guanozyno-5'-fosforowego.

Cukry występujące w kwasach nukleinowych mają zdolność łączenia się za pomocą reaktywnego atomu węgla C¹ z grupami OH lub NH innych związków oraz tworzenia wiązania estrowego z kwasem fosforowym za pomocą grup OH przy atomach węgla C³ i C⁵. W kwasach nukleinowych cukry połączone są z zasadą wiązaniem N-glikozydowym, co przedstawiają wzory na *Rysunku 1*.

Nukleotydy są zasadniczymi elementami przy budowie kwasów nukleinowych, ale poza tym są związkami wyjściowymi w biosyntezie trójfosforanów nukleozydów, związków o wysokiej energii: np. ATP, GTP, UTP. Ponadto wiele nukleotydów wchodzi w skład licznych koenzymów, które pełnią ważną rolę w przemianach enzymatycznych (np. NAD⁺, NADP⁺, FAD, CoA, CoB₁₂).

W makrocząsteczkach RNA występują następujące zasady: cytozyna (C), uracyl (U), adenina (A) i guanina (G). W DNA miejsce uracylu zajmuje tymina (T), pozostałe zasady są identyczne jak w RNA. Wzory strukturalne zasad oraz powszechnie przyjęty, stosowany również w tej pracy, sposób numeracji atomów pierścienia pirymidynowego i purynowego przedstawiono na *Rysunku 2*.



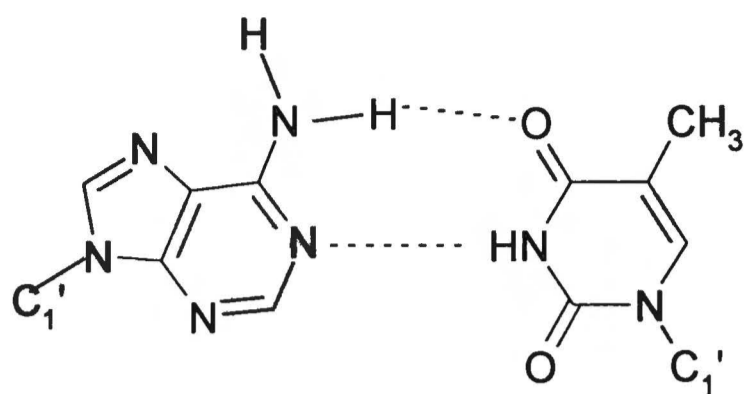
Rysunek 2. Wzory strukturalne: cytozyny (C), uracylu (U), tyminy (T), adeniny (A) i guaniny (G).

Obok podstawowych zasad składnikami kwasów nukleinowych mogą być także, jako tak zwane „rzadkie zasady”, metylowane (np. 5-metylocytozyna), acetylowane lub w inny sposób zmodyfikowane zasady (np. 5-hydroksy-5-metylocytozyna w kielkach pszenicy). W RNA z nietypowych zasad stwierdzono występowanie np. N⁶-metyloadeniny lub N⁶, N⁶-dwumetyloadeniny.

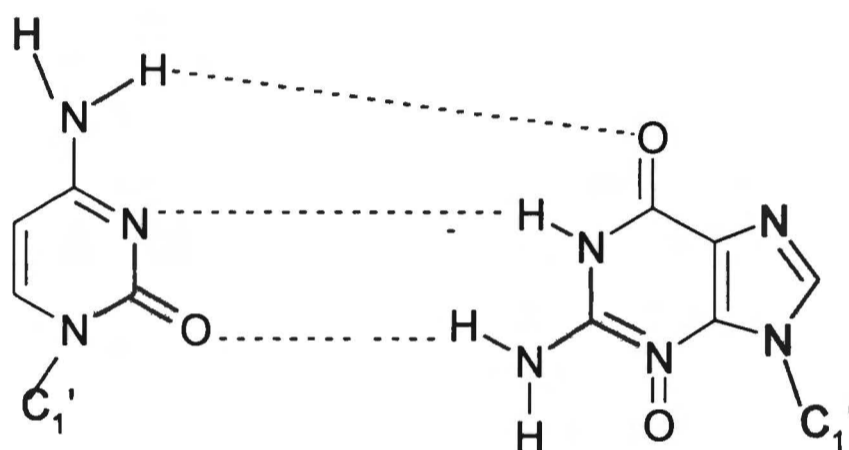
Struktura pierwszorzędowa kwasu nukleinowego to kolejność ułożenia zasad azotowych w łańcuchu. Struktura pierwszorzędowa tworzy podstawy informacji genetycznej zapisanej przede wszystkim w DNA.

Głównym źródłem informacji o przestrzennej strukturze kwasów nukleinowych są badania rentgenostrukturalne. Według Watsona i Cricka, cząsteczka DNA zbudowana jest ze splecionych ze sobą dwu komplementarnych nici, powiązanych za pomocą wiązań wodorowych i tworzą strukturę podwójnej helisy. Zasada purynowa z jednego łańcucha cząsteczki łączy się z zasadą prymidynową drugiego łańcucha. Adenina łączy się z tyminą lub uracylem za pomocą dwóch wiązań wodorowych. Guanina z cytozyną łączy się za pomocą trzech wiązań. Odpowiadające wzajemne zasady azotowe nazywa się komplementarnymi. Ta specyficzność oddziaływań między zasadami pozwala na wierne kopiowanie informacji genetycznej w procesie replikacji, gdy na każdej nici DNA buduje się nić potomna. Komplementarność zasad, czyli ich zdolność łączenia się w pary jest najważniejszym czynnikiem stabilizującym strukturę drugorzędową kwasów nukleinowych. Pary zasad są hydrofobowe i znajdują się w środku helisy, tworząc ściśle upakowany trzon, reszty cukrowe oraz fosforanowe tworzą „hydrofilową osłonkę” zewnętrzną. Zasady azotowe, będące najbliższymi sąsiadami w tej samej nici, ustawiają się w przestrzeni w sposób prawie równoległy do płaszczyzny najbliższych sąsiadów. Równoległe ułożenie kolejnych zasad w nici DNA umożliwia występowanie efektów asocjacji warstwowej między pierścieniami zasad. Pod względem energetycznym oddziaływania takie są porównywalne z wiązaniami wodorowymi i są istotnym czynnikiem stabilizacji struktury przestrzennej DNA. Uważa się, że to efekty asocjacji warstwowej są przyczyną wywołującą zwijanie się pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych, jak DNA i RNA, w konformacje helikalne.

Sposób łączenia się zasad, na zasadzie ich komplementarności, w podwójnej helisie DNA przedstawiony został na *Rysunku 3*.



b)



*Rysunek 3. Pary zasad: a) adenina (A) – tymina (T),
b) cytozyna (C) – guanina (G).*

Wiązania wodorowe są wiązaniami słabymi (około $20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), lecz ich liczba w długiej makrocząsteczce kwasu nukleinowego powoduje, że oddziaływanie obu nici jest bardzo silne. Taka dwuniciowa cząsteczka przyjmuje szczególną konformację uwarunkowaną dodatkowymi oddziaływaniami z roztworem.

Struktura trzeciorzędowa kwasów nukleinowych wynika z fałdowania się dwuniciowego odcinka cząsteczki kwasu.

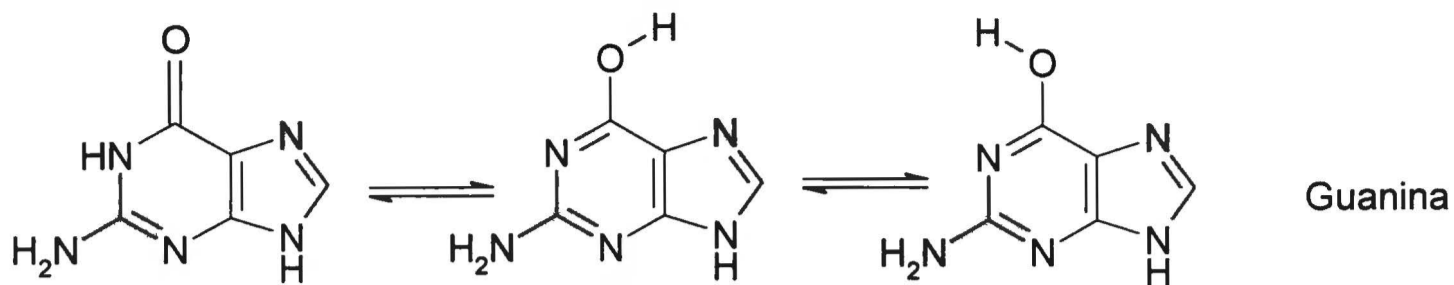
Fizykochemiczne jak i biologiczne właściwości cząsteczek kwasów nukleinowych zależą zarówno od sekwencji par zasad jak i od konformacji tych

makrocząsteczek, przez którą należy rozumieć formę przestrzenną, którą cząsteczki przyjmują w wyniku sumarycznego efektu wszystkich wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań. Wiele z czynników oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych znajduje się pod wpływem środowiska, którym otoczone są cząsteczki DNA, dlatego też czynniki zewnętrzne mogą modyfikować oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe.

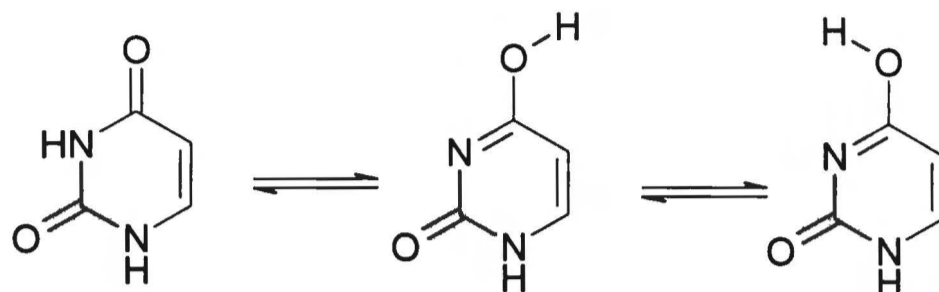
Badania kwasów nukleinowych wskazują, że nie tylko wiązania wodorowe mają istotny wpływ na trwałość ich struktury. W University of Rochester ^[1,2] prowadzono badania, podczas których tyminę zastępowano podobnym w kształcie, lecz nie tworzącym wiązań wodorowych dwufluorotoluenem. Okazało się, że podczas replikacji nici DNA, polimeraza DNA wybierała jako komplementarną zasadę dla dwufluorotoluenu adeninę. Co więcej ten sam enzym wybierał dwufluorotoluen jako partnera adeniny z prawie taką samą częstością jak tyminę.

Ważnym zjawiskiem określającym naturę wiązań wodorowych w kwasach nukleinowych jest tautomeria zasad azotowych, charakteryzowana przez równowagę ketonowo-enolową w przypadku guaniny, uracylu i tyminy oraz równowagę aminowo-iminową (*Rysunek 4*), w której może występować cytozyna i adenina.

Atom wodoru przyłączony do azotu pierścienia purynowego lub pirymidynowego jest zdolny do migrowania do innych wolnych azotów lub atomów tlenu tej samej cząsteczki. W cząsteczkach niepodstawionych zasad migracja wodoru może zachodzić w następujące miejsca: adenina z azotu N⁷-H na N⁹-H natomiast guanina z azotu N⁷-H na N⁹-H lub z N¹-H na N³-H, w pirymidynach z N¹-H na N³-H (*Rysunek 5*). W roztworze zasad kwasów nukleinowych część populacji cząsteczek znajduje się zatem w równowadze pomiędzy różnymi formami.



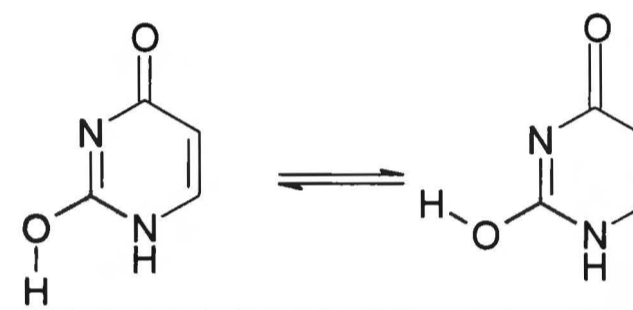
(=A)



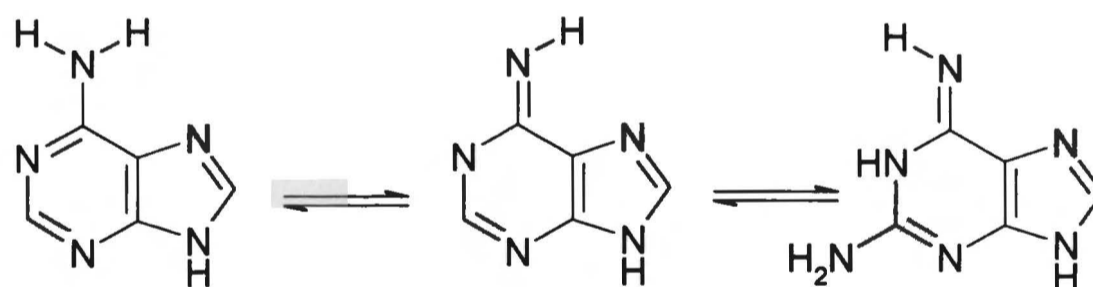
(=C)

Uracyl

formy ketonowe

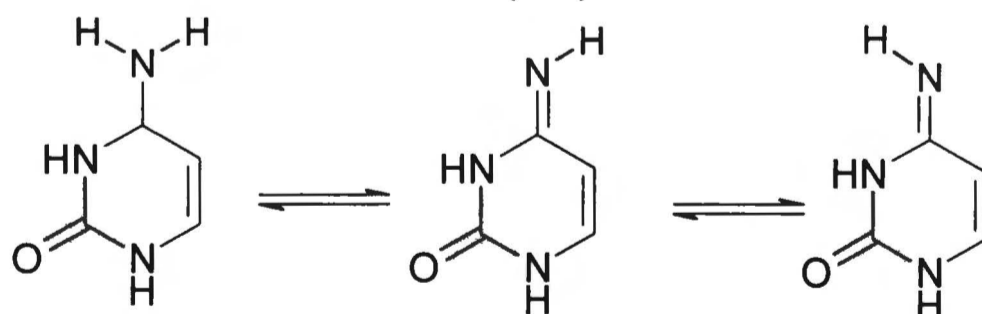


formy enolowe



(=G)

Adenina



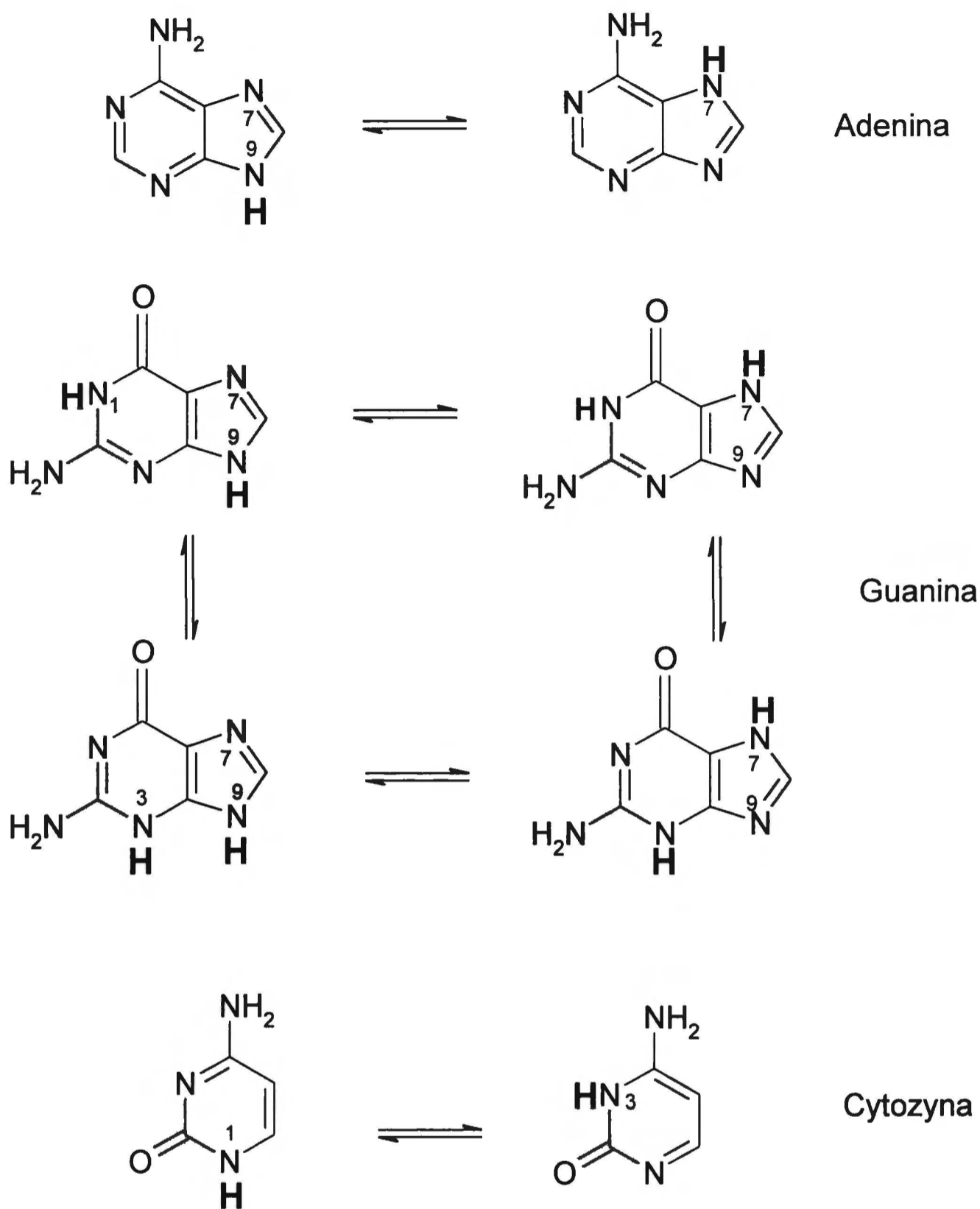
Cytozyna

(=U)

formy aminowe

formy iminowe

Rysunek 4. Ketonowo - enolowa i aminowo- iminowa tautomeria zasad kwasów nukleinowych



Rysunek 5. Możliwa migracja atomu wodoru w pierścieniu purynowym i pirymidynowym.

Tautomeria powoduje, że uracyl jak i guanina w formie enolowej mogą być rozpoznawalne odpowiednio jako cytozyna i adenina a cytozyna i adenina w formie iminowej odpowiednio jako uracyl i guanina (*Rysunek 4*). Takie zmiany własności zasad mogą zakłócać replikację kwasów zaproponowaną przez

Watsona i Cricka, wiadomo bowiem, że w kwasach oddziałują ze sobą określone zasady kwasów nukleinowych. Reguła to umożliwia powielanie kwasów nukleinowych, a pośrednio także tworzenie zgodnych z kodem genetycznym białek. Naturalnie występujące zasady kwasów nukleinowych występują w formach ketonowej i aminowej z populacją mniejszą niż 0.01 % formy enolowej i iminowej, i w procesie replikacji nici kwasu DNA rozpoznają odpowiedniego komplementarnego partnera. Mutacje spowodowane tautomerią zasad kwasów nukleinowych zdarzają się sporadycznie.

Tautomeria zasad kwasów nukleinowych była i jest szeroko badana różnymi metodami: UV, IR, NMR jak również metodami krystalograficznymi oraz mechaniki kwantowej [3,4]. Obszerny przegląd tych badań można znaleźć w monografii J. Elugero i innych „The Tautomerism of Heterocycles” [5] oraz w jednym z rozdziałów monografii W. Saengera „Principle of Nucleic Acid Bases” [6]. Wiele prac poświęconych jest badaniu tautomerii hydroksy- i metoksy-pochodnych cytozyny [7-12].

2. Zasady kwasów nukleinowych.

Heterocykliczne zasady azotowe (*Rysunek 2*), wchodzące w skład kwasów nukleinowych nazywane są zasadami kwasów nukleinowych.

Cytozyna, uracyl i tymina są pochodnymi pirymidyny, słabej zasady ($pK_a=1.23$) o temperaturze topnienia $22.5\text{ }^\circ\text{C}$. Ze względu na tworzenie wiązań wodorowych jakie tworzą wyżej wymienione pochodne pirymidyny, mają one wyższe temperatury topnienia. Uracyl, cytozyna i tymina topią się odpowiednio w temperaturach: $330\text{ }^\circ\text{C}$, powyżej $300\text{ }^\circ\text{C}$, $316\text{-}317\text{ }^\circ\text{C}$.

Uracyl jest znacząco słabszą zasadą od pirymidyny ($pK_a = -3.38$) natomiast cytozyna jest, w stosunku do pirymidyny, mocniejszą zasadą ($pK_a = 4.61$).

Drugą grupę zasad kwasów nukleinowych tworzą pochodne puryny: adenina i guanina. Puryna jest słabą zasadą ($pK_a = 2.30$); temperatura topnienia $216\text{ }^\circ\text{C}$. Adenina jest również związkiem o wysokiej temperaturze topnienia ($352\text{ }^\circ\text{C}$); jest mocniejszą zasadą od puryny ($pK_a = 4.25$). Guanina jest podobnie jak puryna słabą zasadą ($pK_a = 3.0$); topi się w temperaturze $350\text{ }^\circ\text{C}$.

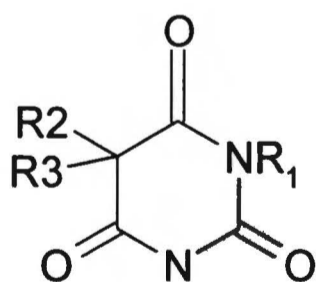
Wszystkie zasady kwasów nukleinowych zaliczane są do grupy związków hydrofobowych, ze względu na ich małą rozpuszczalność w wodzie: cytozyna ($0.076 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ [13]), uracyl ($0.027 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ [14]), tymina ($0.028 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ [15]), adenina ($0.008 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ [16]). Guanina jest uznawana za substancję nierozpuszczalną w wodzie i w większości organicznych rozpuszczalnikach.

Cechą charakterystyczną chemicznej budowy cząsteczek zasad kwasów nukleinowych jest występowanie grup funkcyjnych będących donorami i akceptorami wiązań wodorowych. Z istnienia tych grup wynika możliwość asocjacji cząsteczek zasad leżących w jednej płaszczyźnie z wytworzeniem wiązań wodorowych w sposób analogiczny jak w cząsteczkach DNA.

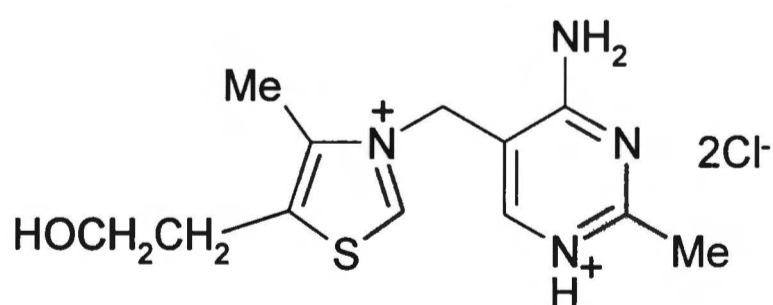
W grupie pochodnych i analogów zasad kwasów nukleinowych znajduje się szereg związków, które są uznawane za potencjalne leki z grupy antymetabolitów, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki zwłaszcza dla właściwego przebiegu replikacji DNA.

T. L. Gilchrist [17] podaje jako przykład heterocyklicznych związków (pochodnych pirymidyny) barbiturany, o strukturze podanej na *Rysunku 6a*, które przez długi okres czasu stanowiły ważną grupę leków uspokajających, ale które ze względu na ich toksyczność stopniowo były zastępowane przez inne leki. Pochodną pirymidyny jest również witamina B₁ o strukturze podanej na *Rysunku 6b*.

a)

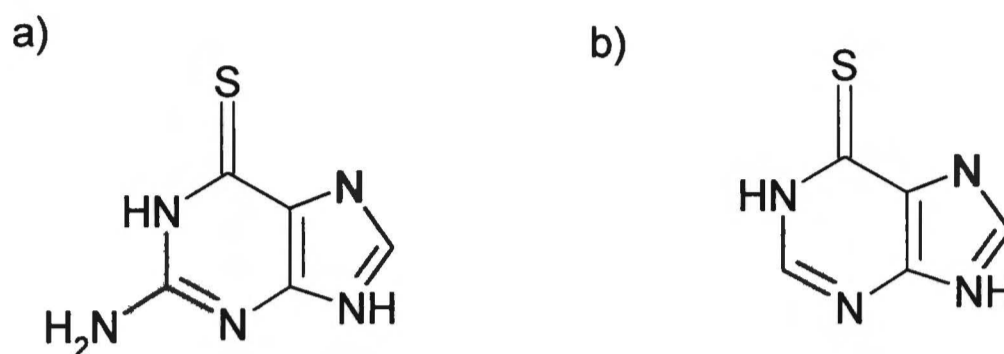


b)



Rysunek 6. Wzory strukturalne: a) barbituranów 6a ($R^1 = H$ lub grupa metylowa, R_2, R_3 – grupa alkilowa), b) witamina B₁.

Wiele analogów adeniny i guaniny jest testowane jako potencjalne leki chemioterapeutyczne. Tioguanina (*Rysunek 7a*) i merkaptopuryna (*Rysunek 7b*) są z powodzeniem stosowane w terapii ostrej białaczki.

