

УДК 542.934:577.112.34

МЕТОД ИЗОПИЕСТИРОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ВОДЫ С АРОМАТИЧЕСКИМИ И ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2003 г. Д.Л. Котова, Д.С. Бейлина, Т.А. Крысанова

Воронежский государственный университет

Методом изопиестирования исследовано взаимодействие воды с твердыми образцами ароматических и гетероциклических аминокислот в широком интервале ее активности. Получены изотермы поглощения воды для тирозина и гидрохлорида гистидина. На основании данных рентгенодифракционного анализа и ИК – спектроскопии рассмотрены закономерности поглощения молекул воды HisHCl . Установлен ряд гидратационной способности изученных биомолекул. Выявлено, что способность аминокислот к образованию с водой совместной упаковки не совпадает с их растворимостью.

Проблему взаимодействия воды с белками можно рассматривать как влияние воды на структуру макромолекулы, а также влияния биомолекул на структуру растворителя. Вода участвует в построении биологических структур и играет в них структурную и функциональную роль. Молекулы аминокислот, выступающие как мономерные единицы белка, могут быть использованы в качестве модельных при изучении биопроцессов. Известно [1,2], что межмолекулярные взаимодействия в системе вода – биомолекула определяют растворимость соединения и способность его вступать в различные биологические превращения. В работе [3] представлен экспериментальный материал по структурам кристаллогидратов некоторых биологически активных веществ. Однако в литературе имеется ограниченное число работ о взаимодействии молекул воды с твердыми образцами биомолекул [4-6]. Применение метода изопиестирования позволяет получить экспериментальные данные о способности молекул воды взаимодействовать с биомолекулами в широком интервале ее активности и рассмотреть возможность образования с растворителем совместной упаковки.

Кристаллическая решетка аминокислот образована биполярными ионами, или цвиттер – ионами, то есть протон карбоксильной группы протонирует аминогруппу той же молекулы [7]. В работах [3,8] убедительно показано, что в молекулярных кристаллах укладка молекул подчиняется принципу плотнейшей упаковки. Внедрение молекул воды в структуру аминокислот, то есть образование совместной упаковки мелких молекул

воды и крупных молекул основного соединения, возможно, если молекулы растворителя смогут расположиться таким образом, чтобы реализовались условия для образования водородных связей. В данной работе представлены результаты исследования взаимодействия молекул воды с ароматическими и гетероциклическими аминокислотами в твердом состоянии. Выбор объектов исследования обусловлен большим интересом к этим аминокислотам, обладающим сравнительно небольшой растворимостью [8]. Каждая молекула аминокислоты обладает присущей ей специфической степенью гидратации, которая определяется наличием в ее структуре заряженных, полярных и гидрофобных групп.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования были выбраны аминокислоты фирмы “Reanal” (Венгрия): ароматические – фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr) и гетероциклические – триптофан (Trp) и моногидрохлорид гистидина (HisHCl). Растворимость их в воде при температуре 298 К составляет соответственно 3,00; 0,05; 1,14 и 4,30 г / 100 мл воды.

Исследование поглощения молекул воды аминокислотами проводили методом изопиестирования в интервале активности растворителя (a_w) от 0,110 до 0,990 [9] при $295,0 \pm 1,0$ К. Аминокислоты, массой 0,100 г, приводили в изопиестическое равновесие с насыщенными растворами солей, для которых известна активность молекул воды в паре. Время, в течение которого устанавливалось изопиестическое равновесие, зависело от

активности растворителя и составляло от 2 до 20 суток. Контроль за достижением равновесия и определение количества поглощенного растворителя осуществляли методом гравиметрии по изменению массы препарата. В качестве критерия достижения равновесия служило установление постоянной массы образца. Воспроизводимость результатов в серии из пяти параллельных опытов составила $S_r = 3,21 \cdot 10^{-3}$.

В качестве контрольных методов использовали метод ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. ИК – спектры снимали на приборах “Spekord 75 IR” и ИК – спектрометре ФТ–02 с Фурье преобразователем в интервале частот 400 – 4000 см^{-1} по методике [11]. Интерпретацию спектров осуществляли, используя данные литературы [10,11].

