

第二节 超高压生物处理的化学基础

1、勒沙特列 (Le chateliter) 原理

生物分子的特性是由其内在相互反应取得的平衡来决定的,该平衡同样存在与溶剂的相互反应中。温度和压力都是影响化学反应的条件。因此在施加超高压时,会对化学反应和平衡产生影响。

勒沙特列 (Le chateliter) 原理是一个热力学原理。它指出:若维持化学平衡状态的因素发生改变,化学平衡遭到破坏,平衡移动的热力学趋向是:系统的平衡会自动地向减弱外来的影响的方向移动。

勒沙特列原理的应用必须具备以下几个条件:

- 系统必须已经达到化学平衡状态;
- 可影响化学平衡状态的因素必须发生改变;
- 这种趋向是化学平衡系统的内部机制,无须外力帮助。

由此,可判断勒沙特列原理能否扩大到非化学反应平衡的其它平衡系统,如相平衡(如水蒸气和冰的平衡)、溶解平衡(如啤酒瓶里的二氧化碳气体和溶解在啤酒里的二氧化碳的平衡或者氯化钠晶体与它的饱和溶液之间的平衡)等。所有这些平衡,都是物质状态相互转化的平衡。化学平衡是元素存在形态的相互转化,相互平衡和溶解平衡是原子或分子形态的转化。

具体来说,施加超高压有利于加速使被处理的物质体积减小的方向的反应。它不仅影响被处理材料的内部平衡,而且影响它们反应的速率。这不仅是指化学反应,也包括相平衡。例如:水在 200MPa 条件下,它的冰点向下移动,从 0°C 降至 -20°C。

生物分子动力行为的初期来源是系统的自由体积,它会随着压力的增加而减小。温度的影响是通过增加动能和自由体积而发生作用的。要完全理解生物分子的动力学行为,必须对温度和压力的联合影响进行研究。从直觉上看,压力的影响要比温度的影响容易解释。它遵循 Le chatelier-Braun 原则:压力影响系统初期的容积,而温度的变化引起容积和能量的变化。

假设 x 是平衡或过程速率的数量特性因子,则温度和压力的影响可以写成:

$$\left(\frac{\delta \ln \chi}{\delta T}\right)_p = \left(\frac{A \text{ characteristic energy}}{RT^2}\right) \quad (2-5)$$

$$\left(\frac{\delta \ln \chi}{\delta P}\right)_T = \left(\frac{A \text{ characteristic volume}}{RT}\right) \quad (2-6)$$

这个公式概括了我们阐述的压力和温度对平衡和过程速率的影响的热力学和动力学的概念。

2、相变的 Clapeyron 方程

式 2-7 的 Clapeyron 方程表达了相平衡条件下,压力 p 和温度 T_m 的变化的定量关系。Clapeyron 方程适用于纯物质(单组分系统)任意两相间的变化。而不适用于多组分系统(如盐水系统)。

$$\frac{dT_m}{dP} = \frac{T_m \Delta V}{\Delta H} \quad (2-7)$$

因为在相变时容积的变化 (ΔV) 和焓 (ΔH) 总体上是正的, 可知, 随着压力的增加, 能够提高相变温度。对于有机化合物, dT_m/dP 近似于 $15\text{K}/100\text{MPa}$ 。就是说压力每增加 100MPa , 相当于减少 15K 的温度的物理效应。

水的基本规律是一个重要的例外。在室温条件下, 为了得到冰相(VI)大约需要 1000MPa 的压力, 它的密度较高, 不同于常态的冰。这一点可以从水的相图看出。

依照 Le chatelier-Braun 原则, 压力促进了结晶状态的形成。但是, 脂质的转化温度依赖烃链的长度, 温度随压力变化的速率几乎依赖链的长度 ($dT/dP = 20\text{K}/100\text{MPa}$)。不饱和度较高的烃链降低脂质的 dT/dP 值 ($dT/dP = 14\text{K}/100\text{MPa}$)。

蛋白质在膜内形成时, 情况更复杂。在生物膜中, 围绕在膜蛋白质的脂质的物理状态在膜结合酶的活性方面扮演的重要角色。另外, 像细菌之类的活组织的膜的完整性对压力非常敏感。这解释了为什么压力能够杀菌。同时观察到某些膜结合酶的活性对温度和压力的依赖性是非线性的。这也说明超高压对酶的灭活和激活为什么比灭菌显得复杂。

3、化学反应的自由能

自然界存在大量的自发过程, 例如水由高处向低处的自发流动; 热由高温物体向低温物体的自发传递; 铁在潮湿空气中会自动生锈; 强酸和强碱水溶液相混合会自动发生中和反应等。

自发过程必须具备以下几个条件

- (1) 单向性, 自动地向一个方向进行, 不会自动地逆向进行。若要逆向进行, 需要外力做功。
- (2) 具有做功的潜能。如由山上滚下的石头可推动其它物体运动做功。
- (3) 具有一定限度, 如石头滚到山脚下, 即不再滚动, 达到平衡。

如果在等温等压系统中有化学反应发生, 那末反应的Gibbs自由能变化 ΔG 是该反应自发进行方向的热力学判据。自发反应总是向减少系统总的Gibbs自由能的方向进行的。因此, 化学反应发生一个反应式的量变时, Gibbs自由能变化 ΔG_m 是一个重要的参数, 它的负值被定义为化学反应的亲势 (affinity) A 也被称为反应的推动力 (driving force)。即

$$A = -\Delta G_m = -\sum_i \nu_i \mu_i \quad (2-8)$$

$A > 0$ 时反应的自发进行方向是向右正向进行, $A < 0$ 则为向左反向进行, $A = 0$ 时反应达到平衡。显然反应的 ΔG 或 ΔG_m 值与温度和压力的关系是需要清楚了解和掌握的。

