



Закономерности взаимодействия алифатических аминокислот с водой

Черенкова Ю.А., Котова Д.Л., Крысанова Т.А., Селеменев В.Ф.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Аннотация

Выявлены закономерности процесса поглощения воды с кристаллами алифатических аминокислот. Установлено, что различия в гидратационной способности соединений и характере поглощения воды определяются доступностью структуры аминокислоты для проникновения молекул растворителя, природой бокового радикала и активностью реакционных центров. Установлен количественный ряд гидратации исследуемых аминокислот. Определены изопиестические моляльности растворов β -аланина (β -Ala) и L-аргинина (Arg), а также выявлена линейная зависимость активности воды от концентрации аминокислоты. Дана оценка свободной энергии Гиббса взаимодействия воды с аминокислотами

Введение

Аминокислоты, имеющие в своей структуре разнообразные центры гидратации, к которым следует отнести заряженные и полярные группы, сопряженную π -систему макрокольца для ароматических и гетероциклических аминокислот, представляют собой хорошую модель для изучения межмолекулярных взаимодействий в гомогенных и гетерогенных системах с участием воды. Целый ряд теоретических и экспериментальных данных указывает на то, что имеются значительные различия в характере структурных изменений воды в результате проявления эффектов гидрофильной и гидрофобной гидратации [1-5]. Взаимосвязь количественных характеристик гидратации аминокислот с их строением и растворимостью может быть установлена при исследовании закономерностей взаимодействия воды с твердыми образцами аминокислот, различающихся размером и строением бокового радикала [6-8]. В данной работе представлены результаты изопиестического исследования закономерности взаимодействия воды с твердыми образцами алифатических аминокислот, различающихся длиной и строением бокового радикала.

Эксперимент

В качестве объектов исследования выбраны алифатические аминокислоты фирмы "Reanal" (Венгрия): нейтральные аминокислоты - глицин (Gly), β -аланин (β -Ala), L-валин (Val), DL-лейцин (Leu), L-изолейцин (Ile); гидроксиаминокислота - DL-треонин (Thr); серосодержащая аминокислота - DL-метионин (Met); полуамиды кислых аминокислот - L-аспарагин (Asn) и L-глутамин (Gln); и основная аминокислота - L-аргинин (Arg). Данные по

гидратационным свойствам DL- α -аланина (α -Ala), серина (Ser), цистина (Cys-Cys), цистеина (Cys), L-аспарагиновой (Asp) и L-глутаминовой (Glu) кислот и L-лизина (Lys) взяты из литературы [9,10].

Изучение закономерности взаимодействия воды с твердыми образцами аминокислот проводили методом изопиестирования при температуре $295 \pm 1\text{K}$ в интервале активности паров воды (a_w) 0,110 – 0,990. Аминокислоты приводили в изопиестическое равновесие с насыщенными растворами солей, для которых известна активность молекул воды в паре [11]. Аппаратура, используемая для изопиестических измерений, представляла собой вакуумный эксикатор, снабженный рядом дополнительных устройств, обеспечивающих циркуляцию паров растворителя в эксикаторе, выравнивание температур. Твердые образцы аминокислот помещали в бюксы, эксикатор закрывали массивной крышкой и ставили в термостат до установления равновесия в системе. Время, в течение которого устанавливалось изопиестическое равновесие в системе вода – аминокислота, зависело от активности растворителя и составляло от 2 до 80 суток. Контроль над достижением равновесия и определение количества поглощенной воды осуществляли методом гравиметрии по изменению массы препарата. В качестве критерия достижения равновесия служило установление постоянной массы образца, а в случае образования раствора аминокислоты – сходимости концентраций для серии из пяти параллельных измерений в идентичных условиях проведения эксперимента. Представленные в работе экспериментальные результаты обработаны методами математической статистики при доверительной вероятности 0,95 с привлечением критерия Стьюдента. Воспроизводимость результатов – $S_r = 4,42 \cdot 10^{-3}$.

В качестве контрольного метода применяли ИК-спектроскопию. ИК-спектры снимали для твердых исходных образцов исследуемых аминокислот и аминокислот, содержащих определенное количество молекул воды. Гарантией того, что условие равновесия сохраняется в системе аминокислота – вода в течение подготовки и снятия спектров являлось постоянство массы образца, содержащего определенное количество растворителя в течение одного часа после достижения равновесия в системе вода – аминокислота. ИК-спектры регистрировали на спектрометре “Specord 75-IR” в интервале частот 400-4000 cm^{-1} . Ошибка метода составляла 1-3%. Для расшифровки ИК-спектров использовали литературу [12,13].