Рентгеноструктурный анализ осуществляли на дифрактометре ДРОН 4-17 в автоматическом режиме с шаговым перемещением 0,1 и временем экспозиции в каждой точке 1 секунда на СоК – излучении. Во время съемки дифрактограмм кюветы вращали вокруг нормали к отражающей плоскости для увеличения числа зерен, попадающих в «отражающее» положение. Для анализа полученных результатов проводили три параллельных измерения. Межплоскостные расстояния (d) и интенсивность (I) дифракционных линий оценивали по специальным программам [12]. Ошибка применяемого метода составила 5 %.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для твердых образцов фенилаланина, тирозина, триптофана и моногидрохлорида гистидина получены экспериментальные количественные данные по поглощению молекул воды, обладающих различной активностью. Установлено, что фенилаланин и триптофан взаимодействуют с растворителем только при его активности выше 0,980. Количество поглощенного растворителя составляет незначительную величину 0,2 моль_в/моль_{ак}. Можно предположить, что Phe и Trp при высокой активности молекул воды адсорбируют ее на своей поверхности, то есть, устанавливается равновесие между молекулами растворителя в паре и адсорбируемыми молекулами. Согласно данным ИК спектроскопии присутствие незначительного количества растворителя в структуре аминокислот приводит к появлению полос поглощения соответственно для Phe и Trp при 3680 см^{-1} и 3710 см^{-1} , характеризующих одиночные молекулы воды. Низкая гидратационная способность фенилаланина и триптофана, по-видимому, обусловлена насыщением связей $\text{COO}^- \dots \text{NH}_3^+$ за счет

внутри и межмолекулярных взаимодействий в структуре аминокислот [13,14].

Для Tyr и HisHCl получены изотермы поглощения воды, представляющие собой зависимость количества молекул воды, взаимодействующих с аминокислотой (n, моль_в/моль_{ак}), от активности растворителя (a_w) (рис.1,2). Для этих аминокислот изотерма имеет форму, выпуклую по отношению к оси абсцисс, характерную для гидрофобных соединений. Вид изотерм предполагает слабое взаимодействие в системе вода-аминокислота [15].

В интервале $a_w = 0,700 - 0,900$ гидратационная способность тирозина мала и составляет не более 0,2 моль_в/моль_{ак}. Изменение активности выше 0,900 вызывает рост степени гидратации тирозина. При $a_w = 0,990$ количество поглощенной воды составляет одну молекулу на молекулу аминокислоты. Согласно данным работы [13], в структуре тирозина

n, моль_в/ моль_{ак}

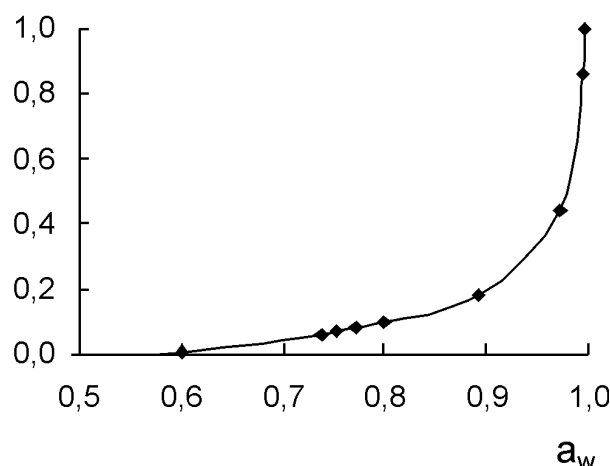


Рис. 1. Изотерма поглощения воды тирозином

n, моль_в/ моль_{ак}

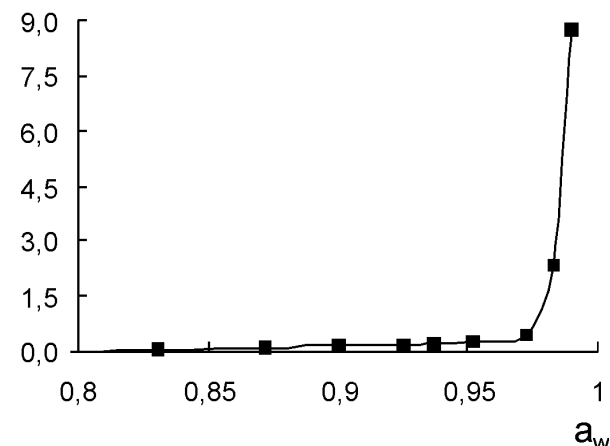


Рис. 2. Изотерма поглощения воды гидрохлоридом гистидина

молекулы вытянуты вдоль самой длинной оси и сосредоточены в отдельных слоях, почти параллельных плоскости. Максимум поглощения при 3212 см^{-1} на спектрограмме тирозина указывает на участие ОН-группы в образовании водородных связей в системе упаковки молекул в кристалле аминокислоты. Наличие полос поглощения при 3166 см^{-1} , 2510 см^{-1} и 2365 см^{-1} подтверждает литературные сведения о связи молекул тирозина, как в слоях, так и между слоями посредством связей N-H...O и ОН...О [13]. О присутствии молекул воды в структуре тирозина, выдержанного при высокой активности растворителя, свидетельствует уширение линии спектра в области $3600 - 2600\text{ см}^{-1}$. Появление полос поглощения при 2715 см^{-1} , а также изменение интенсивности и сдвиг максимума поглощения при 3166 см^{-1} в коротковолновую область (полоса при 3147 см^{-1}) позволяют предположить образование связи R – ОН...НОН в структуре аминокислоты. Специфичность взаимодействия тирозина с растворителем, вероятно, определяется наличием в его структуре ОН – групп, обладающих средством к молекулам воды. Экспериментальные данные указывают, что способность аминокислот к образованию с водой совместной упаковки не совпадает с их растворимостью в воде.