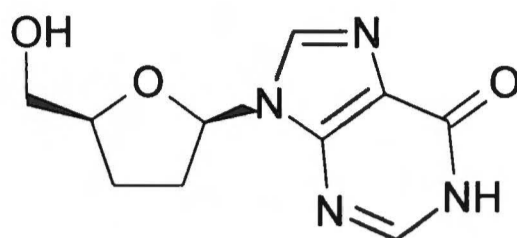


Rysunek 7. Wzory strukturalne: a) tioguaniny, b) merkaptopuryny.

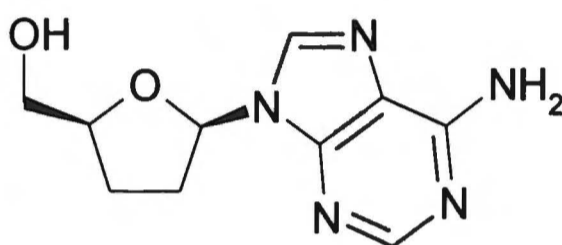
Oddziaływanie leków z grupy antymetabolitów z odpowiednimi enzymami polega bądź na zastępowaniu prawidłowego metabolitu, bądź na blokowaniu wiązania metabolitu z odpowiednim odcinkiem katalizującym enzymu. Leki z grupy antymetabolitów mogą powodować zaburzenie szlaku syntezy puryn (np. merkaptopuryna lub tioguanina), pirymidyn (np. arabinozyd cytozyny lub 5-fluorouracyl). Historia stosowania leków z grupy antymetabolitów jest niemal tak długa jak historia chemioterapii nowotworów. Leki tej grupy wciąż stanowią podstawę wielu programów chemioterapii wielolekowej, są też stosowane w monoterapii wielu złośliwych nowotworów. Szczególne zainteresowanie skierowane jest na zmodyfikowane nukleozydy z różnymi podstawnikami w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego. Istnieje duża grupa leków pochodnych 5-fluorodezoksyurydno-5'-monofosforanu (FdUMP) stosowanych w leczeniu wielu nowotworów (np. raka piersi).

Wiele analogów nuklezydów jest stosowane jako potencjalne leki zwalczające wirusa HIV, np. 2'3'dideoksyinozyna; ddl ^[18, 19] oraz 2'3'dideoksyadenozyna; ddA (*Rysunek 8a i 8b*). Związki te były również przedmiotem badań prowadzonych w Zakładzie Kalorymetrii ICHF PAN ^[20, 21].

a)



b)



Rysunek 8. Wzory strukturalne: a) 2'3'didezoksyinozyny, b) 2'3'didezoksyadenozyny.

Podstawą działania wszystkich leków z grupy antymetabolitów jest ich zdolność do wbudowywania się ich do łańcucha DNA, co prowadzi do hamowania replikacji. Jednocześnie w tym samym mechanizmie ulega zakłóceniu zdolność naprawy uszkodzeń DNA.

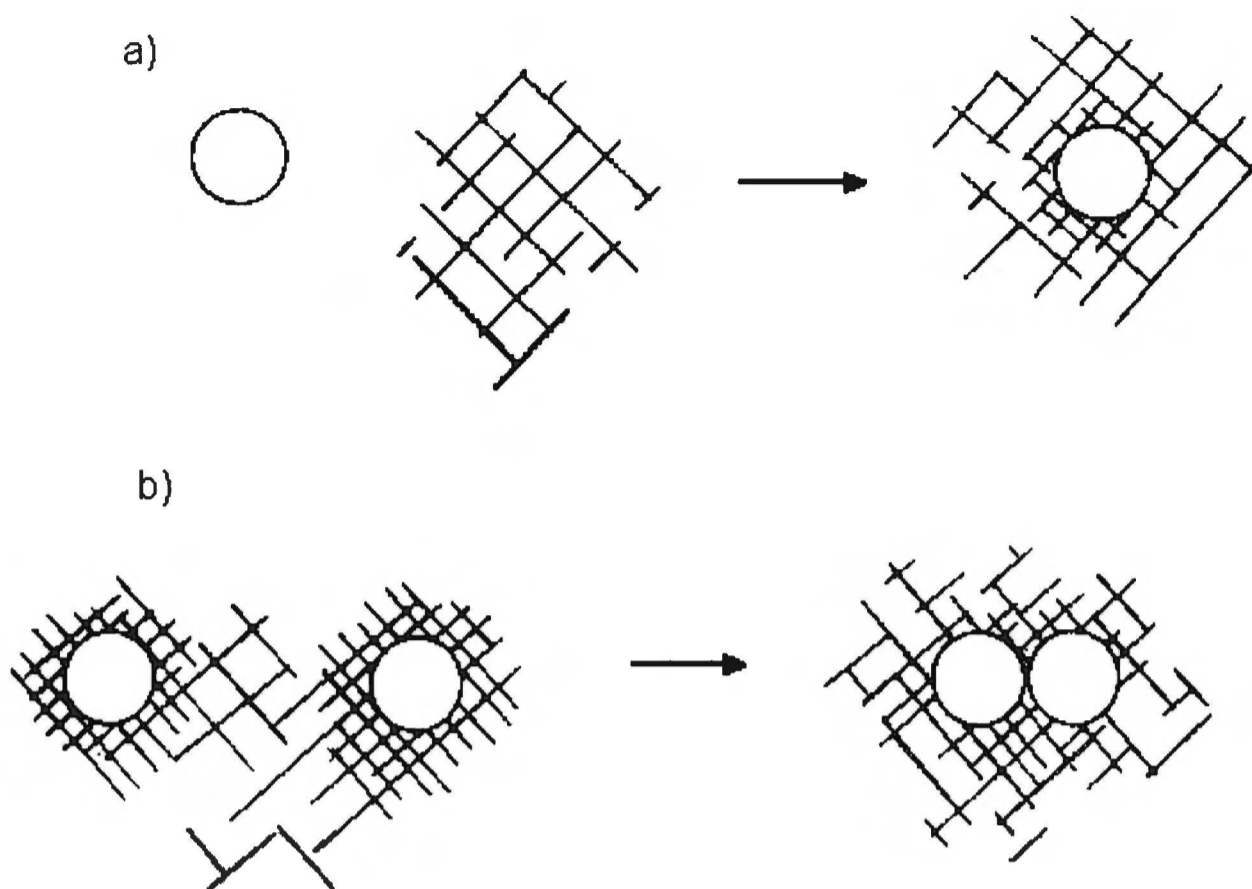
W ostatnich latach szeroko rozwinęły się badania nad lekami, które są analogami nukleozydów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki a zwłaszcza do właściwego przebiegu replikacji DNA. Związki te cechują się mniejszą, w porównaniu z lekami stosowanymi poprzednio, toksycznością. Do grupy tych związków należy między innymi, gemcytabina ^[22], nukleozydowa pochodna cytozyny. Badania kliniczne potwierdziły skuteczność gemcytabiny w leczeniu zaawansowanych postaci raka płuc, trzustki, sutka, jajnika, pęcherza moczowego i nerki.



3. Hydratacja hydrofobowa

Do znacznego rozwoju badań nad hydratacją hydrofobową przyczynił się W. Kauzmann ^[23], którego prace dotyczą roli oddziaływań niepolarnych grup w utrzymaniu trzeciorzędowej struktury białka. Oddziaływania te, nazwane przez W. Kauzmann „wiązaniami hydrofobowymi” odgrywają znaczną rolę w procesach biochemicznych, przede wszystkim w utrzymaniu biologicznie aktywnych struktur białek. Jako metodę wyjaśnienia występujących w nich oddziaływań W. Kauzmann przyjął konieczność prowadzenia badań prostych związków, z których zbudowane są makrocząsteczki. Związki te traktowane są jako modelowe. Ta koncepcja znalazła ogromną liczbę zwolenników, którzy podjęli podstawowe badania aminokwasów, peptydów i zasad kwasów nukleinowych w środowisku wodnym lub w rozpuszczalnikach organicznych. Nie mniej jednak istnieje również grupa przeciwników sposobu postępowania zalecanego przez Kauzmann. Twierdzą oni, że nawet najwszechstronniejsze badania wybranego związku modelowego nie mogą świadczyć wprost o oddziaływaniach występujących w dużych cząsteczkach, jakimi są białka i kwasy nukleinowe. Pomimo tej krytyki prowadzone są badania hydrofobowych oddziaływań tego rodzaju modelowych związków z wodą, które to badania dostarczają wiele cennych informacji.

Oddziaływaniem hydrofobowym (*Rysunek 9b*) jest oddziaływanie w roztworze cząsteczek apolarnych lub niepolarnych części cząsteczki pomiędzy sobą. Proces hydratacji hydrofobowej (*Rysunek 9a*) związany jest z tworzeniem uporządkowanych struktur cząsteczek wody wokół cząsteczki hydrofobowej, które ograniczają ich swobodę ruchu. Przeciwwstawianie się cząsteczek wody ograniczeniu ich ruchu przez rozpuszczone cząsteczki związków hydrofobowych jest główną przyczyną ograniczonej rozpuszczalności tych związków w wodzie. Pojęcie hydrofobowej hydratacji zostało rozwinięte między innymi w pracach G. Nemethy i H. A. Scheraga ^[24, 25], którzy opracowali termodynamiczno – statystyczną teorię tego procesu oraz przez A. Ben-Naim i współpracowników ^[26, 27].



Rysunek 9. Schemat przedstawiający a) hydrofobową hydratację, b) oddziaływania hydrofobowe.

Charakterystyka termodynamiczna związków hydrofobowych została przedstawiona w Tabeli 1. Przyjmuje się, że zmiana energii swobodnej w roztworach, w których występuje hydrofobowa hydratacja jest dodatnia ($\Delta_{solv}G^0 > 0$), podczas gdy roztwory związków polarnych charakteryzują się ujemną lub dodatnią zmianą energii swobodnej. Ponieważ zmiany entalpii w roztworach związków hydrofobowych mogą być zarówno dodatnie jak i ujemne, dodatnią wartość zmian energii swobodnej przypisuje się znacznemu, ujemnemu ($\Delta_{solv}S^0 < 0$) udziałowi entropowemu. Ten ujemny udział entropowy można identyfikować z tworzeniem się wokół niepolarnych cząsteczek uporządkowanych struktur złożonych z cząsteczek wody połączonych za pomocą wiązań wodorowych [23, 28, 29].

Tabela 1. Termodynamiczna charakterystyka hydrofobowej hydratacji w porównaniu z „normalnym” zachowaniem się cząsteczki polarnej w roztworze.

	hydrofobowe substancje	polarne substancje
$\Delta_{\text{soln}}G^{\circ}$	>0	<0, >0
$\Delta_{\text{soln}}H^{\circ}$	<0, >0	<0, >0
$\Delta_{\text{soln}}S^{\circ}$	<0	<0, >0
$\Delta C_{p,s}^{\circ}$	>0	≤ 0
V_2^{0E}	<0	≤ 0
α_2^{0E}	<0	>0
$\beta_2^{\circ}(298\text{ K})$	≤ 0	<0

B. Lee ^[30] oraz A. Hvidt ^[31] przedstawili pogląd, iż zmniejszenie entalpii solwatacji cząsteczek niepolarnych w wodzie wiąże się z endotermicznym efektem rozerwania wiązań wodorowych i wytworzeniem wnęki, w której to umieszczona zostaje cząsteczka substancji.

W roztworach wodnych związków hydrofobowych występuje ujemny przyrost nadmiarowych cząstkowych molowych objętości $V_2^{0,E}$. Świadczy to o tym, że w tych roztworach cząsteczka zajmuje mniejszą objętość niż w jej czystym stanie. Podobnie jak woda, bardzo rozcieńczone roztwory hydrofobowych substancji mają ujemną wartość współczynnika rozszerzalności termicznej β_2° (298 K) oraz ściśliwości $\alpha_2^{0,E}$.

Od dawna znana jest koncepcja poszukiwania udziałów poszczególnych grup funkcyjnych w wartościach funkcji termodynamicznych, które to udziały traktuje się jako miarę hydrofobowości związku. Na podstawie określonych wielkości termodynamicznych przeprowadza się analizę udziałów grupowych w wartościach funkcji termodynamicznych na podstawie zależności:

$$Y = Y_0 + \sum_i n_i Z_i \tag{3.1}$$

gdzie n_i jest liczbą grup i w cząsteczce, Z_i jest udziałem grupowym grupy i w wielkości termodynamicznej Y . Y_0 jest wielkością stałą.

Dopasowując do danych doświadczalnych model zakładający addytywność wkładów poszczególnych grup funkcyjnych, wyznacza się udziały grupowe w wartościach energii Gibbsa i entalpii hydratacji, a także cząstkowym molowym cieple właściwym i cząstkowej molowej objętości substancji rozpuszczonej w nieskończonym rozcieńczeniu. Obserwowane różnice często interpretuje się jako zmianę powierzchni hydrofobowej dostępnej dla rozpuszczalnika.

W badaniach zasad kwasów nukleinowych prowadzonych w Zakładzie Kalorymetrii ICHF PAN, niejednokrotnie jako miarę hydrofobowości związków przyjmowano udział, wkład, grup funkcyjnych, np. CH_2 , w wartość cząstkowych molowych wielkości: objętości i pojemności cieplnych. Dla metylowanych uracyli^[32] udział wnoszony przez grupę CH_2 w wartość cząstkowej molowej objętości wynosi odpowiednio: dla podstawienia na atomie węgla $16.31 \pm 0.24 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, zaś na atomie azotu $18.50 \pm 0.38 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Uzyskane rezultaty są zgodne z uzyskanymi dla węglowodorów^[33] i dla alifatycznych amidów^[34]. Udział w $\Delta C_{p,2}^\circ$ przypadający na grupę CH_2 w alkilouracylach^[35] wynosi $90 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, zaś podstawienie grupy CH_2 na atomie azotu odpowiada przyrostowi około $70 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$. Wartość ta jest zgodna z uzyskaną dla alifatycznych węglowodorów^[33].

Oddziaływaniom hydrofobowym poświęcono wiele monografii^[31, 36-38]. W ostatnich latach pojawiło się kilka prac, w których podaje się charakterystykę hydrofobowej hydratacji w układach biologicznych^[39-41]. Przedstawia się w nich zależności zmian entalpii swobodnej hydrofobowej hydratacji od powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika.

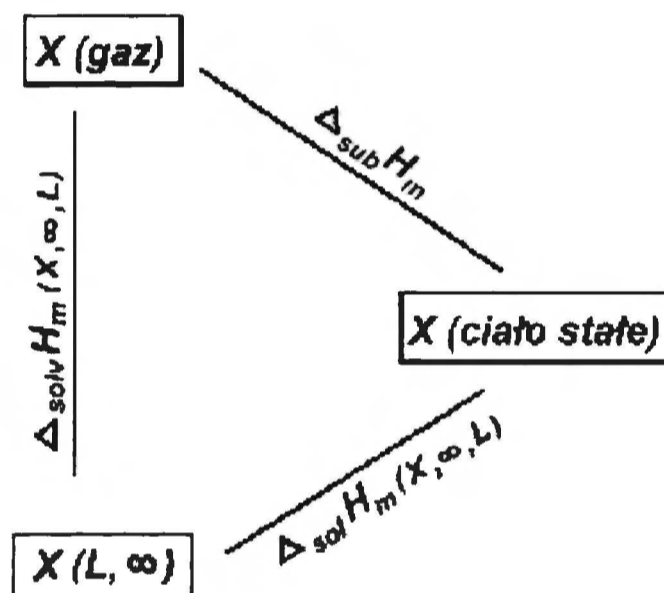
4. Kalorymetryczne badania roztworów.

Kalorymetria jest techniką pomiarową, która wykorzystywana jest dość intensywnie do badań roztworów jak i mieszanin. Roztworem nazywa się ciekłą lub stałą fazę, która zawiera więcej niż jedną substancję. W roztworze, rozróżnia się rozpuszczalnik i substancję rozpuszczoną. Układy, w których wszystkie składniki są traktowane jednakowo nazywamy mieszaninami.

W badaniach oddziaływań substancja rozpuszczona (X) – rozpuszczalnik (L) można wyróżnić trzy metody postępowania. Pierwsza z nich polega na wyznaczeniu na drodze półempirycznej entalpii oddziaływań $\Delta_{int}H_m$.

Zgodnie z tą metodą postępowania, przedstawioną graficznie na *Rysunku 10*, na podstawie doświadczalnie określonej entalpii rozpuszczania $\Delta_{sol}H_m(X, \infty)$ oraz entalpii sublimacji $\Delta_{sub}H_m$ wyznacza się entalpię solwatacji $\Delta_{solv}H_m(X, \infty)$, według następującej zależności:

$$\Delta_{solv}H_m(X, \infty) = \Delta_{sol}H_m(X, \infty) - \Delta_{sub}H_m \quad (4.1)$$



Rysunek 10. Metody wyznaczania entalpii solwatacji.

Entalpia solwatacji $\Delta_{solv}H_m(X, \infty)$ jest zmianą entalpii towarzyszącej przejściu 1 mola substancji X z fazy gazowej do roztworu nieskończenie rozcieńczonego. Stanowi ona sumaryczny efekt oddziaływań pomiędzy substancją rozpuszczoną i nieskończenie wielką ilością rozpuszczalnika. Wielkość $\Delta_{sub}H_m$ entalpii sublimacji związana jest z przejściem 1 mola badanej substancji znajdującej się w fazie stałej do fazy gazowej. Wyznaczona entalpia solwatacji odpowiada zatem, procesowi przejścia badanej substancji z fazy gazowej do cieklej z utworzeniem roztworu nieskończenie rozcieńczonego. Hipotetycznie ten

proces przejścia przebiega w dwóch etapach. W pierwszym z nich tworzona jest wnęka w rozpuszczalniku o objętości odpowiadającej objętości cząsteczki badanej substancji. W drugim etapie badana cząsteczka zostaje umieszczona w utworzonej wnęce i oddziałuje z otaczającym ją rozpuszczalnikiem. Oznacza to, że entalpia solwatacji może być wyrażona przy pomocy dwóch członów według zależności:

$$\Delta_{solv}H_m(X, \infty) = \Delta_{int}H_m - \Delta_{cav}H_m \quad (4.2)$$

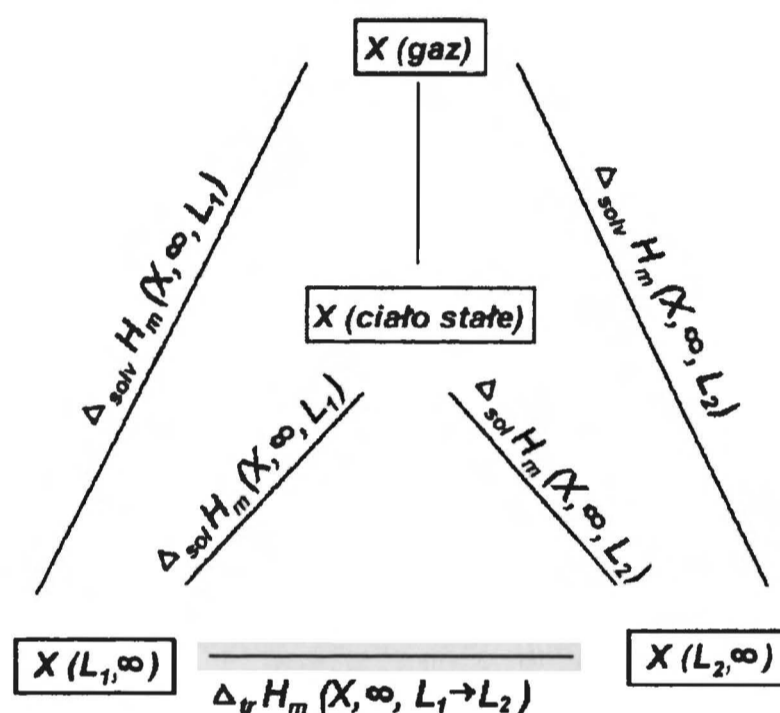
gdzie wielkość $\Delta_{cav}H_m$ odpowiada energii niezbędnej do utworzenia wnęki w ciekłej wodzie, natomiast $\Delta_{int}H_m$ odpowiada zmianom entalpii, towarzyszącym oddziaływaniom badanej substancji X z otaczającym ją rozpuszczalnikiem L.

Wielkość energii tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku, jak zostało przedstawione w rozdziale 8.2 tej pracy, zależy od wybranej metody jej określenia. Jej wartość liczbowa silnie zależy od zastosowanego algorytmu w obliczeniach powierzchni. Dla przykładu określona powierzchnia cząsteczki wody zgodnie z metodą L. Lavery i innych^[42] jest znacząco mniejsze niż ta określona przez J. L. Finney i innych^[43] oraz E. Silla i innych^[44].

Porównanie pomiędzy sobą wniosków wynikających z wyznaczenia wartości entalpii oddziaływania oraz entalpii solwatacji pokazuje, że wprawdzie wielkości te różnią się liczbowo między sobą nie mniej jednak charakter obserwowanych zmian jest taki sam. Obserwowany wpływ przestaniania grupami metylowymi polarnych i niepolarnych atomów pierścienia pirymidynowego uracylu, wskazywał identyczny sposób zmian w entalpii solwatacji i entalpii oddziaływań^[45].

Badania entalpii solwatacji pozwoliło ustalić dość interesujący sposób interpretacji uzyskanych wielkości. Znaleziono korelację pomiędzy entalpią solwatacji a własnościami strukturalnymi cząsteczek badanych związków np. z powierzchnią dostępną dla rozpuszczalnika. Ten sposób postępowania został przedstawiony w pracy^[45] dla metylowanych pochodnych uracylu. W cytowanej pracy podano zależności zmian w entalpiach hydratacji od zmiany powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika, spowodowanych wprowadzeniem grup funkcyjnych.

Ze względu na możliwość popełnienia znacznego błędu w wyznaczeniu wielkości entalpii solwatacji na skutek niedokładności określenia entalpii sublimacji lub braku możliwości jej wyznaczenia (np. w przypadku nietrwałych substancji), zostały rozwinięte prace termochemiczne przy użyciu innej metody postępowania. Polega ona na określeniu entalpii rozpuszczania w różnych rozpuszczalnikach oraz określenia entalpii przejścia pomiędzy tymi rozpuszczalnikami. Sposób postępowania w tej metodzie został przedstawiony graficznie na *Rysunku 11*.



Rysunek 11. Metoda wyznaczania entalpii przejścia.

Różnice w entalpiach rozpuszczania badanej substancji X w rozpuszczalnikach L_1 i L_2 dają wartość entalpii przejścia (równanie 4.3).

$$\begin{aligned} \Delta_{\text{tr}} H_m(X, \infty, L_1 \rightarrow L_2) &= \\ \Delta_{\text{sol}} H_m(X, \infty, L_2) - \Delta_{\text{sol}} H_m(X, \infty, L_1) &= \\ \Delta_{\text{sol}} H_m(X, \infty, L_2) - \Delta_{\text{sol}} H_m(X, \infty, L_1) & \end{aligned} \quad (4.3)$$

Entalpia przejścia $\Delta_{tr}H_m (X, \infty, L_1 \rightarrow L_2)$ odpowiada przeniesieniu 1 mola substancji rozpuszczonej X z rozpuszczalnika L_1 do rozpuszczalnika L_2 .

W ten sposób przy właściwym doborze rozpuszczalników istnieje możliwość doświadczalnego określania wpływu zmiany oddziaływań rozpuszczalnik – rozpuszczalnik. Powiązanie eksperymentalnie wyznaczonych funkcji przejścia z danymi strukturalnymi badanej substancji, jak przedstawiono w tej pracy, daje interesujące wyniki.

W badaniach wzajemnych oddziaływań rozpuszczona substancja (X) – rozpuszczalnik (L) stosuje się także metodę wyznaczania entalpii rozpuszczania w rozpuszczalnikach mieszanych. Pomiar ciepła rozpuszczania w rozpuszczalnikach dwuskładnikowych wykonanych w funkcji ich składu, dostarczają informacji dotyczących występowania określonych typów oddziaływań w roztworach np. hydratacji hydrofobowej.

Przedstawioną metodą wyznaczano m. in. entalpie rozpuszczania nieelektrolitów jak i elektrolitów, w rozpuszczalnikach dwuskładnikowych. Obszerny wywód na temat termochemicznych badań roztworów elektrolitów w różnorodnych rozpuszczalnikach i mieszaninach przedstawiono w pracy o charakterze monograficznym pt.: „Termochemiczne własności roztworów elektrolitów” S. Taniewska – Osińska, H. Piekarski [46].

G. Somsen i współpracownicy [47-51] podali następującą metodę określania oddziaływań w rozpuszczalnikach mieszanych. W pracy [47] entalpię rozpuszczania hydrofobowej substancji w mieszaninie wody i DMF przedstawiono jako funkcję ułamka molowego wody x_w :

$$\Delta_{sol}H^{\circ}(M) = \{ x_w \Delta_{sol}H^{\circ}(W^{\star}) + (1 - x_w) \Delta_{sol}H^{\circ}(DMF) \} + x_w^m Hb(W) \quad (4.4)$$

gdzie $\Delta_{sol}H^{\circ}(DMF)$ określa entalpię rozpuszczania w DMF, $\Delta_{sol}H^{\circ}(W^{\star})$ określa hipotetyczną entalpię rozpuszczania w czystej wodzie, bez entalpowego udziału efektu hydrofobowej hydratacji $Hb(W)$:

$$\Delta_{sol}H^{\circ}(W^{\star}) = \Delta_{sol}H^{\circ}(W) - Hb(W) \quad (4.5)$$

gdzie $Hb(W)$ jest wielkością charakteryzującą hydrofobowy charakter substancji.