Обсуждение результатов

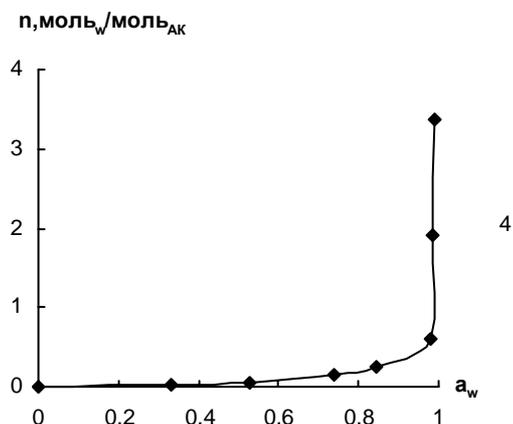
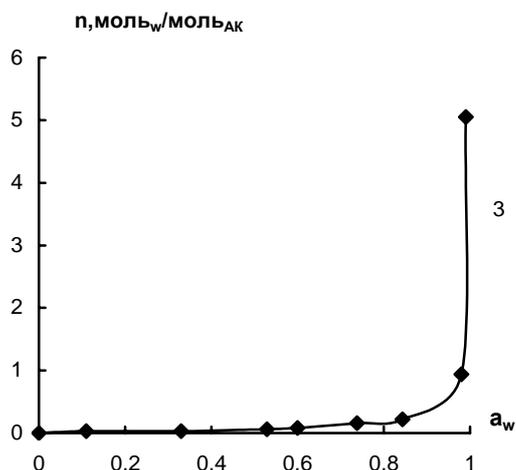
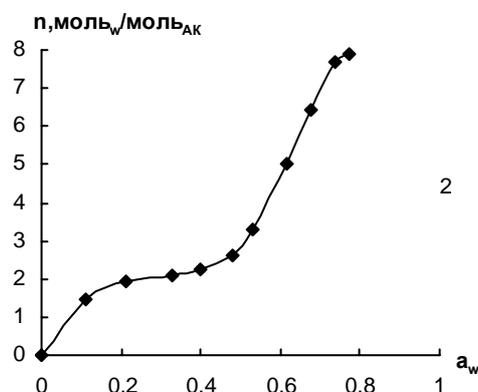
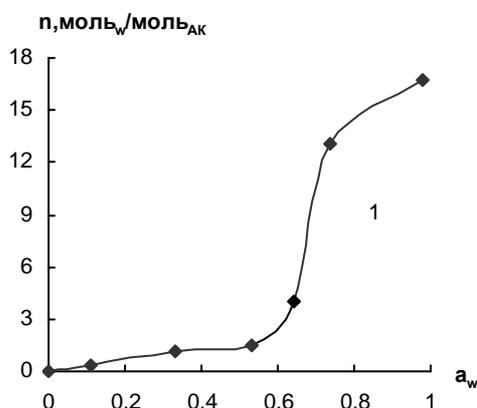
Экспериментально установлено, что изолейцин, метионин, аспарагин и глутамин взаимодействуют с растворителем только при его высокой активности ($a_w > 0,980$). Количество поглощенной воды при $a_w = 0,990$ для Ile, Met, Asn и Gln составляет 0,11, 0,09, 0,23 и 0,37 моль_w/моль_{ак} соответственно. По данным ИК-спектроскопии присутствие незначительного количества растворителя в структуре этих аминокислот приводит к появлению полосы поглощения в области 3590 – 3650 cm^{-1} , характеризующей наличие несвязанной ОН-группы.

Известно, что кристаллическая решетка аминокислот образована биполярными ионами, или цвиттер-ионами, то есть H^+ карбоксильной группы протонирует аминогруппу той же молекулы [14]. Незначительная гидратация Ile, Met, Asp и Gln при высокой активности растворителя свидетельствует об ограниченном взаимодействии молекулярных кристаллов аминокислот с водой. Малая доступность молекул воды к заряженным и полярным группам аминокислот обусловлена насыщением связей COO^- и NH_3^+ за счет внутри- и межмолекулярных образований в их структуре [6]. Наличие на ИК спектрах исследуемых образцов более интенсивных полос поглощения в интервале 3310–3265 cm^{-1} указывает на значительный вклад в структурную организацию межмолекулярных водородных связей.

На рис.1 приведены изотермы для глицина, β -аланина, валина, лейцина, треонина и аргинина, представляющие собой зависимость количества поглощенных молекул воды

молекулой аминокислоты (n_w) от активности растворителя (a_w). Экспериментально установлено, что глицин, β -аланин и аргинин взаимодействуют с водой во всем исследуемом интервале a_w . Для глицина и β -аланина изотермы имеют S-образный вид, наиболее характерный для гидрофильных соединений [15].