Взаимодействие моногидрохлорида гистидина с водой начинается при $a_w \geq 0,800$. В интервале

активности растворителя $0,800 - 0,975$ отмечается незначительное поглощение молекул воды. При $a_w = 0,975$ гидратационная способность HisHCl значительно увеличивается. Количество поглощенных молекул воды при $a_w = 0,990$ составляет $8,5\text{ моль}_w/\text{моль}_{AK}$. Присутствие молекул воды в структуре моногидрохлорида гистидина приводит к появлению дополнительных полос в области $3800 - 2500\text{ см}^{-1}$. Полосы поглощения при 2850 см^{-1} и 2780 см^{-1} обусловлены образованием связи молекул воды с азотом имидозольного кольца. Появление полос поглощения при 3400 см^{-1} , 3300 см^{-1} и 3224 см^{-1} свидетельствует о расположении молекул воды вблизи цвиттер-ионной группировки аминокислоты. На образование связей «вода-вода» у гидрофобного радикала и наличие одиночных молекул воды указывают полосы поглощения соответственно при 3490 см^{-1} и 3752 см^{-1} .

Методом рентгенодифракционного анализа установлено, что взаимодействие молекул воды с Tyr и HisHCl не приводит к изменению параметров его кристаллической решетки. Небольшое увеличение аморфного гало на дифрактограмме образца Tyr-H₂O (рис.3) свидетельствует об уменьшении кристалличности структуры тирозина, насыщенного водой. Отсутствие аморфного гало на дифрактограмме моногидрохлорида гистидина (рис.4) указывает на большую кристаллич-