Na podstawie analizy zależności entalpii rozpuszczania od składu rozpuszczalnika woda + DMF dla wielu substancji różniących się budową G. Somsen i współpracownicy zapostulowali występowanie trzech typów oddziaływań rozpuszczalnika z substancją rozpuszczoną:

- hydratacja hydrofobowa grup niepolarnych substancji rozpuszczonej, związana z utworzeniem wokół tych grup uporządkowanej struktury zbudowanej z m cząsteczek wody i opisana reakcją chemiczną:



Prowadząc do następującego wyrażenia na wkład hydratacji hydrofobowej od zależności entalpii rozpuszczania od ułamka molowego x_D DMF w rozpuszczalniku:

$$\Delta_{sol}H^{HH}(x_D) = (1-x_D)^m H_b \quad (4.7)$$

gdzie H_b jest stałą zależną od rodzaju substancji X .

- specyficzne oddziaływania cząsteczki X z cząsteczkami rozpuszczalnika.
- zachowanie określane jako idealne, charakteryzujące wielkość entalpii rozpuszczania po wyodrębnieniu z niej dwóch powyższych udziałów:

$$\Delta_{sol}H^{id}(x_D) = \Delta_{sol}H(W) (1-x_D) + \Delta_{sol}H(D) x_D \quad (4.8)$$

gdzie $\Delta_{sol}H(W)$, $\Delta_{sol}H(D)$ są wartościami entalpii rozpuszczania odpowiednio w wodzie i DMF.

Jedną z metod postępowania w ocenie oddziaływań ciało rozpuszczone – rozpuszczalnik przedstawia teoria McMillana – Mayera ^[52-55]. Teoria ta szeroko rozwinięta się w analizie oddziaływań międzycząsteczkowych w rozcieńczonych roztworach elektrolitów i nieelektrolitów w rozpuszczalnikach o różnorodnej naturze. Posiada ściśle określone sposoby obliczania odpowiednich parametrów.

Wywodzące się z teorii McMillana – Mayera zastosowanie koncepcji entalpowych współczynników oddziaływań zostało przedstawione w pracy H. Piekarskiego ^[56] pt.: „Zastosowanie koncepcji entalpowych współczynników oddziaływania w badaniach nad oddziaływaniami elektrolit – nieelektrolit w rozcieńczonych roztworach wodnych”.

Zgodnie z tą koncepcją stężeniowe zależności dowolnej nadmiarowej molowej termodynamicznej własności roztworu J^E może być wyrażona w postaci rozwinięcia wirialnego w szereg względem stężenia m_x :

$$J^E = h_{xx}m_x^2 + h_{xxx}m_x^3 + \dots \quad (4.9)$$

Jeśli wielkością tą jest entalpia wówczas równanie przyjmuje postać:

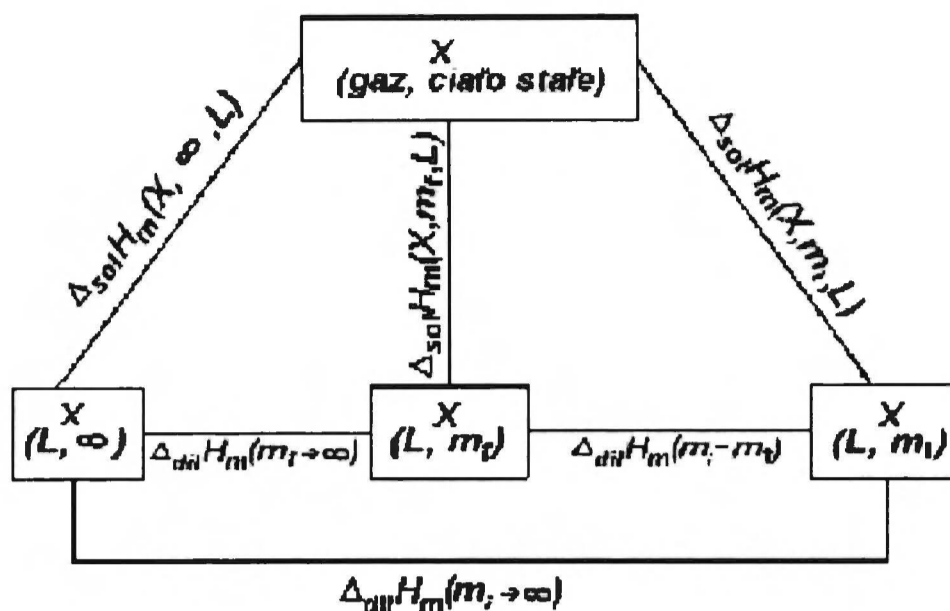
$$H^E(m_x) = h_{xx}m_x^2 + h_{xxx}m_x^3 + \dots \quad (4.10)$$

Współczynniki wirialne h_{xx} , h_{xxx} formalnie charakteryzują podwójne, potrójne wzajemne oddziaływanie cząsteczek rozpuszczonej substancji X w roztworze. Z modelu McMillana – Mayera wynika, że jedynie współczynniki oddziaływania pary h_{xx} stanowią miarę efektu oddziaływania pomiędzy dwiema cząsteczkami w roztworze. Natomiast współczynniki wyższego rzędu zawierają udziały pochodzące od współczynników niższego rzędu.

Zastosowanie procedury wyznaczania współczynników oddziaływań h_{xx} wymaga wykonania precyzyjnego kalorymetrycznego doświadczenia, które daje niepodważalne wyniki w obszarze roztworów bardzo rozcieńczonych.

Entalpowe współczynniki oddziaływań można wyznaczyć doświadczalnie na podstawie kalorymetrycznych pomiarów: entalpii rozcieńczania układów dwuskładnikowych, entalpii mieszania dwóch roztworów substancji X_1 i X_2 w rozpuszczalniku L oraz entalpii rozpuszczania substancji X_1 w mieszaninie $X_2 +$ rozpuszczalnik L lub substancji X_2 w mieszaninie $X_1 + L$.

Sposób wyznaczania entalpii rozcieńczania, został przedstawiony na *Rysunku 12*.



Rysunek 12. Sposób wyznaczania entalpii rozcieńczenia.

W procesie rozcieńczenia mieszamy roztwór o molalności m_i z rozpuszczalnikiem L i otrzymujemy roztwór o molalności m_f . Molową entalpię rozcieńczenia można przedstawić jako:

$$\Delta_{dil}H_m/(m_f - m_i) = h_{xx} + h_{xxx}(m_f + m_i) \quad (4.11)$$

Rola metody postępowania w badaniach kalorymetrycznych w dużym stopniu zależy od dokładności określenia zmian przejścia układu z jednego stanu równowagi w drugi. Ten fakt ma niezwykle znaczenie w wykorzystaniu danej metody dla badania biologicznych, modelowych substancji w rozpuszczalnikach czystych jak i mieszanych.

5. Częstkowe molowe wielkości

Ze względu na podane w pracy wartości cząstkowych molowych objętości w rozdziale tym zostały podane podstawowe pojęcia związane z cząstkowymi molowymi wielkościami.

Przy rozpatrywaniu własności roztworu dwu lub wieloskładnikowego istotnym jest określenie, jaka część całkowitej wartości danej wielkości

termodynamicznej jest przypisywana każdemu z jego składników. W tym celu wykorzystuje się pojęcie cząstkowej molowej wielkości.

Jeżeli rozpatrywaną wielkość termodynamiczną określimy symbolem Y (może nią być objętość, pojemność cieplna, entalpia, entropia lub energia swobodna Gibbsa) to wówczas cząstkowa molowa wielkość dla składnika i określana jest jako:

$$Y_i = (\partial Y / \partial n_i)_{p, T, n_1, n_2, \dots, n_j \neq i} \quad (5.1)$$

Zdefiniowana w ten sposób wielkość określa prędkość zmian wartości Y roztworu ze zmianą liczby moli n składnika przy zachowaniu stałej liczby moli wszystkich pozostałych składników jak również stałości ciśnienia i temperatury. Np. jeżeli rozpatrywaną wielkością jest objętość, wówczas cząstkowa molowa objętość składnika i roztworu odpowiada zmianie objętości roztworu ΔV , która ma miejsce po dodaniu Δn_i moli składnika i , podzielonej przez liczbę Δn_i dodanych do roztworu moli składnika i , przy czym cząstkową molową objętość wyznacza się przy spełnieniu warunku, że Δn_i dąży do zera oraz przy założeniu stałości temperatury i ciśnienia :

$$V_i = (\Delta V / \Delta n_i)_{p, T} \quad \Delta n_i \rightarrow 0 \quad (5.2)$$

W celu doświadczalnego wyznaczenia cząstkowych molowych wielkości korzysta się z wielkości, określanej jako pozorna molowa wielkość substancji rozpuszczonej.

Pozorna molowa jest zdefiniowana jako wartość wielkości Y danego roztworu pomniejszonej o wartość wielkości Y dla tego samego roztworu w przypadku usunięcia z niego składnika i podzielona przez liczbę moli n_i tego składnika. Ogólnie pozorna molowa wielkość składnika i może być przedstawiona jako równa:

$$Y_i^\phi = (Y_{\text{dla danego roztworu}} - Y_{n_i=0}) / n_i \quad (5.3)$$

Dla roztworu, w którym substancja i znajduje się w nieskończonym rozcieńczeniu lub inaczej dla roztworu zawierającego skończoną liczbę moli substancji i rozpuszczonej w nieskończonej ilości rozpuszczalnika, wartość pozornej molowej własności roztworu jest identyczna z wartością cząstkowej molowej własności roztworu, a tym samym:

$$(Y_i^\phi)_{ni=0} = (Y_i)_{ni=0} \quad (5.4)$$

W celu wyznaczenia cząstkowej molowej wartości wyznacza się więc wartości pozornych molowych wartości dla różnych stężeń substancji i a następnie wyznacza się zależności:

$$Y_i^\phi = f(m) \quad (5.5)$$

gdzie m jest stężeniem substancji i .

6. Termodynamiczne badania zasad kwasów nukleinowych i ich metylowanych pochodnych.

Badania zasad kwasów nukleinowych i ich pochodnych są przedmiotem intensywnych badań termodynamicznych od wielu lat.

Szczególnie intensywnie badane były struktury tych związków. W monografii W. Saengera pt. „Principles of Nucleic Acid Structure”^[6] podane są w obszernym rozdziale własności strukturalne i konformacyjne zasad kwasów nukleinowych.

Badania termodynamiczne roztworów zasad kwasów nukleinowych zostały rozpoczęte w latach siedemdziesiątych, kiedy M. Kilday, za pomocą kalorymetru adiabatycznego, wyznaczyła entalpie rozpuszczania czterech zasad heterocyklicznych w wodzie: cytozyny^[13], uracylu^[14], tyminy^[57] i adeniny^[16] oraz adeniny w metanolu i etanolu^[58]. Wyznaczona została także entalpia rozpuszczania tyminy w etanolu^[59].

T. T. Herskovits i inni [15] oraz R. L. Scchrugs i inni [60] określili rozpuszczalność zasad w wodzie. Zajmowano się także rozpuszczalnością w chloroformie i butanolu [61], a także uracylu i tyminy w metanolu [62].

Szereg prac zawiera dane dotyczące termodynamiki przeniesienia cząsteczek zasad kwasów nukleinowych pomiędzy różnymi rozpuszczalnikami z wody do DMSO [63, 64, 65], z wody do metanolu [66] oraz z wody do metanolu i DMF [67].

Badania wskazują, że zasady kwasów nukleinowych są to związki hydrofobowe, trudno rozpuszczalne w wodzie. Pochodne tych związków są lepiej rozpuszczalne nie mniej jednak określone parametry termodynamiczne świadczą, że są to również typowe związki hydrofobowe.

Wyznaczone i przedstawione w literaturze wielkości termodynamiczne dla cytozyny, uracylu, tyminy i adeniny zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Własności termodynamiczne zasad kwasów nukleinowych.

	$\Delta_{sol}H_m^\infty$ [kJ · mol ⁻¹]	$C_{p,2}^0$ [J · mol ⁻¹ · K ⁻¹]	V_2^0 [mol · cm ⁻³]	$\Delta_{sub}H_m$ [kJ · mol ⁻¹]	Rozpuszczalność [mol · kg ⁻¹]
Cytozyna	27.2 ± 4.0 [13]	168.3 [70]	73.7 [70]	150.6 [74]	0.076 [13]
	21.55 ± 0.25 [68]	208 ± 21 [13]	73.6 [71]	176 ± 10 [75]	
	32.2 [60]	172.4 ± 4 [71]	73.15 [72]	167 ± 10 [76]	
		176 ± 6 [72]		147.2 ± 2.6 [77]	
Uracyl	26.75 ± 0.23 [67]	178 ± 15 [14]	72.29 [71]	130.82 [78]	0.0269 ± 0.0013 [14]
	29.3 ± 1.2 [14]	152 ± 4 [71]	71.94 [72]	130.6 ± 4.0 [79]	
	26.78 ± 0.84 [68]	233 [63]		126.5 ± 2.2 [80]	
	28 [60]	153 ± 6 [72]		120.5 ± 5.2 [81]	
	137 [73]		121.7 [74]		
Tymina	23.35 ± 0.14 [67]	256 ± 26 [58]	88.75 [69]	131.3 ± 4.0 [77]	0.0278 [15]
	24.32 ± 0.70 [57]	241 ± 4 [71]	88.49 [72]	138 ± 10 [76]	
		239 ± 6 [72]		134.1 ± 4.2 [80]	
		320 [63]		124.3 [81]	
		220 [73]		125.7 ± 3.6 [77]	
	339 [59]		124.4 ± 1.3 [88]		
Adenina	39.9 ± 0.7 [69]	226 ± 11 [16]		144.2 ± 2.0 [99]	0.008 ± 0.0004 [16]
	33.47 ± 1.00 [16]			137.7 ± 2.2 [99]	
				126.3 [74]	
				110 [82]	
				108.7 [82]	
		109.2 [83]			

Badania oddziaływań pirymidynowych pochodnych zasad kwasów nukleinowych jako modelowych związków hydrofobowych stały się tematem szeroko zakrojonych prac nad wyznaczeniem własności termodynamicznych, które to badania są od wielu lat prowadzone w Zakładzie Kalorymetrii ICHF. Badano wpływ modyfikacji cząsteczek zasad kwasów nukleinowych na wartość ciepła rozpuszczania ^[84-89], cząstkowych molowych wielkości ^[70, 73, 90-98], cząstkowych molowych pojemności cieplnych oraz objętości. Wiele prac poświęcono wyznaczeniu entalpii sublimacji ^[99-104].

Do badań zastosowano metodę przestaniania podstawowych grup pierścienia zasady przez grupę metylową lub inną grupę funkcyjną a następnie obserwowano, jakie zmiany powoduje to przestanianie tj. usuwanie tych grup z bezpośredniego oddziaływania ze sferą hydratacyjną. Była to główna przyczyna wyboru pochodnych metylowych, ale wyboru takiego dokonano także ze względu na fakt, że metylacja jest jednym z ważnych sposobów modyfikacji kwasów nukleinowych, a w pewnych przypadkach zmienia specyfikę ich cząsteczek.

Badania metylowych pochodnych kwasów nukleinowych dowodzą, że mogą one dostarczyć wielu istotnych informacji dotyczących oddziaływania poszczególnych grup i fragmentów pierścieni z rozpuszczalnikiem. Zarówno entalpia rozpuszczania jak i entalpia sublimacji zmniejsza się wraz z liczbą grup CH₂. Najbardziej interesujący wydaje się fakt, że entalpia hydratacja uracyli zmienia się wraz z grupą liczb CH₂, ale także ze zmianą miejsca podstawienia na pierścieniu pirymidynowym. Zaobserwowano efekty cieplne związane z występowaniem hydrofobowej hydratacji niepolarniej części pierścienia cząsteczek zasad kwasów nukleinowych. Stwierdzono, że grupy alkilowe podstawiane po niepolarniej części pierścienia cząsteczek zasad zwiększają entalpię hydratacji o wartość dużo większą niż w przypadku analogicznego podstawienia po stronie polarnej pierścienia cząsteczki. Podstawienie atomu wodoru przez grupę metylową na atomie węgla C⁵ lub C⁶ cząsteczki uracylu tj. po stronie apolarnej pierścienia, powoduje zmianę w entalpii hydratacji o wartość średnią równą 9.8 kJ·mol⁻¹ i jest ta wartość, jak stwierdzono, praktycznie równa wartości określonej dla alifatycznych węglowodorów ^[33]. Podstawienie grupy metylowej na atomie azotu N¹ lub N³ powoduje zmniejszenie entalpii hydratacji o wartość bliską -2 kJ·mol⁻¹.

Na podstawie porównania wartości zmian entalpii oddziaływania na skutek podstawienia grup metylowych w cząsteczkach uracylu i adeniny stwierdzono silniejsze oddziaływanie z wodą polarnej części pierścienia pirymidynowego w stosunku do pierścienia purynowego.

W serii prac poświęconych termochemii wodnych roztworów zasad kwasów nukleinowych dokonano obliczeń entalpii potrzebnej do utworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku oraz entalpii oddziaływania^[86-89].

Prowadzono również badania czy wartości cząstkowych molowych objętości i pojemności cieplnych są sumą udziałów wnoszonych przez poszczególne grupy funkcyjne^[92-96]. Zostało potwierdzone, że dla badanych związków istnieje zależność pomiędzy wartościami cząstkowych molowych objętości i pojemności cieplnych a liczbą grup CH₂. W cząstkowych molowych objętościach i pojemnościach cieplnych przyrost w ich wartościach zależy, podobnie jak w entalpiach hydratacji, również od miejsca podstawienia grupy CH₂. Wartość udziału grupy CH₂ różni się dla związków podstawionych na atomach azotu i węgla.

W grupie związków, charakteryzujących się zwartą budową tak jak w cyklooligometylenouracylach wartości wkładu grupy CH₂ w cząstkowe molowe objętości i pojemności cieplne różniły się nieco od obserwowanych zmian dla alkilowych pochodnych. Te obserwacje są zgodne z efektami obserwowanymi dla cykloalkanów i innych związków cyklicznych^[34].

W celu określenia zależności pomiędzy własnościami objętościowymi cząsteczki rozpuszczonej i parametrami strukturalnymi W. Zielenkiewicz i J. Poznański^[32, 105, 106] podali nowy model opisu własności objętościowych cząsteczki. Zakłada się w nim, że gęstość rozpuszczalnika w otoczce solwatacyjnej zależy od struktury i polarności cząsteczki. Przyjmuje się przy tym, że badany roztwór jest na tyle rozcieńczony, że każda cząsteczka ma własną otoczkę solwatacyjną o gęstości $d_{1,solv}$ i objętości $V_{1,solv}$, określoną przez toczenie kulki o promieniu równym promieniowi cząsteczki wody wokół powierzchni Van der Waalsa cząsteczki rozpuszczonej. Miarą oddziaływań cząsteczki z rozpuszczalnikiem jest względna gęstość otoczki solwatacyjnej wyrażona poprzez różnicę gęstości w otoczce solwatacyjnej i gęstości czystej wody względem gęstości czystego rozpuszczalnika. Różnica ta odpowiada różnicy pomiędzy objętością molekularną a cząstkową molową objętością względem objętości

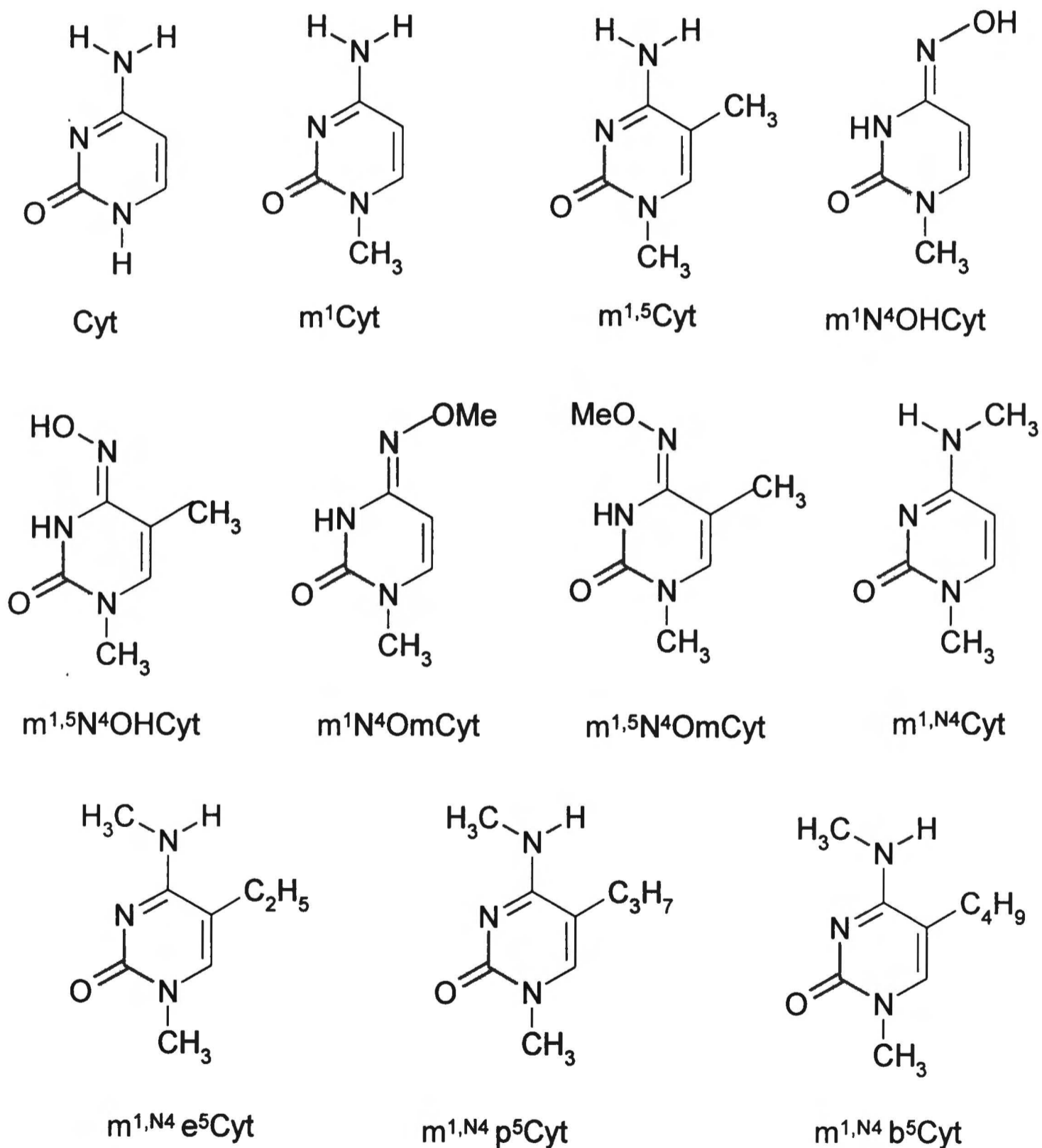
otoczki solwatacyjnej. Tak wyrażony parametr określono symbolem α . Parametr α ma dla badanych związków zawsze wartość ujemną i zależy od liczby grup CH_2 , jak i miejsca podstawienia tych grupy. Ujemna wartość parametru α wskazuje na to, że gęstość wody w otoczce solwatacyjnej jest mniejsza niż w czystej wodzie. Parametr α zależy liniowo od polarności badanych związków według zależności $\alpha = \alpha_0 + aP$.

Na podstawie danych dla serii związków hydrofobowych, takich jak: alkany, aminy, diaminy, dialkiloaminy, trialkiloaminy, aminy cykliczne, cykloalkiloaminy, alkohole, diole, cykliczne etery i oksany, amidy, ketony i cykliczne ketony stwierdzono ^[105, 106], że parametr α maleje gdy wzrasta hydrofobowość substancji. Dla wyżej wymienionych serii związków jak i dla metylowanych uracyli ^[32] znaleziono korelacje $\alpha = f(P)$. Parametr α jest uzależniony od założeń przyjętych do obliczeń objętości otoczki solwatacyjnej. Okazało się, że dogodnie jest korzystanie z innego parametru, który określono jako różnicę pomiędzy cząstkową molową objętością a objętością molekularną i przedstawiono za pomocą symbolu β . Parametr ten został porównany ze zmianami energii swobodnej roztworów grupy węglowodorów ^[105].

7. Materiały i metody badań.

7.1. Obiekty badań.

Obiektem przeprowadzonych badań była cytozyna i jej metylo-, metoksy- i hydrokso- pochodne. Wzory strukturalne związków przedstawiono na *Rysunku 13*.