В интервале a_w от 0,110 до 0,350 количество молекул воды, поглощенных глицином, незначительно. Изменение a_w от 0,350 до 0,643 приводит к возрастанию степени гидратации и при $a_w = 0,643$ глицин поглощает 4,0 моль_w/моль_{АК}. Присутствие молекул воды в структуре аминокислоты приводит к появлению дополнительных полос поглощения при 3610, 3380 и 2585 см^{-1} , указывающих соответственно на образование водородных связей в структуре соединения: «вода...вода» вблизи углеводородного радикала аминокислоты, $\text{NH}_3^+ \dots \text{H}_2\text{O}$ и $\text{COO}^- \dots \text{H}_2\text{O}$. При $a_w > 0,643$ наблюдается резкий рост гидратационной способности Gly. Количество поглощенных молекул воды при $a_w = 0,980$ составляет 16,7 моль_w/моль_{АК}. Увеличение интенсивности полосы поглощения в области 3440 – 3220 см^{-1} и смещение ее в коротковолновую область спектра по сравнению с образцом глицина, содержащего 4 молекулы воды, свидетельствуют об образовании ассоциатов «вода - вода» с тремя водородными связями в структуре аминокислоты.



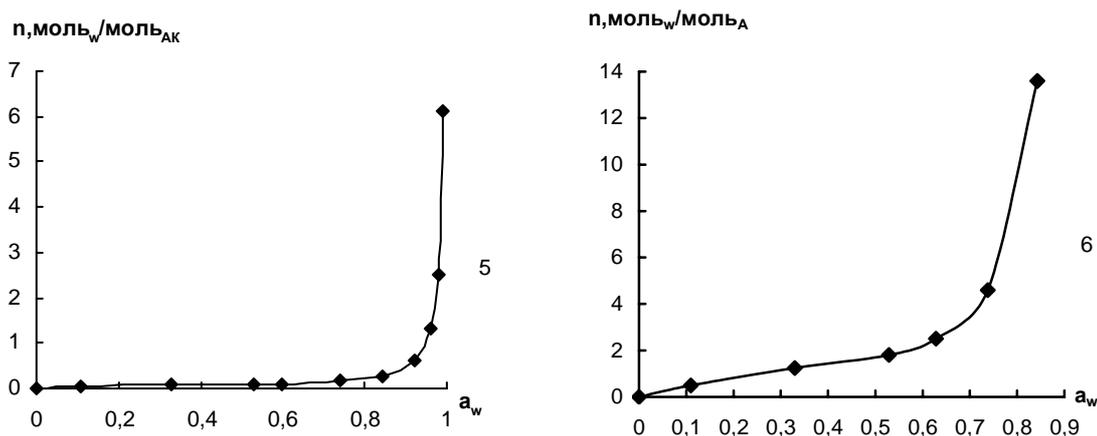


Рис.1. Изотермы поглощения молекул воды аминокислотами при $T = 295$ К:
1 – Gly; 2 – β -Ala; 3 – Val; 4 – Leu; 5 – Thr; 6 – Arg

Установлено, что при $a_w=0,985$ Gly образует насыщенный раствор. Дальнейшее возрастание a_w приводит к растворению глицина. При активности воды, равной 0,990, образуется раствор аминокислоты с концентрацией 2,46 моль/кг.

β -аланин в интервале $a_w = 0,110 - 0,400$ поглощает 2 молекулы воды. Наличие плато на изотерме в области активности воды 0,220 – 0,410 позволяет предположить, что молекулы воды, внедряясь в кристаллическую решетку аминокислоты, образуют с ней стехиометрические комплексы состава β -Ala \cdot 2H₂O [16]. Для дигидрата β -аланина появление полосы поглощения при 3367 см⁻¹ характеризует образование связи NH₃⁺...H₂O. Максимум поглощения при 2570 см⁻¹ относится к колебанию COO⁻ – группы, ассоциированной межмолекулярной водородной связью с H₂O. Наличие полос поглощения при 3590 см⁻¹ указывает на образование связи H₂O... H₂O в структуре аминокислоты. Полоса поглощения при 1649 см⁻¹ относится к деформационным колебаниям OH-группы воды.

Согласно литературным данным [9], поглощение растворителя α -аланином по сравнению β -аланином начинается только в области высокой активности воды ($a_w > 0,940$). Большее сродство β -аланина к молекулам воды по сравнению с α -аланином, вероятно, обусловлено меньшим взаимовлиянием COO⁻ - и NH₃⁺ - групп в структуре β -Ala, так как аминокислотная группа отделена от карбоксильной группы двумя углеродными атомами, что обуславливает ослабление взаимного притяжения зарядов в цвиттер-ионе [17]. В насыщенном растворе β -аланина активность воды равна 0,810. При $a_w > 0,810$ аминокислота, взаимодействуя с растворителем, переходит в растворимое состояние.