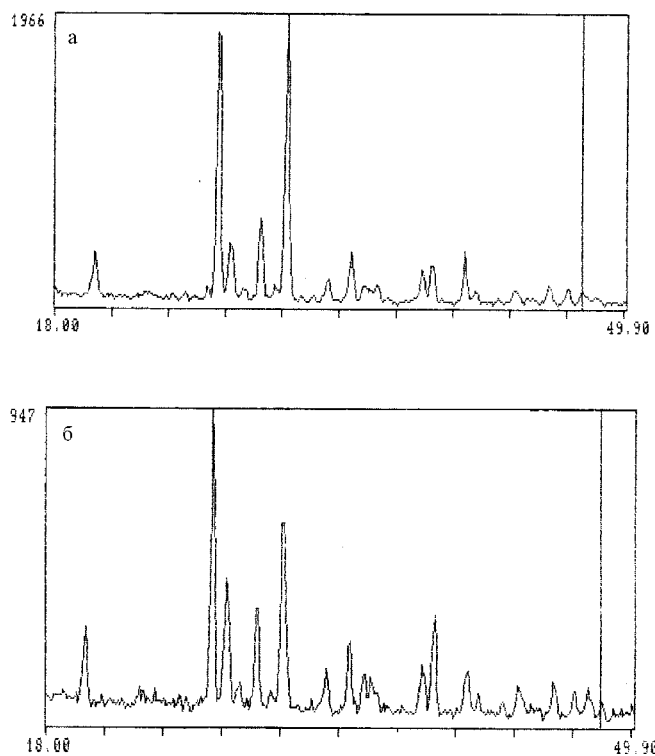


Рис. 3. Дифрактограммы: а) тирозина, б) моногидрохлорида тирозина

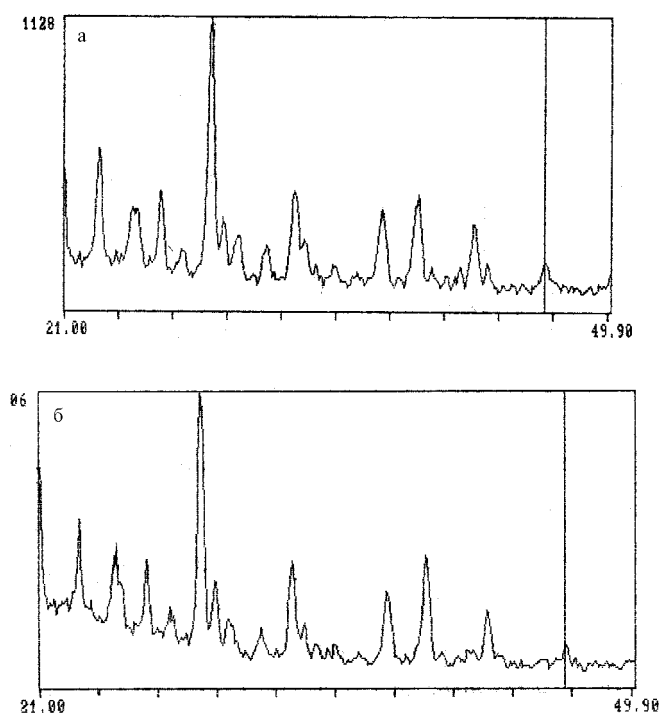


Рис. 4. Дифрактограммы: а) моногидрохлорида гистидина, б) HisHCl·H₂O

ность его структуры по сравнению с тирозином. Согласно экспериментальным данным, присутствие молекул воды в структуре HisHCl не изменяет степень кристалличности его структуры.

Полученные результаты свидетельствуют, что молекулам воды выгодно располагаться в пустотах кристаллической решетки аминокислоты, так как переориентаций молекул в структуре соединения не наступает. Молекулы воды не только размещаются в структурных пустотах, но и определенным образом упорядочиваются, ориентируясь вокруг молекулы аминокислоты. Выявлено, что удаление молекул воды (выдерживание аминокислот, насыщенных водой, до постоянной массы при активности растворителя 0,110) не приводит к изменению структуры аминокислот. Неизменной остается и температура их разложения.

На основании данных рентгеноструктурного анализа и ИК-спектроскопии рассмотрены закономерности поглощения молекул воды аминокислотой на примере моногидрохлорида гистидина. В области активности воды 0,800 – 0,980 адсорбция растворителя создает на поверхности аминокислоты повышенную по сравнению с паром концентрацию молекул воды. Между адсорбируемыми молекулами и паром устанавливается равновесие. С ростом активности растворителя (более 0,980) какая-то часть молекул проникает вглубь кристалла, размещаясь в его пустотах. При этом возможна локализация их вблизи активных центров молекул гистидина. При активности паров воды выше 0,980 возможно образование ассоциатов молекул растворителя. Молекулы воды, располагаясь в полостях структуры гистидина, участвуют в образовании водородных связей с полярными группами аминокислоты. Следует отметить, что в отличие от цистеина и гидрохлорида лизина [6] кристаллическая структура HisHCl позволяет проникать молекулам воды только при их высокой активности, что свидетельствует об ограниченном взаимодействии рассматриваемой аминокислоты с водой.

Согласно полученным экспериментальным данным исследованные аминокислоты по способности поглощать молекулы воды в широком интервале ее активности можно представить следующим образом: Phe = Trp < Tyr < His HCl. Полученный ряд гидратационной способности для этих аминокислот совпадает с распределением их по шкале гидрофобности, предложенной Н. Назаки и С. Танфордом [16].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маленков Г.Г. // Журн. структур. химии.- 1966.-7, №3.- С.331-336.
2. Абросимов В.К., Агафонов Ф.В., Чумакова Р.В. и др. Биологически активные вещества в растворах: структура, термодинамика, реакционная способность.- М.: Наука, 2001. – С.403.
3. Маленков Г.Г. // Состояние и роль воды в биологических объектах. -М.,1967.- С.41-54.
4. Есипова Н.Г., Чиргадзе Ю.Н. // Состояние и роль воды в биологических объектах.- М.:Наука,1967.- С.60-71.
5. *Биохимическая термодинамика*/ Под ред. Л.А. Блюменфельда.- М.: Мир, 1982. – С.192.
6. Котова Д.Л., Виноградова О.А., Калинина Л.М. // Журн. физич. химии.- 2002.-76, №12.- С.2288-2291.
7. *Китайгородский А.И.* Органическая кристаллохимия.- М.: Изд-во, 1955.- 558 с.
8. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. – М.:Мир, 1985.- С.455.
9. *Киргинцев А.Н.* Очерки о термодинамике водно-солевых систем. – Новосибирск: Наука,1976.- С.201.
10. *Казичина Л.А., Куплетская Н.Б.* Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопии в органической химии.- М.: Изд-во МГУ,1979.- С.240.
11. *Наканиси К.* Инфракрасные спектры и строение органических соединений. – М.: Мир, 1965.-216 с.
12. *Уманский Я.С.* Рентгенография металлов и полупроводников. – М.: Металлургия, 1969. – 496 с.
13. *Гурская Г.В.* Структура аминокислот.- М.: Наука,1966.- 159 с.
14. *Грег С., Синг К.* Адсорбция. Удельная поверхность. Пористость.- М.: Мир, 1984.- 306с.
15. *Бирштейн Т.М.* // Состояние и роль воды в биологических объектах. -М.:Наука, 1967. -С.16.
16. *Nozaki Y., Tanford C.* // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol.246, №7. – P.2211.