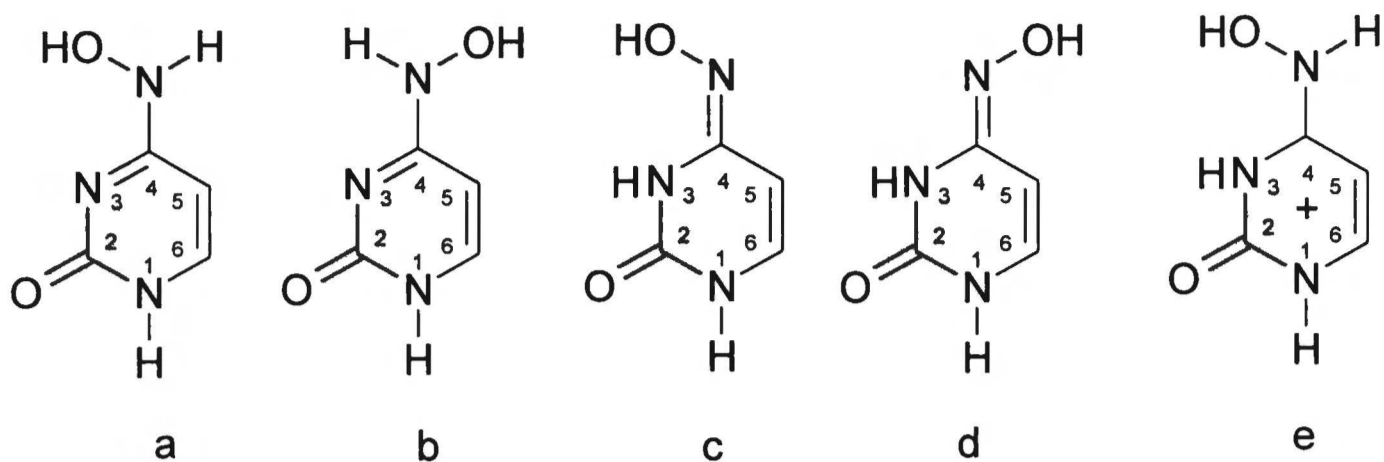


Rysunek 13. Wzory strukturalne badanych związków.

Trzy z badanych związków: cytozynę (Cyt), (Lot 16H1023); 1-metylocytozynę ($m^1\text{Cyt}$), (Lot 93H0377) oraz 1,5-dwumetylocytozynę ($m^{1,5}\text{Cyt}$), (Lot 83F0667) zakupiono w firmie Sigma. Pozostałe pochodne cytozyny: 1-metylo- N^4 -hydroksycytozyna ($m^1\text{N}^4\text{OHCyt}$); 1,5-dwumetylo- N^4 -hydroksycytozyna ($m^{1,5}\text{N}^4\text{OHCyt}$); 1-metylo- N^4 -metoksycytozyna ($m^1\text{N}^4\text{OmCyt}$); 1,5-dwumetylo- N^4 -metoksycytozyna ($m^{1,5}\text{N}^4\text{OmCyt}$), 1, N^4 -dwumetylocytozyna ($m^{1,\text{N}^4}\text{Cyt}$); 1, N^4 -dwumetylo-5-etylocytozyna ($m^{1,\text{N}^4}\text{e}^5\text{Cyt}$); 1, N^4 -dwumetylo-5-propylocytozyna ($m^{1,\text{N}^4}\text{p}^5\text{Cyt}$) i 1, N^4 -dwumetylo-5-butylocytozyna ($m^{1,\text{N}^4}\text{b}^5\text{Cyt}$) były zsyntetyzowane w laboratorium prof. dr M. Damińskiego w Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Związki otrzymano do badań po ich identyfikacji i zapewnieniu odpowiedniej czystości, uzyskanej przez wielokrotną krystalizację oraz sublimację próżniową. W celu ich identyfikacji były wykonane widma masowe (LKB 9000S) z zastosowaniem strumienia fotonów o energii 15-eV i 20-eV oraz widma ^1H NMR (Bruker 300 MHz). Czystość związków, conajmniej 99.5 %, potwierdziły pomiary wykonane przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego DSC (DuPont 2100) [107, 108].

Równolegle do wykonywanych przeze mnie pomiarów kalorymetrycznych dr K. Suwińska z ICHF PAN przeprowadziła analizę krystalograficzną badanych związków metodą dyfrakcji promieni Roentgena, przy zastosowaniu dyfraktometru rentgenowskiego CAD-4 wyposażonego w monochromator grafitowy [109]. Badania te wykazały, że pochodne cytozyny podstawione w pozycji N^4 grupą metoksy- lub hydroksy- (*Rysunek 14a, 14b*) występują jako formy iminowe azotu N^4 z atomem tlenu grupy hydroksy- lub metoksy- umieszczonym nad atomem azotu N^3 (konformacja cis; *Rysunek 14c*).

Obliczenia kwantowo-mechaniczne przeprowadzone przez A. Lesia i innych [9] dla $m^1\text{N}^4\text{OHCyt}$ oraz wyniki spektroskopii UV [6] potwierdzają dominację formy imino azotu N^4 . Wynika z nich także, że oba konformery cis i trans wiązania $\text{N}^4\text{-O}(\text{N}^4)$ istnieją ze sobą w równowadze. Wyniki analizy strukturalnej [109] wskazują, że podstawienie grupy CH_3 na atomie węgla C^5 , 1-metylo- N^4 -hydroksycytozyny powoduje oddziaływanie pomiędzy atomem $\text{O}(\text{N}^4)$ i grupą $\text{CH}_3(\text{C}^5)$, które to oddziaływanie silnie destabilizuje konformacje trans (*Rysunek 14d*) $\text{N}(3)\text{-C}(4)\text{-N}^4\text{-O}(\text{N}^4)$ wiązania $\text{C}(4)\text{-N}^4$.



Rysunek 14. Przykładowe formy tautomeryczne i konformacyjne N^4 pochodnych cytozyny.

Powyższe fakty wskazywały, że badane N^4 hydroksy- i metoksy- pochodne cytozyny mogą występować w roztworach w dwóch konformacjach $O(N^4)$, w których tlen grupy metoksyłowej lub hydroksylowej znajduje się odpowiednio nad atomem azotu N^3 (forma iminowa, cis, Rysunek 14c) lub atomem węgla C^5 (forma iminowa, trans, Rysunek 14d).

Dla roztworów 1-metylo- N^4 -hydroksycytozyny oraz 1,5-dwumetylo- N^4 -hydroksycytozyny w wodzie i metanolu wykonano widma 1H NMR. Były one konieczne, jak to zostanie przedstawione w dalszej części pracy do interpretacji wyników udziałów grupowych. Oznaczenia przeprowadzono w temperaturze 298.15 K przy zastosowaniu spektrometru Unity Plus 500 MHz firmy Varian.

Jako rozpuszczalniki zastosowano metanol i N,N-dwumetyloformamid. Metanol, chemicznie czysty (POCH Gliwice) w celu usunięcia wody dodatkowo destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem (Zakład Doświadczalny CHEMIPAN w Warszawie) tak, że jego stopień zawodnienia określony metodą K. Fischera wynosił 0.01%. Następnie był on przechowywany w hermetycznie zamkniętych, szklanych ampułkach, które otwierano bezpośrednio przed rozpoczęciem pomiaru.

Chemicznie czysty N,N-dwumetyloformamid (POCH Gliwice) był destylowany pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymywany w ten sposób rozpuszczalnik przechowywano nad sitami molekularnymi 4Å, przez co utrzymywano przez czas potrzebny na wykonanie serii pomiarów zawartość wody nie większą niż 0.01 %.

7.2. Metody doświadczalne badań.

Badania doświadczalne miały na celu: określenie entalpii rozpuszczania i cząstkowych molowych objętości badanych związków w metanolu i DMF oraz wyznaczenie prężności pary i entalpii sublimacji badanych substancji.

Ponizej przedstawiono opis stosowanych metod, szczególną uwagę poświęcając skonstruowanemu dla celów tej pracy przyrządowi do oznaczeń prężności pary i entalpii sublimacji metodą przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą.

7.2.1. Wyznaczanie ciepła rozpuszczania $\Delta_{sol}H_m$.

Entalpie rozpuszczania w metanolu i DMF określono na podstawie pomiarów efektów cieplnych rozpuszczania badanych substancji w zakresie stężeń od 0.0007 do 0.0034 mol·kg⁻¹ w temperaturze 298.15 K. Oznaczenia wykonano dla: cytozyny, 1-metylocytozyny, 1,5-dwumetylocytozyny, 1-metylo-N⁴-hydroksycytozyny, 1,5-dwumetylo-N⁴-hydroksycytozyny, 1-metylo-N⁴-metoksycytozyny, 1,5-dwumetylo-N⁴-metoksycytozyny. Pomiaru wykonano za pomocą kalorymetru typu „isoperibol”, o czułości 0.01 J·min⁻¹, stałości temperatury ± 0.01 K oraz objętości naczynia kalorymetrycznego 80 cm³, kalorymetru skonstruowanego przez dr A. Zielenkiewicz w Zakładzie Kalorymetrii Instytutu Chemii Fizycznej PAN ^[110]. Przyrząd ten był uprzednio stosowany do wyznaczenia ciepła rozpuszczania wyżej wymienionych związków w wodzie ^[107].

Wykonanie pomiaru rozpoczynano od umieszczenia cienkościennej, szklanej ampułki z odważoną ilością badanej substancji (5 ÷ 20 mg ± 0.05 mg) w naczyniu kalorymetrycznym. Następnie naczynie to napełniano odważoną ilością rozpuszczalnika i zamykano hermetycznie. Po zamknięciu naczynia umieszczano je w osłonie zewnętrznej a następnie w termostacie. Włączano mieszadło obrotowe znajdujące się w naczyniu kalorymetrycznym, a po ustaleniu się stanu równowagi termicznej rozpoczynano właściwy pomiar. Po okresie wstępnym pomiaru (11 odczytów co 30 sekund) zbijano ampułkę z badaną substancją. Efekt cieplny wyznaczano stosując metodę Regnaulta – Pfaundlera, skorygowanego przyrostu temperatury ^[111, 112]. W wykonywanych pomiarach okres główny trwał nie

dłużej niż 20 minut. Po każdym pomiarze ciepła rozpuszczania wyznaczano pojemność cieplną kalorymetru poprzez wytworzenie w nim efektu cieplnego Joule'a. Nie powiodły się próby wyznaczenie ciepła rozpuszczania dla: 1,N⁴-dwumetylocytozyny (m^{1,N⁴}Cyt); 1,N⁴-dwumetylo-5-etylocytozyny (m^{1,N⁴}e⁵Cyt); 1,N⁴-dwumetylo-5-propylocytozyny (m^{1,N⁴}p⁵Cyt) i 1,N⁴-dwumetylo-5-butylocytozyny (m^{1,N⁴}b⁵Cyt), ze względu na długi czas trwania procesu rozpuszczania i bardzo małych efektów cieplnych. Dla związków tych wyznaczono jedynie wartości cząstkowych molowych objętości w metanolu i DMF.

7.2.2. Wyznaczenie pozornych molowych objętości V_{ϕ} .

Wartości pozornych molowych objętości wyznaczano na podstawie pomiarów gęstości roztworów badanych substancji względem czystego rozpuszczalnika. Pomiar przeprowadzono w temperaturze 298.15 K przy użyciu gęstościomierza Anton Paar DMA 60/602. Dokładność oznaczeń tym przyrządem odpowiada $5 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ [113].

Przed właściwym pomiarem wyznaczano stałą aparatu k zgodnie z zależnością (7.1).

$$k = (d_p - d_w) / (v_p^2 - v_w^2) \quad (7.1)$$

gdzie d_p – gęstość powietrza (określano ją z danych tabelarycznych [114] uwzględniając wartości ciśnienia atmosferycznego) d_w – gęstość wody przyjmowano wartość $0.997041 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ [114], oraz v_p , v_w – częstość drgań powietrza i wody.

Do oznaczeń używano destylowanej, odpowietrzanej przed każdym pomiarem, wody.

Znając wartość k , gęstość badanego roztworu d względem czystego rozpuszczalnika d_0 określano na podstawie zależności (7.2):

$$d = k(v^2 - v_0^2) + d_0 \quad (7.2)$$

gdzie ν , ν_0 są odpowiednio częstotliwościami drgań badanego roztworu i rozpuszczalnika.

Wartości pozornych molowych objętości, V_ϕ badanych substancji wyznaczono na podstawie zależności (7.3).

$$V_\phi = M/d - (1000/m)(1/d_0 - 1/d) \quad (7.3)$$

gdzie d jest gęstością badanego roztworu, d_0 jest gęstością czystego rozpuszczalnika, m – molalnością, a M – masą molową badanej substancji.

7.2.3. Wyznaczanie entalpii sublimacji $\Delta_{sub}H_m$.

Do wyznaczania prężności pary i entalpii sublimacji zastosowano metodę przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą.

Wiadomo, że jedną z najdokładniejszych metod określania prężności pary jest metoda efuzyjna Knudsen [115]. Aparat do wyznaczania prężności pary i entalpii sublimacji tą metodą jest w posiadaniu Zakładu Kalorymetrii Instytutu Chemii Fizycznej PAN. Za pomocą tego przyrządu wyznaczono szereg wartości entalpii sublimacji pochodnych zasad kwasów nukleinowych [99-104]. Nie mniej jednak w stosowanym przyrządzie wymagane są znaczne ilości substancji (około 100 mg), kontrola trwałości sublimującego związku jest trudna a odzysk substancji po pomiarach niemożliwy.

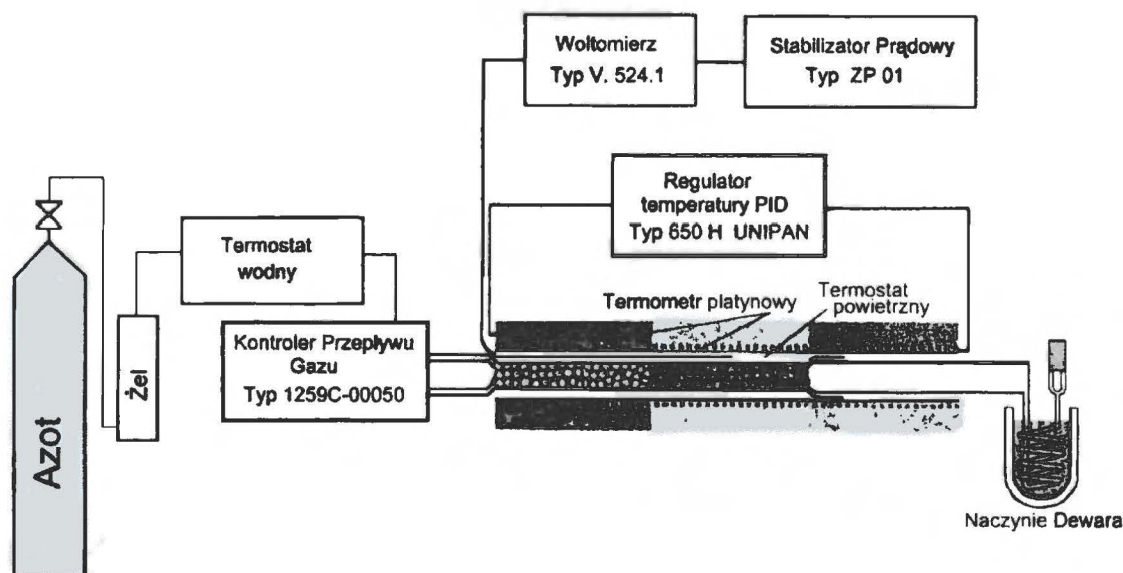
W przypadku wykonywanych w tej pracy oznaczeń dysponowano niewielkimi ilościami badanych związków i to było główną przyczyną poszukiwania innej metody pomiarów. W związku z powyższym podjęto pracę nad konstrukcją nowego przyrządu [116] do określania prężności pary i entalpii sublimacji, którego zasada działania oparta jest na przepływie gazu nad substancją sublimującą [117-120]. W nowoskonstruowanym przyrządzie ilość substancji wymagana do badań jest mniejsza (około 30 mg) od ilości potrzebnej w aparacie z zastosowaniem metody efuzyjnej Knudsen. Ponadto w metodzie przepływu gazu obojętnego zarówno przed eksperymentem jak i po każdym z nich wykonuje się widma UV roztworów badanej substancji. Porównanie tych widm daje dobrą informację o

zmianach struktury związku podczas wykonywania oznaczeń prężności pary w różnych temperaturach.

Wzorcowanie przyrzędu kwasem benzoesowym dało dokładne i odtwarzalne wyniki. W tej sytuacji można było zastosować aparat do określenia prężności pary i entalpii sublimacji pochodnych cytozyny. Ponadto dla porównania metody efuzyjnej Knudsen'a oraz przepływu gazu obojętnego wykonano pomiary prężności pary i wyznaczono entalpię sublimacji 1-metylo-N⁴-metoksycytozyny tymi dwiema metodami. Uzyskano dobrą zgodność pomiędzy wartościami entalpii sublimacji.

7.2.3.1. Konstrukcja przyrzędu do oznaczeń ciepła sublimacji metodą przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą.

Skonstruowany przyrząd do wyznaczania prężności pary metodą przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą przedstawiono na *Rysunku 15*.



Rysunek 15. Schemat przyrzędu do oznaczeń ciepła sublimacji.

Główną częścią przyrzędu jest termostat powietrzny. Termostat ten stanowi rura, na którą nawinięto spiralę grzejną oraz w której umieszczono termometr platynowy o oporze 100 Ω . Temperatura termostatu utrzymywana jest z dokładnością do 0.01 K przez regulator temperatury PID typ 650 H UNIPAN połączony z przystawką mocy, typ 650-1.

W termostacie umieszczono centralnie szklaną rurę o długości 1000 mm i średnicy 30 mm, w której w głównej części umieszczono szklane kulki. Na kulki te przed pomiarem nanoszono cienką warstwę, w celu zwiększenia powierzchni, badaną substancję.

W trakcie pomiaru, azot po przejściu przez kolumnę z żelalem suszącym przepływa przez termostat wodny, gdzie następuje stabilizacja jego temperatury. Po wyjściu z termostatu gaz wpływa do szklanej rury. Przepływa nad powierzchnią kulek unosząc pary badanej substancji, przenosząc je do kondensatora umieszczonego w naczyniu Dewara, wypełnionym ciekłym azotem. W naczyniu tym następuje kondensacja badanej substancji. W celu zabezpieczenia przed wilgocią z powietrza kondensator zakończony jest naczyniem wypełnionym CaCl_2 .

Stabilna szybkość przepływu gazu, lepsza niż 0.01%, utrzymywana jest przez masowy kontroler przepływu gazu (MKS typ 1259C – 00050SU).

7.2.3.2. Zasada działania skonstruowanego przyrządu.

Zasada działania przyrządu polega na określeniu masy wysublimowanej substancji w określonej, stałej temperaturze i w określonym przedziale czasu. Określenie masy oparte jest na pomiarze absorbancji A roztworu substancji wysublimowanej. Roztwór przygotowuje się poprzez rozpuszczenie wysublimowanej substancji w określonej objętości rozpuszczalnika.

Na podstawie pomiaru absorbancji roztworu określa się masę substancji zgodnie z prawem Lamberta Beera, znając wartość współczynnika ekstynkcji ε badanej substancji oraz szerokość kuwety l , z równania:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (7.4)$$

W celu wyznaczenia współczynnika ekstynkcji ε ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), dla każdej badanej substancji wykonywano widma UV w zakresie od 200 – 400 nm z dokładnością do 0.2 nm dla 5 ÷ 7 roztworów o znanym stężeniu. Pomiaru wykonano za pomocą CARY 1E UV-Visible spektrofotometru firmy Varian z dokładnością wyznaczenia absorbancji rzędu 0.005.

Jako podstawę obliczeń prężności pary przyjęto prawo gazu doskonałego:

$$p \cdot V_g = n \cdot R \cdot T \quad (7.5)$$

gdzie: V_g – objętość gazu w temperaturze pomiaru, R jest stałą gazową, $n = m/M$ – liczba moli wysublimowanej substancji. Wielkość V_g określano z zależności (7.6):

$$V_g = v \cdot t \quad (7.6)$$

gdzie v ($l \cdot h^{-1}$) jest szybkością gazu, t (h) czasem sublimacji.

Prężność pary w temperaturze pomiaru T_p określano według równania (7.7):

$$P = c \cdot (V_r / V_g) \cdot R \cdot T_p \quad (7.7)$$

gdzie c stężenie roztworu badanej substancji, V_r – objętość rozpuszczalnika, V_g – objętość gazu w temperaturze pomiaru, R – stała gazowa.

Wartości entalpii sublimacji obliczano z zależności $\ln P$ od odwrotności temperatury: $\ln P = a + b(1/T)$ gdzie entalpia sublimacji jest równa współczynnikowi b pomnożonemu przez wartość stałej gazowej R .

W określanych metodą przepływu gazu obojętnego wartościach entalpii sublimacji nie uwzględniono poprawki związanej ze zmianą entalpii sublimacji wraz z temperaturą.

7.2.3.3. Wyniki wzorcowania przyrządu.

Przyrząd wywzorcowano stosując jako substancję wzorcową kwas benzoesowy otrzymany z Polskiego Komitetu Jakości i Miar. Wartość entalpii spalania użytego kwasu benzoesowego wynosi $\Delta_c H = -3228.07 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ a entalpia topnienia równa jest $\Delta_{fus} H = 18.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Prężności pary kwasu benzoesowego wyznaczono przy różnej szybkości przepływu gazu v ($l \cdot h^{-1}$) = 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4, w zakresie temperatur od 307 do 355 K. Dla tego zakresu temperatur przeprowadzono pomiary prężności pary w odstępach 5 K. Wyniki oznaczeń prężności pary zestawiono w Tabeli 3.

Jak wynika z uzyskanych danych, brak jest istotnych różnic w wartościach prężności par określanych dla różnych szybkości przepływu gazu w tej samej temperaturze pomiaru. Przy ustalaniu właściwej szybkości przepływu gazu przyjęto, że powinien to być przepływ powolny, laminarny. Oszacowano, że przepływ taki ma miejsce przy szybkości $0.024 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$.

Tabela 3. Zależności $P = f(v)$ określone dla kwasu benzooesowego dla różnych szybkości przepływu gazu.

T (K)	307.35	312.55	317.85	323.10	328.35	333.32	338.45	343.95	348.85	354.45
v ($\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$)	P (Pa)									
0.2	0.286	0.505	0.903	1.623	2.783	4.447	7.453	12.763	19.290	31.640
0.5	0.278	0.516	0.913	1.846	2.762	4.517	7.283	12.687	19.420	32.050
1.0	0.275	0.508	0.893	1.667	2.830	4.504	7.564	12.542	19.574	30.590
1.5	0.280	0.524	0.949	1.624	2.740	4.194	7.692	12.953	19.250	31.540
2.0	0.291	0.518	0.910	1.795	2.676	4.334	7.430	12.872	19.371	31.000
2.5	0.285	0.509	0.943	1.680	2.758	4.261	7.389	12.542	19.460	32.103
3.0	0.293	0.516	0.945	1.506	2.881	4.509	7.742	12.810	18.967	31.897
3.5	0.277	0.519	0.954	1.700	2.980	4.539	7.654	12.623	19.180	31.987
4.0	0.290	0.506	0.953	1.640	2.910	4.338	7.390	12.444	19.048	31.592
\bar{P}	0.284	0.514	0.929	1.676	2.813	4.410	7.511	12.693	19.284	31.600
$P^{[117]}$	0.286	0.519	0.933	1.637	2.820	4.647	7.662	12.881	20.183	33.211
$P^{[122]}$	0.544	0.943	1.620	2.723	4.500	7.135	11.321	18.290	27.686	43.847
$P^{[127]}$	0.452	0.793	1.378	2.340	3.908	6.257	10.025	16.358	24.977	39.938
$P^{[126]}$	0.478	0.841	1.467	2.501	4.191	6.730	10.815	17.704	27.105	43.472

Uzyskana wartość entalpii sublimacji $\Delta_{sub}H_m = 90.5 \pm 0.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pozostaje w dobrej zgodności z rekomendowaną przez IUPAC i wynoszącą $89.7 \pm 0.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [121]. Uzyskane wartości $\ln P$ w funkcji temperatury jak i uzyskaną wartość entalpii sublimacji porównano z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i przedstawiono w Tabeli 4. Zestawione dane wskazują jednak na istnienie dwóch zbiorów zależności $\ln P = f(T)$. Zależność $\ln P = f(T)$ określona w tej pracy jest zgodna, w granicy błędu, z danymi pochodzącymi z pracy Davies i innych [117] i Colomina i innych [124,125], lecz różni się nieco od rezultatów uzyskanych przez Klosky i inni [122], Malaspina i inni [127] i Wiedeman i inni [126]. Występuje natomiast dobra zgodność wartości entalpii sublimacji, uzyskanych przez wszystkich autorów, w tym także z wartością uzyskaną w tej pracy

Tabela 4. Zależności $\ln P = f(T)$ i entalpie sublimacji kwasu benzoowego przy różnych temperaturach.

Autor	Zakres temperatur (K)	$\Delta_{sub}H_m$ (kJ·mol ⁻¹)	T (K)	Zależność $\ln P=f(T)$
Ta praca	323÷394	90.5±0.3	323÷394	$\ln P = (34.18+0.14) - (10888\pm45)/T$
Davies i inni ^[117]	343÷387	91.4±0.4	365.5	$\ln P = 34.53-10996.8/T$
Klosky i inni ^[122]	323÷394	87.1	298.15	$\ln P = 32.428-10153.9/T$
Hirsbrunneri inni ^[123]	377÷389	90.2	298.15	
Colomina i inni ^[124]	293÷308	90.0±0.3	293÷308	
Colomina i inni ^[125]	293÷313	90.6±0.2	293÷313	$\ln P = (34.24\pm0.05) - (10869.2\pm16.35)/T$
Colomina i inni ^[125]	293÷313	90.35±0.13	303.4	
Wiedemann i inni ^[126]	290÷315	86.6±1.7	303	$\ln P = 33.21-(10432.6\pm186.5)/T$
Malaspina i inni ^[127]	338÷383	89.0±0.4	338÷383	$\ln P = (32.93\pm0.13) - (10365.8\pm39.15)/T$
Malaspina i inni ^[127]	338÷383	89.3±0.4	338÷383	
Morawetz i inni ^[118]	298.15	89.5±0.2	298.15	
Chastel i inni ^[128]	298.15	89.7±0.6	298.15	

Dla porównania zgodności wyników uzyskiwanych metodą przepływu gazu obojętnego oraz metody efuzyjnej Knudsena wyznaczono entalpię sublimacji dla 1-metylo-N⁴-metoksycytozyny wymienionymi metodami, a wyniki przedstawiono w Tabeli 5. Porównanie to przeprowadzono ze względu na fakt, że entalpie sublimacji dla grupy alkilowych pochodnych pirymidynowych uracylu, badanych w Zakładzie Kalorymetrii ICHF PAN, wyznaczono metodą Knudsena.