在生物化学反应过程中 $N \leftrightarrow D$, 这里 N 代表活性 (原有的) 结构的酶, D 代表非活性 (变性的) 的结构, 平衡常数 $K (D/N)$ 是与 Gibbs 自由能相关的,

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (2-9)$$

温度和压力取决于下式

$$\frac{d\Delta G^0}{dT} = -\Delta S^0 \quad \frac{d\Delta G^0}{dP} = -\Delta V^0 \quad (2-10)$$

因为从 N 向 D 的实际上改变引起 Gibbs 自由能的变化是几 cal, 很显然, 周围的压力 $P \Delta V$ 对化学反应只有很小的影响。反应体积 $\Delta V = -82\text{ml}$ 对化学反应是一个大的值, $P \Delta V = 2\text{cal}$, 因此在流体介质中引起化学反应, 需要几百 MPa 的压力。 ΔV 和压力的平衡常数之间的关系最早由 Planck 给出:

$$-\Delta V^0 = \frac{RTd \ln K}{dP} \quad (2-11)$$

正的 ΔV 意味着在较高的压力下向反应物移动。较高的温度适合于发生吸热反应的反应的产品。在平衡时实际的变化不仅依赖于 ΔV 和 ΔH ，还依赖于平衡的位置。

类似的解释来自于压力对反应速率的描述：

$$-V_\alpha = \frac{RTd \ln k}{dP} \quad (2-12)$$

式中 V_α 是反应物的容积。

一个关于反应的重要的观点，压力影响反应速度依赖这样一个机制，压力加速或延缓了反应（即 V_α 可以是正的或负的）。例如，高压强制抑制美拉德反应。另一方面，高压加速了未饱和脂质的氧化。从物理的观点来看，负的活化能是没有意义的。事实上，观察到一个现象，就是过程的速率与强放热 *preequilibrium* 相伴而生。可以观察到压力诱使蛋白质变性并产生的一些热量。

4、体积变化的分子解释

被观察到的反应和激活的体积常常用“原有的”和溶剂的术语来解释：

$$\Delta V(\text{observed}) = \Delta V(\text{int rinsic}) + \Delta V(\text{solvent}) \quad (2-13)$$

原有体积受某些紧束力的影响，如在高压下容积减少和共价键的形成，或者键的断裂引起的体积的变化，导致分子量级的提高。溶质的分子或离子部分微团的体积 V_i ，增加少量的溶质可导致溶液体积的变化，它超过溶质微团的数量时，使其保持另一个变量常数。

$$V_i = \left(\frac{\delta V}{\delta n_i} \right)_{nppT} \quad (2-14)$$

式中 V 是在恒温和恒压下溶剂的体积，不是溶质分子或离子的体积，它还包括了溶解时的相互作用对体积的影响； n 是溶质微团增加的数量。

根据热力学的解释，部分微团的体积 V_i 应随着温度的变化有相应的改变：

$$\alpha = \left(\frac{\delta \ln V_i}{\delta T} \right)_p \quad (2-15)$$

在等温可压缩条件下，体积随压力的相对改变而变化：

$$\beta = - \left(\frac{\delta \ln V_i}{\delta P} \right)_T \quad (12)$$

对于生物聚合体 V_i 可以写成 3 项的总合：

$$V_i = V_{\text{atom}} + V_{\text{cavities}} + \Delta V_{\text{hydration}} \quad (13)$$

这里 V_{atom} 、 V_{cavities} 分别是原子、空隙的体积， $V_{\text{hydration}}$ 是因为溶剂和生物聚合体水合作用导致体积的变化。

原子的体积大小受温度和压力影响，温度升高导致膨胀，由压力提高导致收缩。另外两项是空隙的体积和水合作用的体积。溶质和溶剂的相互反应会引起体积变化，氨基酸的可压缩性是负的（即氨基酸溶解后比纯溶剂压缩性小），而蛋白质是正的，这个情况类似于葡萄糖与葡聚糖。表 2-3 给出了小分子、蛋白质和葡萄糖的热膨胀和压缩性。

表 2-3 水和己烷的热膨胀和等温压缩（25°C 和 0.1MPa）

材料	热膨胀 (10 ⁻⁶ /K)	压缩 (1/100GPa)
----	---------------------------	---------------

水	210	45.8
己烷	1380	166
氨基酸（在水中稀释）	100-1550	-0.28—-0.63
蛋白质（在水中稀释）	40-110	2-15
葡萄糖（在水中稀释）	1200	-13
右旋糖苷（在水中稀释）	1100	-10—-5

在溶液中离子的形成伴随着溶剂的电致收缩（即溶剂包围着离子的电荷）。电致收缩解释了水的自电离的体积的变化。



电致收缩还解释了压力对水溶液的 pH 值的影响。表 2-4 举例说明了醋酸和磷酸每 100MPa pH 值的变化（ $\Delta pH/100 MPa$ ）的情况。随着压力的提高，离子体积的变化幅度越来越小。另外，缓冲液若依赖于压力，则它对温度的依赖性就小。同样地，缓冲液若依赖于温度，则对压力的依赖性就小。在离子水的反应体积中，作为压力函数的 pH 值最终残留一个常数，而 pOH 会充分地变化。

表 2-4 普通酸的体积、焓和压力引起 pH 和 pOH 的变化（25℃和 0.1MPa）

酸的种类	$\Delta V/ml$	$\Delta H/kj$	$\Delta pH/100 MPa$	$\Delta pOH/100 MPa$
$R-NH_3 \leftrightarrow R-NH_3+H^-$	1	55	0	-0.3
$R-COOH \leftrightarrow R-COO^-+H^+$	-23	0	-0.2	-0.2
$H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-}+H^-$	-25	0	-0.4	0.1