Tabela 5. Zależność $P = f(T)$ dla 1-metylo-N⁴-metoksycytozyny określona metodą efuzyjną Knudsena oraz metodą przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą.

metoda efuzyjna Knudsena		metoda przepływu gazu obojętnego	
$T, (K)$	$P, (Pa)$	$T, (K)$	$P, (Pa)$
315.68	0.0636	320.31	0.273
317.27	0.0779	325.73	0.527
319.36	0.1014	330.25	0.913
321.68	0.1361	335.46	1.72
323.42	0.1686	340.72	3.06
325.15	0.2097	345.18	4.95
		350.14	8.41
		357.40	17.37

Na podstawie danych zebranych w Tabeli 5 określono zależności $\ln P = f(T)$ i wyznaczono wartości entalpii sublimacji:

metoda efuzyjna Knudsena :

$$\Delta_{sub}H_m = 107.6 \pm 0.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}; \ln P = (38.24 \pm 0.11) - (12943 \pm 35)/T; \sigma = 2.76 \cdot 10^{-3};$$

$$R = 0.999; n = 6$$

metoda przepływu gazu obojętnego:

$$\Delta_{sub}H_m = 106.9 \pm 0.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}; \ln P = (38.84 \pm 0.14) - (12857 \pm 48)/T; \sigma = 1.39 \cdot 10^{-2};$$

$$R = 0.999; n = 8$$

Porównując uzyskane wyniki można stwierdzić dobrą zgodność pomiędzy wartościami entalpii sublimacji określonymi wyżej wymienionymi metodami, natomiast występują różnice w przypadku uzyskanych prężności pary. Określone metodą przepływu gazu obojętnego prężności pary mają wartości nieznacznie wyższe od tych określonych metodą Knudsena

7.3. Sposób przeprowadzenia obliczeń.

Na podstawie wartości entalpii rozpuszczania $\Delta_{sol}H_m$ i sublimacji $\Delta_{sub}H_m$ wyznaczono wartości entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$. Wyznaczona entalpia solwatacji stanowiła podstawę do wyznaczenia na drodze półempirycznej, po oszacowaniu entalpii tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku $\Delta_{cav}H_m$, wartości entalpii oddziaływań $\Delta_{int}H_m$ pomiędzy badaną substancją a rozpuszczalnikiem.

Wyznaczono wkład grup funkcyjnych Z_i w wartość cząstkowej molowej objętości i entalpii solwatacji oraz określono funkcje przejścia $\Delta_{tr}H_m$, $V_{2,tr}^0$ badanych substancji z wody do metanolu i z wody do DMF.

Uzyskane wielkości termodynamiczne analizowano wspólnie z danymi strukturalnymi badanych związków. W tym celu wyznaczono powierzchnie molekularne S^M oraz powierzchnie poszczególnych atomów badanych substancji oraz określono objętość otoczki solwatacyjnej $V_{1,solv}$ w badanych rozpuszczalnikach jak i objętości molekularne badanych substancji.

7.3.1. Wyznaczanie entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$ oraz entalpii oddziaływań $\Delta_{int}H_m$ ciało rozpuszczane – rozpuszczalnik.

Wartości entalpii solwatacji określono na podstawie doświadczalnych wartości entalpii rozpuszczania oraz entalpii sublimacji na podstawie zależności (7.8):

$$\Delta_{solv}H_m = \Delta_{sol}H_m - \Delta_{sub}H_m \quad (7.8)$$

Entalpię solwatacji można przedstawić jako sumę energii wytworzenia wnęki w rozpuszczalniku i entalpii oddziaływania cząsteczek rozpuszczalnika $\Delta_{int}H_m$ z badaną cząsteczką umieszczoną w wytworzonej wnęcie [86-89].

$$\Delta_{solv}H_m = \Delta_{cav}H_m + \Delta_{int}H_m \quad (7.9)$$

gdzie entalpia oddziaływania $\Delta_{int}H_m$, określona jest równaniem (7.10):

$$\Delta_{int}H_m = \Delta_{solv}H_m - \Delta_{cav}H_m \quad (7.10)$$

Entalpię tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku $\Delta_{cav}H_m$ określono dwiema metodami: Sinanoglu^[129-131] oraz Scaled Particle Theory (SPT)^[132].

Zgodnie z teorią Sinanoglu, entalpię tworzenia wnęki określa się jako energię potrzebną do pokonania napięcia powierzchniowego cieczy przy tworzeniu wnęki w ciekłym rozpuszczalniku, według zależności:

$$\Delta_{cav}H = Nk_1^{\circ}(\phi_{12})S_2\gamma\{1-(\partial n\gamma/\partial nT)-2/3\alpha T\} \quad (7.11)$$

gdzie S_2 oznacza powierzchnię cząsteczki substancji rozpuszczonej, N – liczbę Avogadro, γ – napięcie powierzchniowe rozpuszczalnika, a wyrażenie $k_1^{\circ}(\phi_{12})$ jest stałą skalującą wielkość makroskopowego napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika do rozmiarów mikroskopowych, zależną od stosunku objętości cząsteczek rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej ϕ_{12} , wyrażenie:

$$k_1^{\circ}(\phi_{12}) = 1 + \phi_{12}^{2/3}\{k_1^{\circ}(1)-1\} \quad (7.12)$$

gdzie $k_1^{\circ}(1)$ jest stałą charakteryzującą rozpuszczalnik.

Zgodnie z teorią SPT entalpia tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku jest wyrażona za pomocą zależności (7.13):

$$\Delta_{cav}H = RT^2\alpha[y/(1-y)^3][[(1-y)^2+3(1-y)\sigma_2/\sigma_1+3(1+2y)(\sigma_2/\sigma_1)^2]+y(Rp/k\rho)(\sigma_2/\sigma_1)^3]$$

gdzie $y = (1/6)\pi\rho\sigma_1^3$, ρ jest gęstością rozpuszczalnika (liczbą cząsteczek na jednostkę objętości), σ_1 i σ_2 są efektywnymi średnicami cząsteczek rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej, p , T – ciśnieniem i temperaturą, R – stałą gazową, k – stałą Boltzmana.

Do obliczeń wykorzystano parametry strukturalne oraz własności fizyczne wody, metanolu i N,N-dwumetyloformamidu podane w Tabeli 6.

Tabela 6. Własności fizyczne i parametry molekularne wody, metanolu i N,N-dwumetyloformaidu.

	ρ^{-1} [cm ³ ·mol ⁻¹]	σ [Å]	$\alpha \cdot 10^{-3}$ [K ⁻¹]	γ [dyn·cm ⁻¹]	$k_1^{\circ}(1)$
Woda	18.1	2.75	0.257	72.0	1.277
Metanol	40.6	3.69	1.101	22.1	1.776
DMF	77.5	4.98	1.015	16.9	0.956

Obie wykorzystane metody mają charakter półempiryczny. Wynika to z wykorzystania, w przypadku SPT eksperymentalnych wartości gęstości rozpuszczalnika i współczynnika rozszerzalności termicznej, a w przypadku metody Sinanoglu wartości napięcia powierzchniowego oraz współczynnika $k_1^{\circ}(1)$.

W przypadku metody Sinanoglu parametrem mającym wpływ na wartość entalpii tworzenia wnęki jest wartość powierzchni cząsteczki substancji rozpuszczonej. W niniejszej pracy do obliczeń przyjęto powierzchnię molekularną, wyznaczoną poprzez toczenie cząsteczki rozpuszczalnika po powierzchni Van der Waalsa cząsteczki substancji rozpuszczonej. Sposób wyznaczenia powierzchni molekularnej wykorzystany w tej pracy oraz wartości liczbowe przedstawiono odpowiednio w rozdziale 7.3.3 oraz w Tabeli 21.

7.3.2. Metoda udziałów grupowych.

Metoda udziałów grupowych, jak podano w rozdziale 3, części ogólnej tej pracy, oparta jest na określeniu wkładu (udziału) poszczególnych grup funkcyjnych w daną wielkość termodynamiczną. Są one określane według ogólnego wzoru:

$$Y = Y_0 + \sum_i n_i Z_i \quad (7.14)$$

gdzie Y jest wielkością termodynamiczną, Y_0 jest wielkością stałą; Z_i udział grupy i ; natomiast n_i jest liczbą grup typu i .

W przypadku obliczeń przeprowadzonych w tej pracy wielkościami termodynamicznymi, na podstawie których określano udziały (wkłady) poszczególnych grup funkcyjnych były: entalpia solwatacji i cząstkowe molowe objętości. Natomiast grupami funkcyjnymi, których udziały w danej wielkości termodynamicznej określano były: $\text{CH}_2(\text{N})$, $\text{CH}_2(\text{C})$, $\text{CH}_2(\text{O})$, oraz O , co odpowiada podstawieniu grupy CH_2 na atomach azotu, węgla i tlenu cząsteczki cytozyny oraz podstawieniu atomu tlenu na atomie azotu N^4 .

Wielkości Y_0 i Z_i określono poprzez zastosowanie wielowymiarowej regresji liniowej opartej na metodzie najmniejszych kwadratów.

7.3.3. Wyznaczanie parametrów strukturalnych cytozyny i jej pochodnych oraz parametrów α , β modelu opisującego własności objętościowych badanych substancji.

Dla badanych związków określono parametry strukturalne charakteryzujące ich cząsteczki: objętość molekularną V_2^M , całkowitą powierzchnię badanej substancji S^M , oraz powierzchnie następujących atomów: wodoru $S_{\text{H}(\text{O},\text{N})}$, tlenu, S_{O} , i azotu S_{N} .

Objętość molekularna została zdefiniowana jako objętość ograniczona przez cząsteczkę rozpuszczalnika toczoną po powierzchni Van der Waalsa cząsteczki badanej substancji.

Objętość otoczki solwatacyjnej została określona jako objętość wyznaczona przez toczącą się kulkę o średnicy cząsteczki rozpuszczalnika wokół powierzchni Van der Waalsa cząsteczki badanej substancji.

Przy określaniu geometrii cząsteczek badanych substancji przyjęto, że podstawione w pozycji N^4 grupą metoksyłową lub hydroksyłową cytozyny występują w formie iminowej azotu N^4 (*Rysunek 14*). Do określenia geometrii cząsteczek badanych związków wykorzystano program Tripos SYBYL 2.7 [133, 134], natomiast wszystkie obliczenia parametrów strukturalnych wykonano przy zastosowaniu programu GEPOL wersja 12.1 [44]. Do obliczeń przyjęto następujące

promienie poszczególnych atomów: azotu (N) 1.4 Å, węgla (C) 1.5 Å, tlenu (O) 1.4 Å, oraz wodoru (H) 0.35 Å. Promienie cząsteczek wody, metanolu i DMF przyjęto jako równe odpowiednio: 1.4 Å, 1.8 Å, i 2.4 Å.

Parametry strukturalne zostały wykorzystane do analizy wyników cząstkowych molowych objętości, na podstawie modelu ^[32, 105, 106] zakładającego, że gęstość otoczki solwatacyjnej zależy od struktury i polarności badanych związków. Zgodnie z tym modelem gęstość otoczki solwatacyjnej jest charakteryzowana przez parametr α określany przez zależność (7.15).

$$\alpha = (d_{1,solv} - d_0) / d_0 = (V_2^M - V_2^0) / V_{1,solv} \quad (7.15)$$

gdzie d_0 jest gęstością czystego rozpuszczalnika, V_2^M jest objętością molekularną, V_2^0 cząstkowa molowa objętość, i $V_{1,solv}$ objętość otoczki solwatacyjnej.

W rozpatrywanym modelu poszukuje się zależności pomiędzy parametrem α a polarnością. Polarność zdefiniowana jest jako iloraz atomów polarnych oraz całkowitej powierzchni cząsteczki badanej substancji. Polarności badanych związków w wodzie, metanolu i DMF określono przy założeniach, że woda jako zarówno dobry akceptor jak i donor protonów oddziałuje z atomami tlenu, azotu i wodorów polarnych cząsteczki badanej substancji, metanol, który jest lepszym donorem niż akceptorem protonów oddziałuje z tlenem i azotem, natomiast DMF oddziałuje tylko z wodorami polarnymi. Zdefiniowaną zgodnie z podanymi założeniami polarność odpowiednio w wodzie, metanolu i DMF możemy przedstawić jako:

$$\text{Woda: } P = (S_N + S_O + S_{H(O,N)}) / S^M \quad (7.16)$$

$$\text{Metanol: } P = (S_N + S_O) / S^M \quad (7.17)$$

$$\text{DMF: } P = S_{H(O,N)} / S^M \quad (7.18)$$

W opisywanym modelu objętościowym ^[32, 105, 106] wyznaczono również parametr β jako różnicę cząstkowej molowej objętości i objętości molekularnej $\beta = V_2^0 - V_2^M$. Na podstawie podanej zależności wyznaczono parametr β dla badanych związków w trzech rozpuszczalnikach.

7.3.4. Wyznaczenie funkcji przejścia: entalpii solwatacji i cząstkowych molowych objętości.

Na podstawie doświadczalne określonych wartości entalpii rozpuszczania jak i sublimacji wyznaczono, dla badanych związków w trzech rozpuszczalnikach, entalpie przejścia woda-metanol, woda – DMF.

Obliczenia zarówno entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$ jak i oddziaływania $\Delta_{int}H_m$ pomiędzy cząsteczką substancji rozpuszczonej a rozpuszczalnikiem oparte są na eksperymentalnie wyznaczonych wielkościach entalpii rozpuszczania $\Delta_{sol}H_m$ i sublimacji $\Delta_{sub}H_m$. Doświadczalne dane wskazują jednak na trudności z bardzo dokładnym wyznaczeniem wartości entalpii sublimacji. Z tego względu określenie wielkości termodynamicznych takich jak entalpia rozpuszczania $\Delta_{sol}H_m$ czy cząstkowa molowa objętość V_2^0 w różnych rozpuszczalnikach lub w rozpuszczalnikach mieszanych, stwarza możliwości pozyskiwania informacji o naturze oddziaływań substancja rozpuszczona – rozpuszczalnik na podstawie określonych na ich podstawie funkcji przejścia $\Delta_{tr}H_m$, $V_{2,tr}^0$ cząsteczki badanej substancji z jednego rozpuszczalnika do drugiego.

Molowe entalpie przejścia woda – metanol, woda – DMF określono na podstawie zależności:

$$\Delta_{tr}H_m = \Delta_{solv}H_m (met) - \Delta_{solv}H_m (woda) = \Delta_{sol}H_m (met) - \Delta_{sol}H_m (woda) \quad (7.19)$$

$$\Delta_{tr}H_m = \Delta_{solv}H_m (DMF) - \Delta_{solv}H_m (woda) = \Delta_{sol}H_m (DMF) - \Delta_{sol}H_m (woda) \quad (7.20)$$

Cząstkowe molowe objętości przejścia woda- metanol, woda- DMF wyrażono przez zależności (7.21) i (7.22):

$$V_{2,tr}^0 = V_2^0 (metanol) - V_2^0 (woda) \quad (7.21)$$

$$V_{2,tr}^0 = V_2^0 (DMF) - V_2^0 (woda) \quad (7.22)$$

8. Wyniki oznaczeń i obliczeń.

8.1. Entalpie rozpuszczania, sublimacji oraz solwatacji.

Wyniki oznaczeń ciepła rozpuszczania w metanolu i DMF przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Doświadczalne wartości ciepła rozpuszczania badanych związków w metanolu i N,N –dwumetyloformamidzie.

$10^{-3}m$ kg·mol ⁻¹	$\Delta_{sol}H_m$ kJ·mol ⁻¹	$10^{-3}m$ kg·mol ⁻¹	$\Delta_{sol}H_m$ kJ·mol ⁻¹	$10^{-3}m$ kg·mol ⁻¹	$\Delta_{sol}H_m$ kJ·mol ⁻¹	$10^{-3}m$ kg·mol ⁻¹	$\Delta_{sol}H_m$ kJ·mol ⁻¹	$10^{-3}m$ kg·mol ⁻¹	$\Delta_{sol}H_m$ kJ·mol ⁻¹
Metanol									
Cyt		m ¹ Cyt		m ^{1,5} Cyt		m ¹ N ⁴ OmCyt		m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	
1.662	14.65	1.354	15.45	1.536	16.74	1.182	23.67	1.687	22.37
2.199	13.79	1.639	15.41	1.736	16.17	1.186	23.26	1.744	23.58
2.457	14.31	2.081	15.41	1.903	17.28	1.329	23.32	2.347	23.25
2.896	13.39	2.479	16.22	2.094	16.99	1.580	23.07	2.366	23.14
3.689	13.59	2.790	15.51	2.302	16.42	2.137	22.49	2.375	22.88
4.707	13.29			2.303	16.98	2.264	23.27	3.165	22.89
						2.747	22.94	3.398	22.28
m ¹ N ⁴ OHCyt		m ^{1,5} N ⁴ OHCyt							
1.587	19.24	2.392	19.10						
2.117	18.43	2.583	19.45						
2.731	16.81	2.826	18.39						
3.544	16.16	3.025	17.72						
4.168	15.89	3.176	17.94						
		3.815	18.12						
N, N-Dwumetyloformamid									
Cyt		m ¹ Cyt		m ^{1,5} Cyt		m ¹ N ⁴ OmCyt		m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	
1.403	8.60	1.627	9.58	0.733	11.97	1.557	16.97	0.762	18.51
1.415	8.35	1.709	8.11	0.854	12.43	1.743	16.37	1.051	18.19
1.499	8.09	1.863	9.54	0.973	12.21	1.802	16.89	1.181	17.57
1.497	8.86	2.525	9.01	1.086	11.80	1.974	16.26	1.295	17.57
2.615	8.48	2.665	9.89	1.270	11.83	1.987	16.85	1.564	17.14
						2.191	16.85		
						2.402	17.73		
m ¹ N ⁴ OHCyt		m ^{1,5} N ⁴ OHCyt							
0.874	12.44	0.921	12.36						
0.935	11.81	1.068	11.13						
0.963	11.91	1.253	11.66						
0.968	11.81	1.532	12.23						
2.305	11.69	1.809	11.94						
		1.925	11.98						
		2.123	12.11						

Dla układów badana substancja – rozpuszczalnik przyjęto, że entalpia rozpuszczania w roztworze nieskończenie rozcieńczonym jest równa średniej wartości ciepła rozpuszczania w badanym zakresie stężeń. Wyznaczono średni błąd pomiaru ^[112] a wyniki przedstawiono w *Tabeli 6* wraz z określonymi wartościami entalpii sublimacji oraz obliczonymi entalpiami solwatacji.

Tylko w jednym z badanych układów: 1-metylo-N⁴-hydroksycytozyna - metanol zaobserwowano zależności ciepła rozpuszczania od stężenia. Dla tego układu entalpię rozpuszczania w nieskończonym rozcieńczeniu określono z zależności:

$$\Delta_{sol}H_m^\infty = A + Bm \quad (8.1)$$

gdzie m jest stężeniem roztworu, $A = 21.10 \pm 0.47 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $B = -1.345 \pm 0.226 \text{ kJ} \cdot \text{kg} \cdot \text{mol}^{-2}$.

Tabela 8. Wartości entalpii sublimacji, entalpii rozpuszczania i entalpii solwatacji określone dla metanolu i DMF.

	Metanol			DMF	
	$\Delta_{sub}H_m$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta_{sol}H_m$ (kJ · mol ⁻¹)	$-\Delta_{sol}H_m$ (kJ · mol ⁻¹)	$\Delta_{sol}H_m$ (kJ · mol ⁻¹)	$-\Delta_{sol}H_m$ (kJ · mol ⁻¹)
Cyt	151.7 ± 0.7	13.8 ± 0.2	137.9	8.5 ± 0.1	143.2
m ¹ Cyt	141.2 ± 0.6	15.7 ± 0.2	125.6	9.5 ± 0.2	131.7
m ^{1.5} Cyt	132.8 ± 0.6	16.8 ± 0.2	116.0	12.0 ± 0.2	120.8
m ¹ N ⁴ OH Cyt	126.7 ± 1.5	21.1 ± 0.4	105.6	11.9 ± 0.1	114.8
m ^{1.5} N ⁴ OH Cyt	115.2 ± 0.6	18.4 ± 0.3	96.8	11.9 ± 0.2	103.3
m ¹ N ⁴ Om Cyt	106.4 ± 0.8	23.1 ± 0.1	83.3	16.8 ± 0.2	89.6
m ^{1.5} N ⁴ Om Cyt	95.6 ± 0.7	22.9 ± 0.2	72.7	17.8 ± 0.2	77.8

Wartości entalpii sublimacji $\Delta_{sub}H_m$, przedstawione w *Tabeli 8* określono na podstawie wyników oznaczeń prężności pary w różnych temperaturach według zależności $\ln P = f(1/T)$ podanych w rozdziale 7.2.3.2 tej pracy. Wartości prężności pary, określone da różnych temperatur przy prędkości przepływu gazu wynoszącej 0.024 l·h⁻¹, podano w *Tabeli 9*.

Tabela 9. Wartości prężności pary, określone metodą przepływu gazu obojętnego.

<i>T</i> (K)	<i>P</i> (Pa)	<i>T</i> (K)	<i>P</i> (Pa)	<i>T</i> (K)	<i>P</i> (Pa)
	Cyt		m ¹ Cyt		m ^{1.5} Cyt
505.50	0.8233	454.99	0.3769	389.84	0.0357
507.70	1.0293	455.88	0.4181	395.13	0.0613
511.69	1.2269	456.94	0.4634	399.07	0.1119
513.79	1.3899	471.36	1.2280	409.90	0.4111
519.53	2.1364	474.39	1.7690	423.05	1.0019
521.12	2.4456	476.01	2.1432	427.83	1.2460
525.39	3.3468	486.87	4.4481	426.78	1.4044
				437.36	3.4030
	m ^{1.5} N ⁴ OHCyt		m ¹ N ⁴ OmCyt		m ^{1.5} N ⁴ OmCyt
356.83	0.0827	320.31	0.2332	327.13	0.2278
360.89	0.1621	330.25	0.9131	330.64	0.4880
367.92	0.2542	335.45	2.2558	334.88	0.6545
369.15	0.3210	340.48	3.8928	351.15	4.4793
373.11	0.4776	345.18	4.3043	359.65	6.9571
383.56	1.2110	350.14	8.4060	360.74	7.3657
394.32	3.7875	357.40	15.6442	364.80	8.9315

8.2. Entalpia oddziaływań ciało rozpuszczone – rozpuszczalnik.

W celu wyznaczenia entalpii oddziaływania substancja rozpuszczona – rozpuszczalnik wyznaczono wartości energii tworzenia wnęki $\Delta_{cav}H$ w wodzie, metanolu i DMF. Jak podano w rozdziale 7.3.1. tej pracy obliczenia przeprowadzono dwiema metodami: Sinanoglu i Scaled Particle Theory (SPT), odpowiednio według zależności (7.11) i (7.13).

Wyniki obliczeń energii tworzenia wnęki w wodzie, metanolu i DMF przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Entalpie tworzenia wnęki $\Delta_{cav}H_m$ w wodzie, metanolu i DMF.

	$\Delta_{cav}H_m$ (kJ·mol ⁻¹)					
	Woda		Metanol		DMF	
	SPT	Sinanoglu	SPT	Sinanoglu	SPT	Sinanoglu
Cyt	123.0	92.2	71.2	33.6	64.8	17.3
m ¹ Cyt	138.3	104.4	79.7	37.1	72.6	19.7
m ^{1,5} Cyt	152.6	116.2	83.5	40.4	79.8	22.0
m ¹ N ⁴ OHCyt	145.4	111.4	87.6	38.9	76.1	21.0
m ^{1,5} N ⁴ OHCyt	159.2	123.0	91.1	41.9	83.1	23.3
m ¹ N ⁴ OmCyt	159.2	126.5	91.1	43.5	83.0	24.1
m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	172.4	138.3	98.3	46.6	89.7	26.4

Obie wykorzystane metody wskazują, że entalpia tworzenia wnęki $\Delta_{cav}H$ w wodzie jest znacząco większa niż w przypadku metanolu i N,N-dwumetyloformamidu, natomiast entalpie tworzenia wnęki $\Delta_{cav}H$ określone dla metanolu są w przypadku metody Sinanoglu większe w 100 % od $\Delta_{cav}H$ określonych w DMF i około 10% większe określone metodą SPT.

Zestawione w Tabeli 10 wyniki wskazują na silne rozbieżności pomiędzy wartościami $\Delta_{cav}H$ uzyskanymi dwiema metodami. Wielkość energii tworzenia wnęki bardzo silnie zależy od przyjętego do obliczeń promienia rozpuszczalnika. Wartość promienia, która pozwoliłaby na uzyskanie tej samej wartości energii tworzenia wnęki dwiema metodami nie istnieje a tym samym wielkość energii tworzenia wnęki w wodzie zależy silnie od wybranej metody. Fakt występowania tak znacznej różnicy w wartościach energii tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku jest dobrze znany i opisywany w literaturze [135, 136].

Na podstawie wyznaczonych wartości entalpii solwatacji jak i entalpii tworzenia wnęki w ciekłym rozpuszczalniku wyznaczono dla wody, metanolu i DMF entalpie oddziaływań pomiędzy rozpuszczalnikiem a badaną substancją. Wyniki przedstawiono w Tabeli 11.

Podobne wnioski o naturze oddziaływań badana substancja – rozpuszczalnik można uzyskać z wartości entalpii solwatacji $\Delta_{sol}H_m$ jak i z entalpii oddziaływań $\Delta_{int}H$. Z tego względu w dalszej części pracy wyznaczone i przedstawione w Tabeli 11 entalpie oddziaływania nie mają dość istotnego znaczenia. Są one jednak istotne przy porównaniach tak wyznaczonych wartości entalpii oddziaływania z wynikami obliczeń kwantowo – mechanicznych.

Tabela 11. Entalpie oddziaływań $\Delta_{int}H$ w badanych rozpuszczalnikach.

	$-\Delta_{int}H$ (kJ·mol ⁻¹)					
	Woda		Metanol		DMF	
	Sinanoglu	SPT	Sinanoglu	SPT	Sinanoglu	SPT
Cyt	221.11	251.9	171.5	209.1	160.5	208.0
m ¹ Cyt	227.3	261.2	162.7	205.3	151.4	204.3
m ^{1.5} Cyt	235.4	271.8	156.4	199.5	142.8	200.6
m ¹ N ⁴ OHCyt	218.7	252.7	144.5	193.2	135.8	190.9
m ^{1.5} N ⁴ OHCyt	224.3	260.5	138.7	187.9	126.6	186.4
m ¹ N ⁴ OmCyt	220.3	253.0	136.8	174.4	113.7	172.6
m ^{1.5} N ⁴ OmCyt	224.6	258.7	119.3	171.0	104.2	167.5

8.3. Cząstkowe molowe objętości. Wyniki oznaczeń.

Wartości pozornych molowych objętości badanych związków (zdefiniowane w rozdziale 5, części teoretycznej, tej pracy) w metanolu i DMF, wyznaczone na podstawie zależności 7.3, przedstawiono odpowiednio w Tabelach 12 i 13.

Tabela 12. Gęstości oraz pozorne molowe objętości roztworów metanolowych badanych związków w temperaturze 298.15 K.

m (mol·kg ⁻¹)	d (g·cm ⁻³)	V_{ϕ} (cm ³ ·mol ⁻¹)	m (mol·kg ⁻¹)	d (g·cm ⁻³)	V_{ϕ} (cm ³ ·mol ⁻¹)
	Cyt			m ¹ N ⁴ OmCyt	
0.019000	0.787576	58.11	0.032684	0.788342	110.81
0.016054	0.787417	58.91	0.023954	0.787882	110.57
0.014389	0.787340	58.07	0.021800	0.787768	110.50
0.013994	0.787317	58.40	0.017744	0.787550	110.59
0.008470	0.787036	58.07	0.012860	0.787291	110.31
	m ¹ Cyt			m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	
0.028936	0.787963	82.77	0.019966	0.787667	128.21
0.011648	0.787261	83.79	0.018152	0.787574	128.21
0.009475	0.787042	83.60	0.015667	0.787439	128.40
0.008279	0.786988	83.22	0.014495	0.787377	128.09
0.005584	0.786860	83.76	0.010566	0.787164	128.64
	m ^{1,5} Cyt			m ^{1,N4} e ⁵ Cyt	
0.015689	0.787310	103.68	0.013289	0.787300	131.11
0.013528	0.787213	103.60	0.013616	0.787330	131.44
0.012643	0.787173	103.59	0.015595	0.787420	131.92
0.010945	0.787095	103.76	0.018002	0.787544	132.65
0.009767	0.787048	102.72	0.023654	0.787821	131.84
0.007999	0.786966	102.92	0.024000	0.787843	131.48
	m ¹ N ⁴ OHCyt			m ^{1,N4} p ⁵ Cyt	
0.013739	0.787413	83.70	0.010099	0.787281	147.56
0.013504	0.787399	83.67	0.012747	0.787291	146.35
0.012817	0.787359	83.64	0.013902	0.787499	147.74
0.011896	0.787306	83.43	0.015828	0.787441	147.20
0.010508	0.787225	83.21	0.017200	0.787509	147.43
0.008080	0.787084	82.56			
	m ^{1,5} N ⁴ OHCyt			m ^{1,N4} b ⁵ Cyt	
0.018102	0.787628	104.07	0.008696	0.786986	174.63
0.015678	0.787491	103.82	0.009456	0.787020	174.62
0.012831	0.787328	104.24	0.011482	0.787112	174.59
0.012098	0.787290	103.73	0.011676	0.787127	174.52
0.010403	0.787192	103.94	0.011815	0.787130	174.27
0.009090	0.787118	103.82			
				m ^{1,N4} Cyt	
			0.016965	0.787492	101.18
			0.016452	0.787471	100.71
			0.013350	0.787297	104.14
			0.012802	0.787302	100.32
			0.011293	0.787227	100.89

Tabela 13. Gęstości oraz pozorne molowe objętości roztworów DMF badanych związków w temperaturze 298.15 K.

m (mol·kg ⁻¹)	d (g·cm ⁻³)	V_{ϕ} (cm ³ ·mol ⁻¹)	m (mol·kg ⁻¹)	d (g·cm ⁻³)	V_{ϕ} (cm ³ ·mol ⁻¹)
	Cyt			m ^{1,5} N ⁴ OHCyt	
0.009674	0.944295	68.36	0.028846	0.945059	116.92
0.008566	0.944241	68.98	0.024076	0.944868	116.68
0.007441	0.944195	68.66	0.014250	0.944452	117.38
0.006351	0.944146	68.91	0.013770	0.944430	117.64
0.006121	0.944136	68.91	0.013419	0.944421	117.20
0.005882	0.944126	68.67	0.011188	0.944414	117.77
	m ¹ Cyt			m ¹ N ⁴ OmCyt	
0.014638	0.944409	91.05	0.016024	0.944469	122.36
0.010796	0.944264	91.54	0.015099	0.944448	122.37
0.010280	0.944256	90.36	0.012289	0.944331	122.22
0.009629	0.944224	91.25	0.011373	0.944298	122.06
0.008305	0.944175	91.29	0.009946	0.944242	122.33
			0.008947	0.944202	122.78
	m ^{1,5} Cyt			m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	
0.007994	0.944150	108.09	0.020605	0.944538	142.74
0.007413	0.944124	108.79	0.013618	0.944306	143.24
0.006977	0.944113	108.40	0.013410	0.944303	142.94
0.005995	0.944078	108.47	0.009073	0.944163	142.96
0.004744	0.944036	108.14	0.008047	0.944131	142.86
			0.007337	0.944107	142.96
			0.005625	0.944053	142.71
	m ¹ N ⁴ OHCyt			m ^{1,N4} e ⁵ Cyt	
0.013913	0.944518	97.21	0.011737	0.994462	145.38
0.011507	0.944404	97.42	0.011656	0.944487	145.02
0.006709	0.944190	96.02	0.010528	0.944432	146.61
0.006431	0.944170	97.09	0.010417	0.944452	145.07
0.005186	0.944116	96.36	0.009481	0.944417	145.12
0.004286	0.944069	97.26	0.008568	0.944395	145.64
	m ^{1,N4} Cyt			m ^{1,N4} p ⁵ Cyt	
0.018975	0.944701	111.36	0.017560	0.944507	158.90
0.014183	0.944526	112.82	0.016054	0.944459	159.21
0.013646	0.944522	111.79	0.012584	0.944356	159.52
0.013246	0.944509	111.82	0.009955	0.944287	159.36
0.012696	0.944468	112.95	0.008248	0.944157	158.74
0.010808	0.944433	111.79			
				m ^{1,N4} b ⁵ Cyt	
			0.012052	0.944233	176.90
			0.010685	0.944190	177.68
			0.009312	0.944162	176.78
			0.008976	0.944158	176.21

W rozpatrywanym zakresie stężeń wartości pozornych molowych objętości, V_ϕ nie wykazują zależności od stężenia. Z tego względu średnia wartość pozornej molowej objętości jest równa cząstkowej molowej objętości w roztworze nieskończenie rozcieńczonym. Wartości cząstkowych molowych objętości dla roztworów wodnych ^[70] oraz metanolu i N,N-dwumetyloformamidu przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Cząstkowe molowe objętości roztworów badanych substancji.

	V_2^0 ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)		
	Woda ^[70]	Metanol	DMF
Cyt	73.7	58.31 ± 0.08	68.75 ± 0.05
m ¹ Cyt	91.91 ± 0.02	83.43 ± 0.08	91.10 ± 0.06
m ^{1.5} Cyt	107.46 ± 0.03	103.38 ± 0.09	108.38 ± 0.06
m ^{1,N4} Cyt	109.29 ± 0.08	101.44 ± 0.34	112.09 ± 0.13
m ^{1,N4} e ⁵ Cyt	142.4 ± 0.1	131.74 ± 0.11	145.47 ± 0.12
m ^{1,N4} p ⁵ Cyt	156.7 ± 0.1	147.26 ± 0.07	159.15 ± 0.11
m ^{1,N4} b ⁵ Cyt	172.0 ± 0.1	174.53 ± 0.08	176.89 ± 0.15
m ¹ N ⁴ OH Cyt	97.7 ± 0.05	83.37 ± 0.04	96.89 ± 0.12
m ^{1.5} N ⁴ OH Cyt	113.72	103.94 ± 0.09	117.27 ± 0.09
m ¹ N ⁴ Om Cyt	119.92 ± 0.04	110.56 ± 0.04	122.35 ± 0.09
m ^{1.5} N ⁴ Om Cyt	135.08 ± 0.1	128.31 ± 0.09	142.92 ± 0.04

8.4. Wyniki wyznaczonych funkcji przejścia.

Porównanie entalpii rozpuszczania, tj określenie molowej entalpii przejścia, w różnych rozpuszczalnikach umożliwia analizę oddziaływań pomiędzy cząsteczką badanej substancji a rozpuszczalnikiem w jakim się znajduje bez znajomości entalpii sublimacji. Wyniki obliczeń entalpii przejścia określonych według zależności 7.19 i 7.20 przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Molowa entalpia przejścia woda-metanol, woda- N,N-dwumetyloformamid.

	$\Delta_{tr}H_m$ (kJ·mol ⁻¹)	
	(Woda - Metanol)	(Woda - DMF)
Cyt	-9.02	-14.3
m ¹ Cyt	-2.66	-8.76
m ^{1,5} Cyt	3.17	-1.59
m ¹ N ⁴ OHCyt	1.73	-7.43
m ^{1,5} N ⁴ OHCyt	4.58	-1.97
m ¹ N ⁴ OmCyt	10.61	4.35
m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	13.61	8.51

W Tabeli 16 przedstawiono cząstkowe molowe objętości przejścia woda – metanol, woda – DMF badanych substancji określone według zależności (7.21) i (7.22). Uzyskana przez R. R. Scruggsa i innych [60] wartość entalpii przejścia woda – metanol dla cytozyny wynosi $-9.61 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ i pozostaje w dobrej zgodności z wartością uzyskaną w tej pracy. Ujemna wartość entalpii przejścia woda – metanol jest wynikiem silnych własności akceptorowych metanolu, co potwierdza założenia przyjęte w tej pracy.

Tabela 16. Cząstkowa molowa objętość przejścia woda-metanol, woda- N,N-dwumetyloformamid.

	$V_{2, tr}^0$ (cm ³ ·mol ⁻¹)	
	(Woda - Metanol)	(Woda - DMF)
Cyt	-15.39	-4.95
m ¹ Cyt	-8.48	-0.81
m ^{1,5} Cyt	-4.08	0.98
m ¹ N ⁴ OHCyt	-14.33	-0.81
m ^{1,5} N ⁴ OHCyt	-9.78	3.55
m ¹ N ⁴ OmCyt	-9.36	2.43
m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	-6.77	7.84

Uzyskane wyniki cząstkowych molowych objętości przejścia woda – metanol dla wszystkich badanych związków są bardziej ujemne od cząstkowych molowych objętości przejścia woda – DMF. Kierunek zmian uzyskanych dla $V_{2,tr}^0$ woda – metanol i woda – DMF jest podobny: Cyt < m¹Cyt < m^{1,5}Cyt <> m¹N⁴OHCyt oraz m^{1,5}N⁴OHCyt <> m¹N⁴OmCyt < m^{1,5}N⁴OmCyt. Najbardziej ujemne wartości przejścia uzyskane dla cytozyny, mogą być związane z większym, hydrofobowym charakterem cytozyny w stosunku do jej pochodnych.

8.5. Wartości udziałów grupowych wyznaczone z danych entalpii solwatacji i cząstkowych molowych objętości.

Wartości cząstkowych molowych objętości oraz entalpii solwatacji zostały przeanalizowane w oparciu o ogólny schemat addytywności grup. (rozdział 7.3.2)

Wyniki obliczeń udziałów Z_i wnoszonych przez grupy funkcyjne w wartość cząstkowych molowych objętości przedstawiono w Tabeli 17. Grupami Z_i są: CH₂(N), CH₂(C), CH₂(O) oraz O

Tabela 17. Udziały Z_i w wartościach cząstkowych molowych objętości V_2^0 określone dla grup CH₂(N), CH₂(C), CH₂(O) oraz O.

	Y_0	$Z_{CH_2(N)}$	$Z_{CH_2(C)}$	$Z_{CH_2(O)}$	Z_O	R
Woda	73.7±0.6	18.1±0.4	15.6±0.2	21.8±0.6	6.0±0.5	0.9997
Metanol	61.8±4.7	19.1±3.0	17.9±1.4	25.8±4.7	3.8±3.6	0.9880
DMF	69.5±2.1	21.3±1.3	16.3±0.6	25.5±2.1	8.1±1.7	0.9975

Na podstawie zebranych w Tabeli 17 wartości udziałów grupowych można przedstawić następujące wnioski:

- Udział grupy CH₂ jest różny w zależności od miejsca jej podstawienia, przy czym $Z_{CH_2(O)} > Z_{CH_2(N)} > Z_{CH_2(C)}$. Największy udział w wartość cząstkowej molowej objętości wnoszony jest przez grupę CH₂ podstawioną na atomie tlenu O⁴ grupy hydroksylowej, a najmniejszy przez te samą grupę podstawioną na

atomie węgla pierścienia cytozyny. Jeśli przyjmiemy, że najmniejsza wartość udziału w cząstkowej molowej objętości jest związana z najmniejszym udziałem w zmianach otoczki solwatacyjnej spowodowanej przestaniem atomów cząsteczki badanej substancji grupą CH₂, to przestanie węgla pierścienia cytozyny powoduje najmniejsze zaburzenia w otoczce solwatacyjnej cząsteczki badanej substancji.

- W roztworach metanolu wartość odpowiadająca udziałowi wnoszonemu przez atom tlenu grupy hydroksylowej Z_O jest bardzo mała. Ten fakt wskazuje, że oddziaływania metanol - tlen są silne i wynikają z donorowych własności metanolu. Wartość udziału Z_O odpowiadający podstawieniu atomu tlenu w pozycji N⁴ jest większy dla DMF niż dla wody. Może to potwierdzać własności akceptorowe N,N-dwumetyloformamidu.
- Określone udziały są zgodne z wartościami literaturowymi ^[137], wynoszącymi Z_{CH₂} = 16.0 ± 0.5 cm³·mol⁻¹, Z_O = 7.6 ± 0.1 cm³·mol⁻¹ (woda); Z_{CH₂} = 18.21 ± 0.01 cm³·mol⁻¹, Z_O = 7.5 ± 0.2 cm³·mol⁻¹ (DMF); Z_{CH₂} = 17.72 ± 0.01 cm³·mol⁻¹, Z_O = -1.1 ± 0.2 cm³·mol⁻¹ (metanol).
- Specyficzność podstawienia grupy CH₂ na atomach azotu N¹ lub węgla C⁵ pierścienia cytozyny jest widoczne jedynie dla metanolu i wody.

Poprzez porównanie entalpii solwatacji par związków różniących się między sobą grupą CH₂ określono udziały wnoszone przez tę grupę w wielkość entalpii solwatacji. Wyniki przedstawiono w *Tabeli 18*. Dla przykładu w wodnym roztworze, podstawienie grupy CH₂ na węglu w pozycji C⁵ powoduje zmniejszenie entalpii solwatacji o 3.8, 6.2 i 7 kJ·mol⁻¹ odpowiednio dla 1-metylocytozyny, 1-metylo-N⁴-hydroksycytozyny i 1-metylo-N⁴-metoksycytozyny, podczas gdy efekt związany z podstawieniem grupy hydroksylowej na azocie N⁴ powoduje zwiększenie udziałów dwukrotnie: 15.6 i 17.9 kJ·mol⁻¹ dla 1-metylocytozyny i 1,5-dwumetylocytozyny

Tabela 18. Przyrosty $\delta\Delta_{solv}H_m$ w wielkościach entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$.

	Woda				Metanol				DMF			
	Typ podstawienia											
	C ⁵	N ¹	O ⁴	O(N ⁴)	C ⁵	N ¹	O ⁴	O(N ⁴)	C ⁵	N ¹	O ⁴	O(N ⁴)
	$\delta\Delta_{solv}H$											
1 Cyt		6.0 (2-1)				12.3 (2-1)				11.5 (2-1)		
2 m ¹ Cyt	3.8 (3-2)			15.6 (4-2)	9.6 (3-2)			20.0 (4-2)	10.9 (3-2)			17.0 (4-2)
3 m ^{1.5} Cyt				17.9 (5-3)				19.3 (5-3)				17.5 (5-3)
4 m ¹ N ⁴ OHCyt	6.0 (5-4)		13.5 (6-4)		8.8 (5-4)		22.4 (6-4)		11.5 (5-4)		25.2 (6-4)	
5 m ^{1.5} N ⁴ OHCyt			15.0 (7-5)				24.1 (7-5)				25.5 (7-5)	
6 m ¹ N ⁴ OmCyt	7.5 (7-6)				10.6 (7-6)				11.8 (7-6)			
7 m ^{1.5} N ⁴ OmCyt												
Średnia wartość	5.8	6.0	14.3	16.7	9.6	12.3	23.2	19.6	11.4	11.5	25.3	17.2
Odchylenie standardowe	1.5	0.0	0.7	1.1	0.7	0.0	0.9	0.4	0.3	0.0	0.1	0.3

Dla wodnych roztworów w przypadku podstawienia grupy CH₂ na atomie węgla C⁵ można zaobserwować wpływ obecności na atomie azotu N⁴ grupy hydroksylowej lub metoksyłowej. Ten fakt wskazuje na istnienie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy atomem tlenu grupy metoksyłowej lub hydroksylowej i grupą metylową z atomu węgla C⁵.

Zgodnie z zależnością 7.13 określono cztery typy udziałów w wartości entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$: $Z_{CH_2(C)}$, $Z_{CH_2(N)}$, $Z_{CH_2(O)}$, Z_O , które odpowiadają odpowiednio podstawieniu atomu wodoru związanego z atomami C, N, i O przez grupę CH₃ oraz zastąpieniu atomu wodoru z atomu azotu N⁴ przez grupę OH. Wyniki obliczeń przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Udziały Z_i dla grup $CH_2(N)$, $CH_2(C)$, $CH_2(O)$ i O w wartościach entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$.

	Y_o	$Z_{CH_2(N)}$	$Z_{CH_2(C)}$	$Z_{CH_2(O)}$	Z_o	R
Woda	-128.9±1.3	5.8±1.1	5.0±1.7	14.3±1.3	16.7±1.3	0.9976
	-128.9±0.7	6.0±1.0	3.8±1.0* 6.8±0.7^	14.3±0.7	15.2±1.0	0.9996
Metanol	-137.9±0.6	9.6±0.5	12.2±0.8	23.2±0.6	19.6±0.6	0.9998
DMF	-143.2±0.3	11.4±0.1	11.3±0.4	25.3±0.3	17.2±0.3	0.9999

Obliczenia wykonano gdy na azocie N^4 jest podstawiona grupa hydroksylowa lub metoksykowa (^) oraz gdy jej brak (*).

Wyniki przedstawione w Tabeli 19 pozwalają na następujące wnioski:

- Efekt podstawienia grupy metylowej na atomach pierścienia cytozyny w roztworach wodnych jest znacząco mniejszy niż w metanolu i DMF wyróżniając w ten sposób donorowo-akceptorowe własności wody od akceptorowych własności DMF i silnych preferencji donorowych metanolu.
- Analiza poszczególnych udziałów grupowych wskazuje, że podstawienie grupy metylowej na atomach azotu lub węgla w DMF powoduje podobne zmiany w wartości $\Delta_{solv}H_m$.
- W przypadku roztworów wodnych wyróżniono dwa typy udziałów odpowiadających podstawieniu grupy metylowej na atomie węgla C^5 , tj. 6.8 i 3.8 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, które określono odpowiednio gdy na azocie jest podstawiona grupa metoksy- lub hydroksy- i gdy jej brak. Istnienie dwóch wartości udziału odpowiadającego podstawieniu grupy CH_2 na atomie węgla w pozycji C^5 wskazuje, iż w wodnych roztworach dominuje izomer trans wiązania C^4-N^4 1-metylo- N^4 -hydroksycytozyny. Podczas gdy w metanolu i DMF dominuje izomer cis. W celu potwierdzenia tego zjawiska wykonano widma ^1H NMR.

W Tabeli 20 przedstawiono wielkości przesunięć chemicznych, stałe sprzężenia oraz oszacowane szerokości linii rezonansowych.

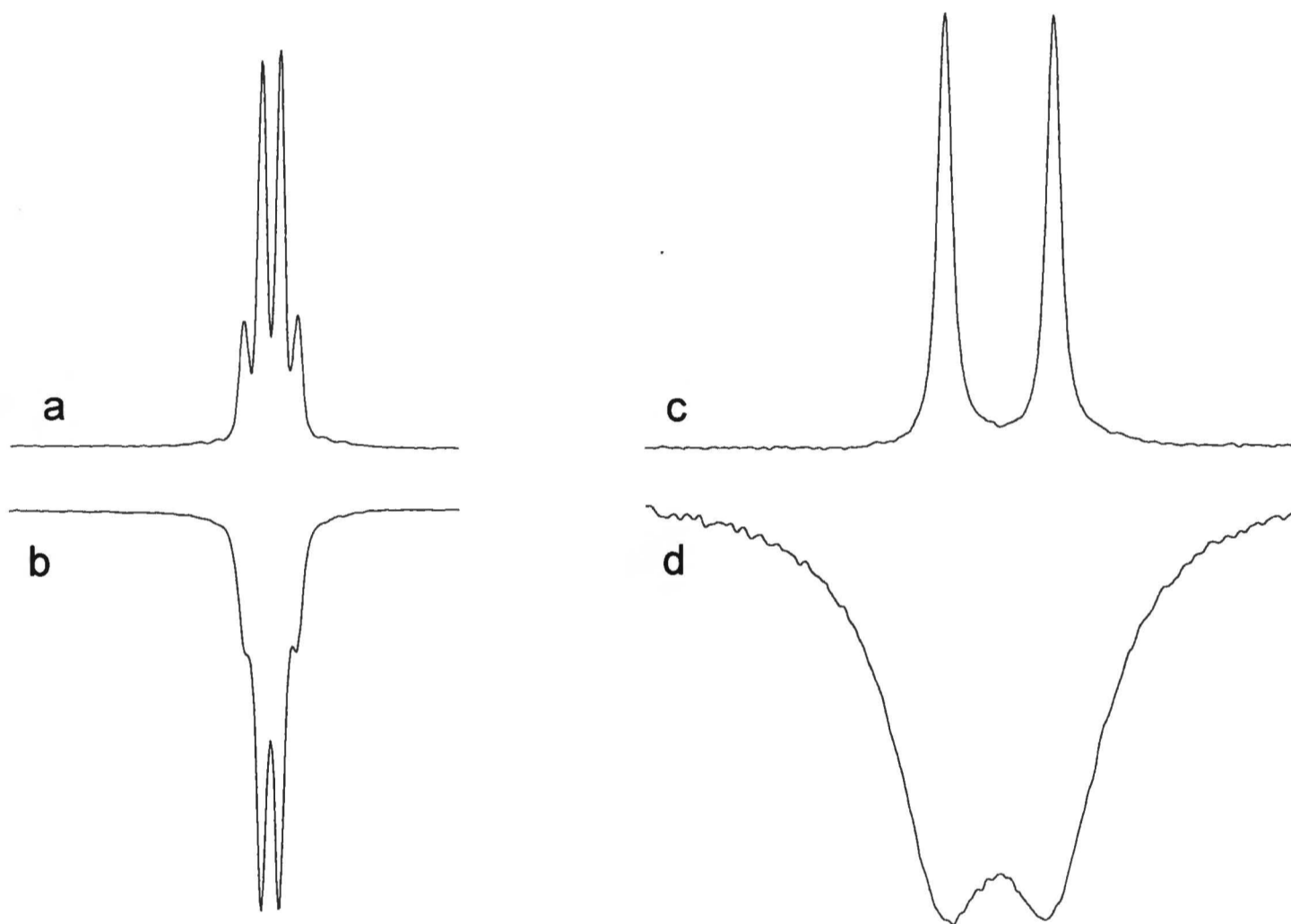
Tabela 20. Dane NMR wodnych i metanolowych roztworów $m^{1,5}N^4OHCyt$ i m^1N^4OHCyt .

		δ_{H6} [ppm]	$\delta_{H5,CH3}$ [ppm]	$J_{5,6}$ [Hz]	Szerokość linii [Hz]
$m^{1,5}N^4OHCyt$	Metanol	6.61	1.68	1.34	0.77
	Woda	6.74	1.78	1.34	0.82
m^1N^4OHCyt	Metanol	6.77	5.51	8.05	0.99
	Woda	6.87	5.66	8.00	5.00

Na Rysunku 16 przedstawiono porównanie widm 1H NMR roztworów wodnych i metanolu dwóch badanych związków 1,5-dwumetylo- N^4 -hydroksycytozyny oraz 1-metylo- N^4 -hydroksycytozyny.

W przypadku $m^{1,5}N^4OHCyt$ zmiana rozpuszczalnika spowodowała tylko niewielką zmianę wartości przesunięć chemicznych bez zmiany kształtu linii rezonansowych. Rezonansowa szerokość linii również nie zmienia się (Rysunek 16a, 16b). Podobnie w przypadku m^1N^4OHCyt w metanolu (Rysunek 16c) rezonansowa szerokość linii jest bliska dla linii uzyskanej dla $m^{1,5}N^4OHCyt$ (~ 1Hz). W wodnych roztworach (Rysunek 16d) analizowana szerokość linii rezonansowych poszerza się do około 5Hz, podczas gdy szerokości linii wewnętrznego wzorca jest 1.2 Hz. Do weryfikacji uzyskanych różnic w szerokościach linii wykonano widma mieszaniny obu związków w wodzie. W tym rodzaju eksperymentu uzyskane rezultaty demonstrują znaczne różnice w szerokościach rezonansowych linii dla dwóch związków. To dowodzi, że

poszerzenia szerokości linii m^1N^4OHCyt nie wynika z błędu doświadczalnego a jest spowodowane istnieniem równowagi konformacyjnej cis/trans (Rysunek 14c, 14d). Równowaga ta zachodzi prawdopodobnie przez przejściowy stan, w którym pojedyncze wiązanie C^4-N^4 ulega zmianie konformacyjnej (Rysunek 14e).



Rysunek 16. Widma 1H NMR wodnych (b, d) i metanolowych (a, c) roztworów $m^{1,5}N^4OHCyt$ i m^1N^4OHCyt .

Porównując udział wnoszone w wartość entalpii solwatacji przez grupę CH_2 na węglu C^5 z podanymi wnioskami z badań NMR można w przybliżeniu określić efekt związany z przejściem konformacyjnym jako różnicę pomiędzy wartościami $3.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ i $6.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, co wynosi $3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Zaprezentowana analiza dowodzi, że w roztworach wodnych zarówno $m^1\text{N}^4\text{OHCyt}$ jak i $m^1\text{N}^4\text{OmCyt}$ istnieją w równowadze konformacyjnej cis/trans wiązania $\text{N}^4\text{-C}^4$.

8.6. Parametry strukturalne cytozyny i jej pochodnych w badanych roztworach.

W Tabeli 21 podano wartości następujących parametrów strukturalnych badanych związków: powierzchnia cząsteczki badanego związku, powierzchnie poszczególnych atomów, wartości objętości molekularnych V_2^M , objętości otoczki solwatacyjnej $V_{1,\text{soln}}$, parametrów α i β oraz wartości polarności P . W Tabeli 21 zamieszczono również wartości cząstkowych molowych objętości V_2^0 badanych substancji w wodzie ^[70], metanolu i DMF.

Tabela 21. Parametry strukturalne badanych związków.

		Objętość [cm ³ ·mol ⁻¹]			Powierzchnia [Å ²]				β	α	P
		V_2^0	V_2^M	$V_{1,solv}$	S_O	S_N	$S_{H(N,O)}$	S^M			
Cyt	Woda	73.7	46.9	431.5	14.6	24.6	20.6	102.0	26.8	-0.062	0.586
	Metanol	58.31±0.08	47.2	671.8	14.6	24.4	20.3	100.4	11.11	-0.017	0.388
	DMF	68.75±0.05	47.6	1146.7	14.5	23.8	19.8	98.1	21.15	-0.018	0.202
m ¹ Cyt	Woda	91.91±0.02	56.2	477.7	13.3	22.6	13.8	116.5	35.71	-0.075	0.427
	Metanol	83.43±0.08	56.7	738.3	13.2	22.4	13.6	108.5	26.73	-0.036	0.328
	DMF	91.10±0.06	57.2	1247.1	12,9	21.7	13,3	111.1	33.90	-0,027	0.119
m ^{1,5} Cyt	Woda	107.46±0.03	65.5	518.4	13.3	22.4	12.5	130.3	41.96	-0.081	0.369
	Metanol	103.38±0.09	66.1	794.6	13.2	22.0	12.2	127.6	37.28	-0.046	0.276
	DMF	108.38±0.06	66.8	1334.1	12.9	21.4	11.9	124.1	41.58	-0.031	0.096
m ^{1,N4} Cyt	Woda	109.29±0.08	65.3	528.8	13.3	18.0	6.4	131.6	43.99	-0.084	0.286
	Metanol	101.44±0.34	65.6	818.4	13.2	17.4	6.2	116.7	35.84	-0.044	0.262
	DMF	112.09±0.13	66.7	1347.4	12.9	18.0	6.3	111.9	45.39	-0.034	0.056
m ^{1,N4} e ⁵ Cyt	Woda	142.4±0.1	84.7	607.0	13.3	17.1	4.5	156.9	57.70	-0.095	0.222
	Metanol	131.74±0.11	85.2	913.7	13.1	18.1	6.6	129.6	46.54	-0.051	0.221
	DMF	145.47±0.12	87.0	1515.7	12.9	17.2	6.0	148.8	58.47	-0.039	0.048
m ^{1,N4} p ⁵ Cyt	Woda	156.7±0.1	93.7	649.2	13.4	17.1	4.5	164.1	63.00	-0.097	0.213
	Metanol	147.26±0.07	95.5	972.9	13.2	18.1	6.1	138.9	51.76	-0.054	0.204
	DMF	159.15±0.11	97.5	1621,9	12,9	17.1	5.9	153,7	61.65	-0.038	0.044
m ^{1,N4} b ⁵ Cyt	Woda	172.0±0.1	103.3	693.8	13.3	17.0	4.6	175.8	68.70	-0.099	0.199
	Metanol	174.53±0.08	105.6	1036.1	13.1	17.8	6.1	146.9	68.93	-0.067	0.193
	DMF	176.89±0.15	108.1	1699.5	12.9	17.2	5.9	161.1	68.79	-0.043	0.041
m ¹ N ⁴ OHCyt	Woda	97.7±0.05	60.7	504.5	23.9	19.9	14.1	124.7	27.8	-0.073	0.464
	Metanol	83.37±0.04	61.3	778.2	23.6	19.4	13.8	121.9	22.07	-0.028	0.369
	DMF	96.89±0.12	61.8	1307.0	23.0	18.6	13.5	118.5	35.09	-0.027	0.114
m ^{1,5} N ⁴ OHCyt	Woda	113.72	69.9	542.7	23.8	19.5	12.9	138.3	43.82	-0.081	0.406
	Metanol	103.94±0.09	70.4	826.0	23.4	19.0	12.6	138.9	33.54	-0.040	0.310
	DMF	117.27±0.09	71.3	1405.5	22.8	18.3	12.1	131.0	45.97	-0.033	0.092
m ¹ N ⁴ OmCyt	Woda	119.92±0.04	70.1	567.1	21.5	19.2	5.8	142.2	49.82	-0.088	0.327
	Metanol	110.56±0.04	70.5	863.5	21.1	18.7	5.4	139.4	40.06	-0.046	0.286
	DMF	122.35±0.09	71.2	1443.2	20.6	17.8	5.2	135.5	51.15	-0.035	0.038
m ^{1,5} N ⁴ OmCyt	Woda	135.08±0.1	78.9	602.2	21.5	18.8	4.4	156.2	56.18	-0.093	0.286
	Metanol	128.31±0.09	79.7	915.3	21.0	18.2	4.1	152.4	48.61	-0.053	0.257
	DMF	142.92±0.04	80.7	1530.7	20.4	17.4	3.8	148.3	62.22	-0.041	0.026

8.7. Zależności wyznaczonych entalpii solwatacji od powierzchni dostępnych dla rozpuszczalnika.

Zmiany wartości doświadczalnie wyznaczonych entalpii solwatacji dla pochodnych cytozyny wskazują na zmiany oddziaływań cząsteczek badanych substancji z rozpuszczalnikiem.

Przyjmując istnienie różnic pomiędzy zmianami wynikającymi z przestłaniania atomów polarnych S_p i niepolarnych S_{np} cząsteczki, entalpię solwatacji można przedstawić jako: $\Delta_{solv}H_m = f(S_p, S_{np})$ [138-140]. Ze względu na różny sposób oddziaływania cząsteczek badanych substancji z rozpuszczalnikiem przyjęto następujące założenie. W roztworach wodnych występują oddziaływania, w których cząsteczka wody bierze udział jako donor i akceptor protonów, a tym samym oddziałuje z atomami tlenu, azotu i wodorami polarnymi; metanol natomiast, który jest lepszym donorem niż akceptorem protonów oddziałuje z tlenem i azotem cząsteczki badanej substancji, natomiast DMF tylko z wodorami. Do grupy atomów polarnych należy tlen, azot i wodór związany z atomem tlenu bądź azotu, do drugiej niepolarniej atomy węgla i pozostałych wodorów. Zgodnie z tym powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika odpowiednio dla wody, metanolu i DMF możemy przedstawić jako:

$$S_p = S_N + S_O + S_{H(N,O)} \quad \text{Woda} \quad (8.2)$$

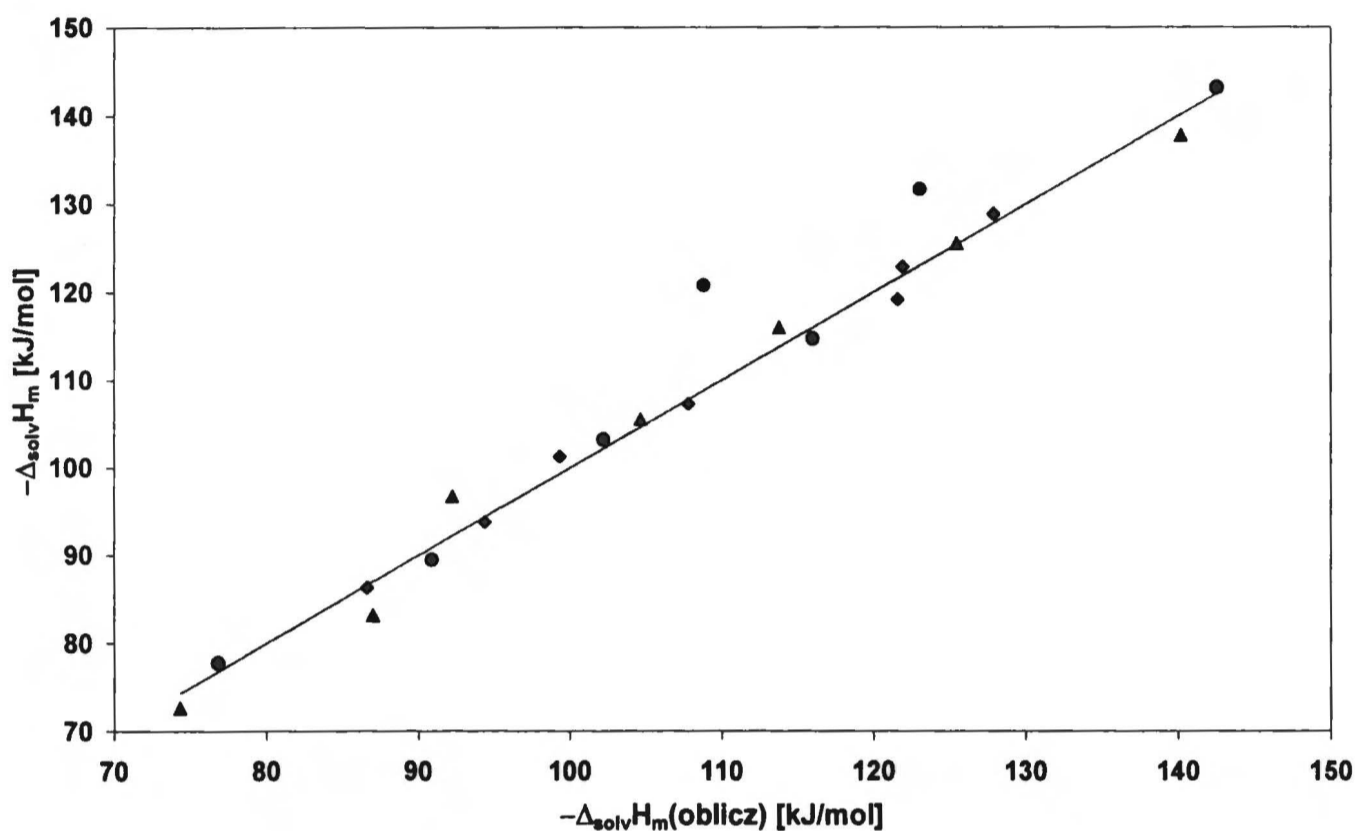
$$S_p = S_N + S_O \quad \text{Metanol} \quad (8.3)$$

$$S_p = S_{H(N,O)} \quad \text{DMF} \quad (8.4)$$

Zgodnie z tym entalpia solwatacji została przedstawiona w funkcji wartości powierzchni polarnej S_p , i niepolarniej S_{np} jako:

$$\Delta_{solv}H_m = aS_{np} + bS_p + c \quad (8.5)$$

Rysunek 17. Entalpia solwatacji $\Delta_{\text{sol}v}H_m$ jako funkcja powierzchni polarnej S_p i niepolarnej S_{np} dla wody (\blacklozenge), metanolu(\blacktriangle), i DMF (\bullet).



Na *Rysunku 17*, na osi y, przedstawione są wielkości entalpii solwatacji określone z danych doświadczalnych entalpii rozpuszczania i sublimacji. Na osi x przedstawiono wartości entalpii solwatacji określone z zależności 8.5.

Oszacowane parametry a , b , c dla trzech rozpuszczalników przedstawiono w *Tabeli 22*.

Tabela 22. Parametry a , b , c , R określone dla zależności $\Delta_{\text{sol}v}H_m^\infty = f(S_{np}, S_p)$.

	a [kJ·Å ⁻²]	b [kJ·Å ⁻²]	c [kJ]	R
Woda	-0.86 ± 0.05	-0.52 ± 0.13	-20 ± 2	0.992
Metanol	1.3 ± 0.10	3.1 ± 0.6	-344 ± 5	0.976
DMF	1.11 ± 0.46	0.3 ± 1.8	-240 ± 6	0.951

Udziały powierzchni polarnej S_p i niepolarnej S_{np} w entalpii solwatacji, określonej dla każdego rozpuszczalnika są różne. W przypadku roztworów wodnych ekspozycja niepolarnych jak i polarnych atomów powoduje zmniejszenie entalpii solwatacji (współczynniki a i b , Tabela 22, mają wartość ujemną). Udział wnoszony przez grupy polarne w wartość entalpii solwatacji w metanolu jest większy niż ten wnoszony przez grupy niepolarne, ale w przeciwieństwie do wodnych roztworów oba udziały zwiększają entalpię solwatacji (parametry a i b mają znak dodatni). W roztworze DMF oba udziały odpowiadające powierzchni polarnej i niepolarnej są zbliżone do siebie w granicy błędu ($a \approx b$) Zmniejszenie jakości modelu dla DMF ($R = 0.951$) może być konsekwencją oddziaływań dipol-dipol pomiędzy badaną substancją a rozpuszczalnikiem, stabilizowanymi przez duży moment dipolowy cząsteczki DMF.

Analogicznie jak entalpię solwatacji entalpię oddziaływań substancja rozpuszczona – rozpuszczalnik można przedstawić jako funkcje powierzchni polarnej i niepolarnej:

$$\Delta_{int}H_m = a'S_{np} + b'S_p + c' \quad (8.6)$$

Oczekiwano także dobrej korelacji funkcji przejścia z parametrami strukturalnymi cząsteczki substancji rozpuszczonej:

$$\Delta_{tr}H_m^{i,j} = a(i)S_{np(i)} + b(i)S_{p(i)} - a(j)S_{np(j)} - b(j)S_{p(j)} \quad (8.7)$$

gdzie indeksy i oraz j wskazują na rodzaj rozpuszczalnika, $S_{p(i)}$, $S_{np(i)}$ polarna i niepolarna powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika. Określone współczynniki $a(i)$, $b(i)$, przedstawiono w Tabeli 23.

Tabela 23. Parametry $a(i)$ (woda), $a(j)$ (metanol, DMF), $b(i)$ (woda), $b(j)$ (metanol, DMF) i współczynnik R , określone dla zależności $\Delta_{tr}H_m^{ij} = f(S_{np}, S_p)$.

	$a(i)$, [kJ·Å ⁻²]	$b(i)$, [kJ·Å ⁻²]	R
Woda	-0.51±0.07	-0.14±0.02	
	$a(j)$, [kJ·Å ⁻²]	$b(j)$, [kJ·Å ⁻²]	0.991
Metanol	0.57±0.13	0.20±0.02	
DMF	0.27±0.03	0.25±0.01	

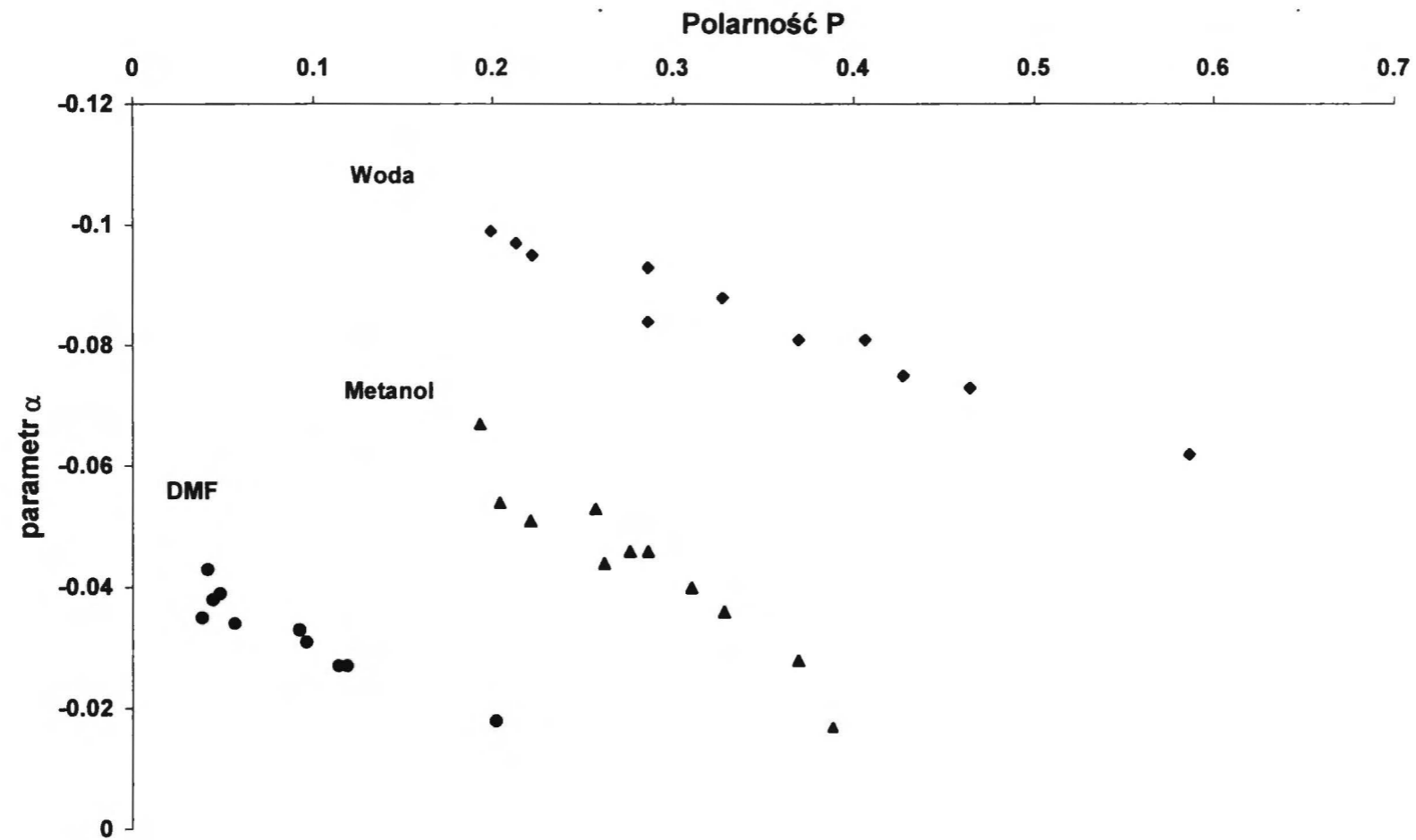
Na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić iż molowa entalpia przejścia jest funkcją powierzchni badanej substancji.

8.8. Zależności względnych gęstości otoczki solwatacyjnej od polarności badanych związków w roztworach wodnym, metanolu i DMF.

Na podstawie uzyskanych wartości cząstkowych molowych objętości określono, na podstawie zależności 7.15, wartości względnych gęstości otoczki solwatacyjnej, α . Na podstawie zdefiniowanej dla każdego rozpuszczalnika polarności P podjęto próby określenia zależności:

$$\alpha = \alpha_0 + bP \quad (8.8)$$

Zależności te przedstawiono na *Rysunku 18*, a określone wartości parametrów α_0 i b podano w *Tabeli 24*:



Rysunek 18. Zależności $\alpha = f(P)$ dla wody (\blacklozenge), metanolu (\blacktriangle) i N,N-dwumetyloformamidu (\bullet).

Tabela 24. Parametry α_0 i b określone dla wody, metanolu i N,N-dwumetyloformamidu.

	α_0	b	R
Woda	-0.117±0.003	0.093±0.007	0.957
Metanol	-0.100±0.004	0.200±0.022	0.904
DMF	-0.043±0.002	0.126±0.011	0.939

W każdym rozpatrywanym przypadku określona zależność ma charakter liniowy. To pozwala stwierdzić, że przyjęta droga analizy oddziaływań pomiędzy badaną substancją a rozpuszczalnikiem jest poprawna.

Wartość α_0 zawiera informacje o zmianach gęstości rozpuszczalnika spowodowanej wprowadzeniem do niego całkowicie apolarnej cząsteczki badanej substancji. Najmniejsza wartość α_0 , świadczy o najbardziej zakłóconej strukturze rozpuszczalnika w otoczce solwatacyjnej. Wartość α_0 uzyskana dla roztworów wodnych badanych związków różni się od uzyskanych wartości dla innych związków. Dla przykładu wartość α_0 uzyskana dla alkilowych pochodnych uracylu w wodzie wynosi -0.146 ± 0.003 ^[32], natomiast w metanolu -0.087 ± 0.003 ^[141]. Pomiedzy wartościami α_0 określonymi dla roztworów wodnych, metanolowych i N,N-dwumetyloformamidu obserwuje się znaczne różnice. Porównując uzyskane wartości możemy stwierdzić iż najmniejsze zmiany w otoczce solwatacyjnej są powodowane przy wprowadzeniu cząsteczki badanej substancji do N,N-dwumetyloformamidu a największe zmiany w otoczce solwatacyjnej istnieją w wodnych roztworach badanych substancji.

8.9. Związki pomiędzy własnościami objętościowymi i entalpowymi badanych związków.

Zgodnie z zastosowanym modelem oddziaływań pomiędzy substancją badaną a rozpuszczalnikiem, cząsteczka badanej substancji wprowadzona do rozpuszczalnika powoduje reorganizację cząsteczek rozpuszczalnika w

sąsiedztwie cząsteczki substancji rozpuszczonej. Jak było przedstawione w pracy [105] energia swobodna Gibbsa reorganizacji cząsteczek wody wokół małych cząsteczek alkanów jest proporcjonalna do parametru β zdefiniowanego jako różnica pomiędzy eksperymentalnie określonymi cząstkowymi molowymi objętościami a objętością molekularną. Analogiczna relacja została znaleziona pomiędzy parametrem β i logarytmem rozpuszczalności wybranych pochodnych uracyli [142]. Można więc uznać że parametr β może być interpretowany w zależności od energii swobodnej Gibbsa. Postulowana zależność prowadzi do sformułowania prostego modelu oddziaływań pomiędzy rozpuszczalnikiem a badaną substancją.

Cząsteczka badanej substancji oddziałuje z otaczającymi ją cząsteczkami rozpuszczalnika. To oddziaływanie powoduje zmiany w organizacji rozpuszczalnika w otoczeniu cząsteczki badanej substancji.

Zmiany w otoczce solwatacyjnej wynikają ze zmian gęstości rozpuszczalnika w stosunku do czystego rozpuszczalnika. Zmiany w gęstości otoczki solwatacyjnej są obserwowane w zmianach cząstkowych molowych objętości badanych substancji. W pierwszym przybliżeniu energia swobodna reorganizacji rozpuszczalnika jest proporcjonalna do zmian gęstości i objętości rozpuszczalnika w miejscu gdzie ta zmiana zachodzi, natomiast ostatecznie możemy zapisać:

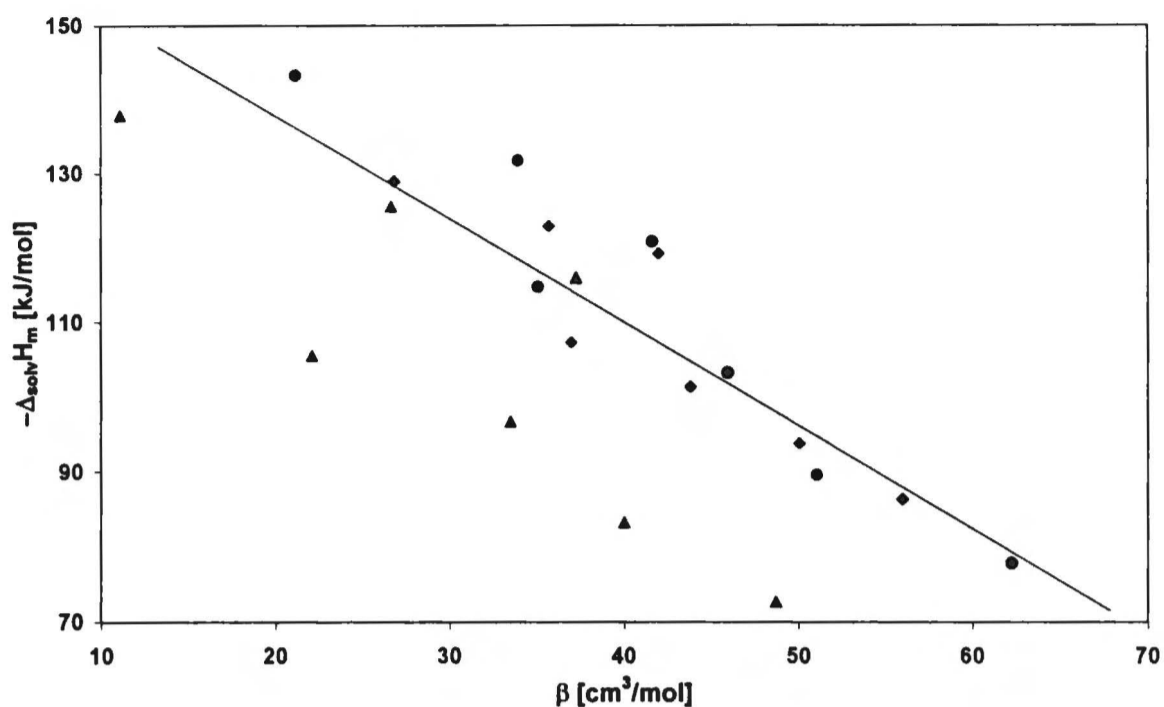
$$\Delta_{solv}G = a\beta + b \quad (8.9)$$

$$\text{gdzie } \beta = V_2^0 - V_2^M$$

Zakładając, że wkład entropii nie podlega zmianom podjęto próbę wyznaczenia zależności parametru β od entalpii solwatacji $\Delta_{solv}H_m$ dla roztworów badanych związków, według zależności:

$$\Delta_{solv}H = a\beta + b \quad (8.10)$$

Rysunek 19. Zależności $\Delta_{\text{solv}}H = a\beta + b$ określone dla wody (\blacklozenge), metanolu(\blacktriangle), i DMF (\bullet).



Wyniki, zaprezentowane na *Rysunku 19* wskazują, że entalpia solwatacji zależy od parametru β , będącym miarą reorganizacji rozpuszczalnika spowodowaną wprowadzeniem cząsteczki badanej substancji. Wynik ten jest potwierdzeniem przypuszczeń, że dla pochodnych pirymidynowych zasad kwasów nukleinowych można oczekiwać prostej korelacji pomiędzy własnościami objętościowymi a entalpowymi tych związków.

9. Ogólne wnioski.

Przedmiotem przeprowadzonych badań była cytozyna i jej następujące pochodne: 1-metylocytozyna ($m^1\text{Cyt}$) 1,5-dwumetylocytozyna ($m^{1,5}\text{Cyt}$) 1-metylo- N^4 -hydroksycytozyna ($m^1N^4\text{OHCyt}$); 1,5-dwumetylo- N^4 -hydroksycytozyna ($m^{1,5}N^4\text{OHCyt}$); 1-metylo- N^4 -metoksycytozyna ($m^1N^4\text{OmCyt}$); 1,5-dwumetylo- N^4 -metoksycytozyna ($m^{1,5}N^4\text{OmCyt}$), 1, N^4 -dwumetylocytozyna ($m^{1,N^4}\text{Cyt}$); 1, N^4 -dwumetylo-5-etylocytozyna ($m^{1,N^4}e^5\text{Cyt}$); 1, N^4 -dwumetylo-5-propylocytozyna ($m^{1,N^4}p^5\text{Cyt}$) i 1, N^4 -dwumetylo-5-butylocytozyna ($m^{1,N^4}b^5\text{Cyt}$).

Badania prowadzono w trzech rozpuszczalnikach. Do badań wybrano: wodę, metanol i N,N-dwumetyloformamid, ze względu na ich różne własności protonowo – akceptorowe.

Wyznaczono następujące wielkości charakteryzujące badane układy:

- Entalpie rozpuszczania badanych związków w metanolu i N, N-dwumetyloformamidzie.
- Częstkowe molowe objętości roztworów cytozyny i jej pochodnych w wodzie i N,N-dwumetyloformamidzie.

a także

- Prężności par badanych związków w różnych temperaturach oraz entalpie sublimacji metodą przepływu gazu obojętnego nad substancją sublimującą.
- Określono parametry strukturalne, charakteryzujące cytozynę i jej metylo-, metoksy- i hydroksy- pochodne.
- Na podstawie eksperymentalnie wyznaczonych entalpii rozpuszczania i sublimacji określono entalpie solwatacji.
- Obliczono wielkości entalpii koniecznej do pokonania sił międzycząsteczkowych w rozpuszczalniku w celu wytworzenia „wnęki”, w której umieszczona jest cząsteczka substancji rozpuszczonej.
- Określono entalpie oddziaływania badanych substancji z rozpuszczalnikiem.
- Na podstawie określonych entalpii solwatacji i cząstkowych molowych objętości określono udziały grupowe w tych wielkościach.
- Wyznaczono entalpie przejścia oraz cząstkowe molowe objętości przejścia woda – metanol, woda – N,N–dwumetyloformamid.

Na podstawie analizy udziałów grupowych w wielkościach entalpii solwatacji oraz badań z zastosowaniem spektroskopii NMR potwierdzono istnienie różnych form konformacyjnych N⁴ podstawionej cytozyny. Stwierdzono, że 1-metylo-N⁴-hydroksycytozyna i 1-metylo-N⁴-metokscytozyna istnieją w roztworach wodnych w równowadze konformacyjnej cis/trans wiązania N⁴ – C⁴.

Zależności pomiędzy parametrami strukturalnymi, tj. powierzchnią badanych związków, dostępną dla rozpuszczalnika a wielkościami entalpowymi: entalpią solwatacji, entalpią przejścia i entalpią oddziaływań, potwierdziły słuszność przyjętego w niniejszej pracy sposobu oddziaływań badanych substancji z rozpuszczalnikiem.

W przypadku wielkości objętościowych znaleziono relacje pomiędzy parametrem α , określanym jako względna objętość otoczki solwatacyjnej a polarnością, zdefiniowaną jako iloraz powierzchni atomów polarnych oraz całkowitej powierzchni cząsteczki badanej substancji.

Potwierdzono przypuszczenia, że dla pochodnych pirymidynowych zasad kwasów nukleinowych można oczekiwać prostej zależności pomiędzy własnościami objętościowymi i entalpowymi badanych związków.

Na podstawie przeprowadzonej analizy uzyskanych danych stwierdzono, że cytozyna i jej metylo-, metoksy- i hydroksy- pochodne są związkami hydrofobowymi. Potwierdzono, że woda jako zarówno dobry akceptor jak i donor protonów oddziałuje z atomami tlenu, azotu i wodoru cząsteczki badanej substancji; metanol, który jest lepszym donorem niż akceptorem protonów oddziałuje z atomami tlenu i azotu, natomiast DMF tylko z polarnymi atomami wodoru.

10. Literatura

- 1 K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.*, 5 (1998) 954.
- 2 D. Liu, S. Moran, E. T. Kool, *Chem. Biol.*, 4 (1997) 919.
- 3 J. S. Kwiatkowski, B. Pullman, „Tautomerism and electronic structure of biological pyrimidines”, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 18 (1975) 199.
- 4 B. Pullman, A. Pullman, „Electronic aspects of purine tautomerism”, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 13 (1971) 77.
- 5 J. Elugero, C. Marzin, A. R. Katritzky and P. Linda, „The Tautomerism of Heterocycles”, *Adv. Heterocycl. Chem. Suppl. I* (1976).
- 6 W. Saenger „Principles of Nucleic Acid Structure”.
- 7 C. Janion, *Acta Biochim. Pol.*, 19 (1972) 261.
- 8 I. Wempen, J. J. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1972) 261.
- 9 D. M. Brown, M. J. E. Hewlins and P. Schell, *J. Chem. Soc.(C)*, (1968) 1925.
- 10 A. Leś, L. Adamowicz, W. Rode, *Biochimica et Biophysica Acta*, 39 (1993) 1173.
- 11 J. S. Kwiatkowski, W. B. Person, K. Szczepaniak, M. Szcześniak, *Acta Biochim. Pol.*, 34 (1987) 165.
- 12 A. Niedźwiecka-Kornaś, B. Kierdaszuk, R. Stolarski, D. Shugar, *Biophysical Chemistry*, 71 (1998) 87.
- 13 M. Kilday, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 83 (1978) 539.
- 14 M. Kilday, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 83 (1978) 529.
- 15 T. T. Herskovits, J. P. Harrington, *Biochemistry*, 11 (1972) 4800.
- 16 M. Kilday, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 83 (1978) 347.
- 17 T. L. Gilchrist, „Heterocyclic chemistry” (1992), wydanie II.
- 18 C. McLaren, R. Datema, C. A. Knupp and R. A. Buroker, *Antiviral Chemistry, Chemotherapy*, 2 (1991) 321.
- 19 M. J. Shelton, A. M. O'Donnell and G. D. Morse, *Ann. Pharmacother.*, 26 (1992) 660.

- 20 B. Golankiewicz, A. Zielenkiewicz, J. Zeidler, W. Zielenkiewicz, *J. Therm. Analysis*, 45 (1995) 667.
- 21 B. Golankiewicz, G. Perlovich, J. Poznański, J. Sitkowski, L. Stefaniak, J. Zeidler and W. Zielenkiewicz, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 11 (1999) 2533.
- 22 C. Bokemeyer, J. T. Hartmann, M. A. Kuczyk, M. C. Truss, J. Beyer, U. Jonas, L. Kanz, *World J. Urol.*, 14 (1996) 354.
- 23 W. Kauzmann, *Advan. Protein Chem.*, 14 (1959) 1.
- 24 G. Nemethy and H. A. Scheraga, *J. Chem. Phys.*, 36 (1962) 3401.
- 25 G. Nemethy and H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 66 (1962) 1773.
- 26 A. Ben-Naim, *J. Chem. Phys.*, 54 (1971) 1387.
- 27 A. Ben-Naim, *J. Chem. Phys.*, 54 (1971) 3696.
- 28 H. S. Frank, M. W. Evans, *J. Chem. Phys.*, 13 (1945) 507.
- 29 H.S. Frank, W. Y. Wen, *Discuss. Faraday Soc.*, 24 (1957) 133.
- 30 B. Lee, „Mathematics and Computers in Biomedical Applications” (1985).
- 31 A. Hvidt, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 12 (1983) 1.
- 32 W. Zielenkiewicz, J. Poznański, A. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 27 (1998) 543.
- 33 S. J. Gill and I. Wadso, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 73 (1976) 2955.
- 34 N. Nicols, R. Skold, C. Spink, J. Suurkuusk and I. Wadso, *J. Chem. Thermodyn.*, 8 (1976) 1087.
- 35 A. Zielenkiewicz, G. Roux-Desgranges, A. H. Roux, J-P.E. Grolier, K.L. Wierzchowski, W. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 22 (1993) 907.
- 36 L. R. Pratt, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 36 (1985) 433.
- 37 J. Y. Huot, C. Jolicoeur, „Chemical Physics of Solvation” (1985), Elsevier, Amsterdam.
- 38 J. M. Kessler, „Sowremiennyje problemi chemii rastworow”, (1986), Nauka, Moskwa.
- 39 Y. K. Cheng, P. J. Rossky, *Biopolymers*, 50 (1999) 742.
- 40 J. C. Rodriguez – Cabello, M. Alonso, T. Perez, M. M. Herguedas, *Biopolymers*, 54 (2000) 282.
- 41 Y. K. Cheng, P.J. Rossky, *Biophys. J.*, 76 (1999) 1734.
- 42 L. Lavery, A. Pullman, B. Pullman, *Int. J. Quant. Chem.*, 20 (1991) 49.

- 43 J. L. Finney, *J. Mol. Biol.*, 96 (1975) 721.
- 44 E. Silla, I. Tunon and L. Pascuar-Ahuir, *J. Comp. Chem.*, 78 (1991) 877.
- 45 W. Zielenkiewicz, *Pure Appl. Chem.*, 71 (1999) 1285.
- 46 S. Taniewska-Osińska, H. Piekarski, *Wiadomości Chemiczne*, 48 (1994) 341.
- 47 R. W. Balk, G. Somsen, *J. Phys. Chem.*, 89 (1985) 5094.
- 48 C. De Visser, G. Somsen, *J. Phys. Chem.*, 78 (1974) 1719.
- 49 A. Rouw, G. Somsen, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 78 (1982) 3397.
- 50 W. J. Heuvelsland, M. Bloemendal, C. De Visser, G. Somsen, *J. Phys. Chem.*, 84 (1980) 2391.
- 51 M. Booij, G. Somsen, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 78 (1982) 2851.
- 52 W. G. McMillan, J. E. Mayer, *J. Chem. Phys.*, 13 (1945) 276.
- 53 J. E. Mayer, *J. Chem. Phys.*, 18 (1950) 1426.
- 54 J. L. Friedman, *J. Chem. Phys.*, 32 (1966) 1351.
- 55 J. J. Kozak, W. S. Knight, W. Kauzmann, *J. Chem. Phys.*, 48 (1968) 675.
- 56 H. Piekarski, *Wiadomości Chemiczne*, 47 (1993) 129
- 57 M. Kilday, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 84 (1979) 231.
- 58 M. Kilday, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 83 (1978) 547.
- 59 J. Alvarez, R. Biltonen, *Biopolymers*, 12 (1973) 1815.
- 60 R. L. Scruggs, E. K. Achter, P. D. Ross, *Biopolymers*, 11 (1972) 1961.
- 61 P. M. Cullis, R. Wolfenden, *Biochemistry*, 20 (1981) 3024.
- 62 J. N. Spencer, T. A. Indge, *J. Solution Chem.*, 12 (1983) 847.
- 63 J. K. Ahmed, G. A. Derwish, F. I. Kanbour, *J. Solution Chem.*, 10 (1981) 343.
- 64 R. L. Benoit, M. Frechette, *Thermochim. Acta*, 126 (1988) 155.
- 65 R. L. Benoit, M. Frechette, *Thermochim. Acta*, 127 (1988) 125.
- 66 J. N. Spencer, S. W. Barton, K. A. Smith, W. S. Wolbach, J. F. Powell, M. R. Kirschenbaum, D. W. Firth, E. M. Harris, T. A. Judge, *Can. J. Chem.*, 61 (1983) 2695.
- 67 M. Żółkiewski, W. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 20 (1991) 517.
- 68 J. W. Larsen, L. J. Magid, *J. Phys. Chem.*, 78 (1974) 834.
- 69 F. I. Kanbour, J. K. Ahmed, G. A. W. Derwish, *J. Solution Chem.*, 12 (1983) 763.
- 70 A. Zielenkiewicz, K. Busserolles, G. Roux-Desgranges, A. H. Roux, J. P.

- E. Grolier, W. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 24 (1995) 623.
- 71 N. Kishore, R. Bhat, J. C. Ahluwalia, *Biophysical Chemistry*, 33 (1989) 227.
- 72 S. G. Patel, N. Kishore, *J. Solution Chem.*, 24 (1995) 25.
- 73 J. Szemińska, W. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *Biophys. Chem.*, 10 (1979) 409.
- 74 K. J. Yanson, B. I. Verkin, A. B. Shlyarevskii, A. B. Teplitsky, *Stud. Biophys.*, 46 (1974) 29.
- 75 R. Sabbah, *Thermochim. Acta*, 35 (1980) 73.
- 76 D. Ferro, L. Bencivenni, R. Teghil, R. Mastromarino, *Thermochim. Acta*, 42 (1980) 75.
- 77 P. M. Burkinshaw, C. T. Mortimer, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1984) 75.
- 78 P. Szterner i inni, *J. Chem. Thermodynamics*, oddane do druku.
- 79 G. Bardi, L. Bencivenni, D. Ferro, B. Martinni, S. Nunziante Cesaro, R. Teghil, *Thermochim. Acta*, 40 (1980) 275.
- 80 M. Nabavian, R. Sabbah, R. Chastel, M. Laffitte, *J. Chim. Phys.*, 74 (1977) 115.
- 81 K. J. Yanson, A. B. Teplitsky, L. F. Sukhodub, *Biopolimers*, 18 (1979) 1149.
- 82 L. B. Clark, G. G. Peschel, I. Jr. Tinoco, *J. Phys. Chem.*, 69 (1965) 3915.
- 83 R. M. Stephenson, S. Malanowski, „Handbook of the Thermodynamics of Organic Compounds”, Elsevier, New York, (1987).
- 84 W. Zielenkiewicz, A. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *J. Solution Chem.*, 23 (1994) 1125.
- 85 M. Żółkiewski, A. I. Vyugin, G. A. Krestov, W. Zielenkiewicz, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, 37 (1989) 433.
- 86 A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, L. F. Sukhodub, O. T. Glukhova, K. L. Wierzchowski, *Acta Biochimica Polonica*, 34 (1987) 157.
- 87 A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, L. F. Sukhodub, O. T. Glukhova, A. B. Teplitsky, K. L. Wierzchowski, *J. Solution Chem.*, 13 (1984) 757.
- 88 A. B. Teplitsky, K. J. Yanson, O. T. Glukhova, A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *Biophys. Chem.*, 11 (1980) 17.

- 89 A. B. Teplitsky, O. T. Glukhova, L. F. Sukhodub, K. J. Yanson, A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, J. Kosiński, K. L. Wierzchowski, *Biophys. Chem.*, 15 (1982) 139.
- 90 A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, *Bull. Pol. Ac.:Chem.*, 47 (1999) 265.
- 91 A. Zielenkiewicz, W. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *Thermochim. Acta*, 237 (1994) 49.
- 92 A. Zielenkiewicz, M. Dramiński, G. Roux-Desgranges, A. H. Roux, I. Kulis, J-P.E. Grolier, W. Zielenkiewicz, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, 40 (1992) 203.
- 93 A. Zielenkiewicz, M. Wszelaka-Rylik, *J. Solution Chem.*, 26 (1997) 551.
- 94 W. Zielenkiewicz, A. Zielenkiewicz, J-P.E. Grolier, A. H. Roux, G. Roux-Desgranges, *J. Solution Chem.*, 21 (1992) 1.
- 95 J-P.E. Grolier, A. H. Roux G. Roux-Desgranges, I. Tomaszkiwicz, W. Zielenkiewicz, *Thermochim. Acta*, 176 (1991) 141.
- 96 A. Zielenkiewicz, K. Busserolles, G. Roux-Desgranges, A. H. Roux, J. P. E. Grolier, M. Dramiński, A. Zgit-Wróblewska, J. Poznański, W. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 25 (1996) 529.
- 97 W. Zielenkiewicz, A. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *Pure Appl. Chem.*, 66 (1994) 503.
- 98 W. Zielenkiewicz, A. Zielenkiewicz, K. L. Wierzchowski, *J. Solution Chem.*, 22 (1993) 975,
- 99 W. Zielenkiewicz, *J. Chem. Eng. Data*, 45 (2000) 626.
- 100 M. Kamiński, W. Zielenkiewicz, *J. Chem. Thermodynamics*, 28 (1996) 79.
- 101 W. Zielenkiewicz, *J. Thermal Analysis*, 45 (1995) 761.
- 102 W. Zielenkiewicz, *Bull. Pol. Ac. Chem.*, 43 (1995) 167.
- 103 M Kamiński, *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, 40 (1992) 2.
- 104 M. Kamiński, W. Zielenkiewicz, *Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, 33 (1987) 583.
- 105 W Zielenkiewicz, J. Poznański, *J. Solution Chem.*, 27 (1998) 245.
- 106 W. Zielenkiewicz, J. Poznański, *J. Mol. Liquids*, 81 (1999) 37.
- 107 A. Zielenkiewicz, M. Wszelaka-Rylik, J. Poznański and W. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 27 (1998) 235.
- 108 E. Utzig, niepublikowane dane.

- 109 K. Suwińska, niepublikowane dane
- 110 A. Zielenkiewicz, *Bull. Pol. Ac. Chem.*, 48 (2000) 267.
- 111 W. Zielenkiewicz, E. Margas, „Podstawy teoretyczne kalorymetrii dynamicznej”, Ossolineum, Wrocław (1990).
- 112 Podręcznik do ćwiczeń z chemii fizycznej. Praca zbiorowa pod redakcją W. Świętosławskiego, PWN, 1952.
- 113 Manual Instruction Anton Paar.
- 114 Manual Instruction Anton Paar.
- 115 M. Kamiński, A. Szlaski, *Scientific Instrumentation*, 1 (1986) 55.
- 116 W. Zielenkiewicz, G. Perlovich, M. Wszelaka-Rylik, *J. Thermal Anal.*, 57 (1999) 225.
- 117 M. Davies, J. I. Jones, *Trans. Faraday Soc.*, 50 (1954) 1042.
- 118 E. Morawetz, *J. Chem. Thermodynamics*, 4 (1972) 455.
- 119 K. Bayreuther, G. Braner, M. Farker, K. Naß and K-H Schmidt, *Int. Laboratory News*, May (1994).
- 120 E. Marti, A. Geoffroy, B. F. Rodorf and M. Szelagiewicz, *Proc. of the Sixth Int. Conf. on Thermal Analysis*, Birkhauser Verlag, Basel, 1, (1980) 305.
- 121 J. D. Cox and G. Pilcher, *Thermochemistry of organic and organometallic compounds*, London, New York: Acad. Press, (1970) 643.
- 122 S. Klosky, L. P. L. Woo and R. J. Flanigan, *J. Am. Chem. Soc.*, 49 (1927) 1280.
- 123 H. Hirsbrunner, *Helv. Chim. Acta*, 17 (1934) 477.
- 124 M. Colomina, C. Monzon, C. Turrion and J. Layez, *Paper of the 5th Experimental Thermodynamics Conference*, Lancaster, (1972).
- 125 M. Colomina, P. Jimenez and C. Turrion, *J. Chem. Thermodynamics*, 14 (1982) 779.
- 126 A. G. Wiedemann and H. P. Waughan, *Proc. Toronto Symp. Therm. Anal.*, 3rd, (1970) 233.
- 127 L. Malaspina, R. Gigli and G. Bardi, *J. Chem. Phys.*, 59 (1973) 387.
- 128 R. Chastel, F. Steckel and H. Tachoire, *Proc. First Int. Conf. Calorimetry Thermodynamics*, Warszawa, 512 (1969).
- 129 O. Sinanoglu, *Int. J. Quant. Chem.*, 18 (1980) 381.
- 130 O. Sinanoglu, *J. Chem. Phys.*, 75 (1981) 463.
- 131 I. Halicioglu and O. Sinanoglu, *Ann. New York Acad. Sci.* 158 (1969) 308.

- 132 R. A. Pierotti, *Chem. Rev.*, 76 (1976) 717.
- 133 M. Clark, R. D. Cramer III and N. Van Opdenbosh, *J. Comput. Chem.*, 10 (1989) 982.
- 134 H. Berthod and A. Pulmann, *J. Chem. Phys.*, 62 (1965) 942.
- 135 N. Morel-Desrosiers and J.-P. Morel, *Can. J. Chem.*, 59 (1981) 1.
- 136 W. Zielenkiewicz, P. Zielenkiewicz, P. V. Lapshov, *J. Thermal Anal.*, 45 (1995) 775.
- 137 A. Inglese, F. Mavelli, R. De Lisi and S. Milolito, *J Solution Chem.*, 26 (1997) 319.
- 138 R. S. Spolar, J. R. Livingstone, M. T. Record Jr. *Biochemistry*, 31 (1992) 3947.
- 139 K. P. Murphy, E. Freire, Y. Paterson, *Proteins*, 21 (1995) 83.
- 140 D. Xie, E. Freire, *Proteins*, 19 (1994) 291.
- 141 W. Zielenkiewicz, M. Wszelaka-Rylik, *J. Mol. Liquids*, przyjęte do druku.
- 142 W. Zielenkiewicz, J. Poznański, A. Zielenkiewicz, *J. Solution Chem.*, 29 (2000) 626.



B 343/2001

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

B.343/2001



00000000258760