Установлено, что для валина, лейцина и треонина изотермы имеют форму, выпуклую по отношению к оси абсцисс, что предполагает слабое взаимодействие в системе вода - аминокислота [15]. Поглощение воды цвиттерлитами начинается в области средней активности растворителя ($a_w=0,643$). Дальнейшее повышение активности воды вызывает рост гидратационной способности исследуемых аминокислот. При $a_w=0,990$ количество поглощенных молекул воды составляет 3,5; 5,2 и 6,5 моль_в/моль_{ак} для лейцина, валина и треонина соответственно. Увеличение длины углеводородного радикала в молекуле Val по сравнению с α -аланином [9] и в структуре лейцина по сравнению с валином ведет к уменьшению количества поглощенных молекул растворителя в 1,5 раза.

Замещение метильной группы в валине на OH-группу в треонине приводит к увеличению количества поглощенных молекул воды треонином в 1,3 раза в области высокой активности воды. Увеличение длины углеводородного радикала треонина на CH₂-группу по сравнению с серином [10] проявляется в значительном снижении его гидратационной

способности в области высокой активности воды. Полоса поглощения при 3240 см^{-1} указывает на участие ОН-группы в образовании связи $\text{OH}\dots\text{H}_2\text{O}$ в структуре Thr. Серин при $a_w > 0,975$, взаимодействуя с водой, переходит в растворимое состояние.

Аргинин, имеющий в боковом радикале дополнительные полярные группы NH_2 и NH , способен к образованию большого числа Н – связей с молекулами воды. Количественно это отражается в резком увеличении числа поглощенных молекул воды аргинином и образовании раствора при $a_w > 0,850$. В структуре аргинина на образование водородных связей $\text{NH}_2\dots\text{H}_2\text{O}$ и $\text{NH}\dots\text{H}_2\text{O}$ указывает наличие максимумов поглощения при 3310 и 3180 см^{-1} на ИК-спектре.

Взаимодействие молекул воды с твердыми образцами аминокислот приводит к появлению на ИК-спектрах дополнительных полос поглощения. В области $3650\text{--}3580\text{ см}^{-1}$ отмечаются полосы поглощения, характеризующие наличие несвязанной ОН-группы воды. Появление максимумов поглощения в диапазоне частот $3550\text{--}3450$ и $3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ указывает на образование связей $\text{H}_2\text{O}\dots\text{H}_2\text{O}$ в димерах и полиассоциатах соответственно. Деформационные колебания ОН-группы воды проявляются в области $1650\text{--}1620\text{ см}^{-1}$. Взаимодействиям $\text{NH}_3^+\dots\text{H}_2\text{O}$ и $\text{COO}^-\dots\text{H}_2\text{O}$ для всех аминокислот отвечают полосы поглощения в интервале частот $3390\text{--}3360$ и $2760\text{--}2530\text{ см}^{-1}$.

Результаты эксперимента и данные, представленные в литературе [9,10], позволили алифатические аминокислоты по их гидратационной способности расположить в следующий ряд:

$\text{Asp} \approx \text{Glu} \approx \text{Met} \approx \text{Ile} < \text{Asn} \approx \text{Cys-Cys} < \text{Gln} < \text{Leu} < \text{Val} < \text{Thr} < \alpha\text{-Ala} < \text{Gly} < \text{Ser} < \text{LysHCl} < \text{CysHCl} < \text{Arg} \approx \beta\text{-Ala}$,

который не совпадает с рядом растворимости:

$\text{Cys-Cys} < \text{CysHCl} < \text{Asp} \approx \text{Glu} < \text{Leu} < \text{Asn} < \text{Met} < \text{Gln} < \text{Ile} < \text{Val} < \text{Thr} \approx \alpha\text{-Ala} < \text{Gly} < \text{LysHCl} < \text{Arg} \approx \beta\text{-Ala}$.

Следует отметить, что лейцин, характеризующийся меньшей величиной растворимости по сравнению с Met, Ile, Asn и Gln, проявляет большее сродство к молекулам воды в области высокой активности растворителя.

Растворение β -аланина и аргинина при взаимодействии с растворителем в области его высокой активности позволило рассмотреть гидратацию аминокислот как процесс, определяющий образование раствора определенной структуры и известного состава. На рис. 2 приведена зависимость активности воды от молярной концентрации аминокислоты. При увеличении молярности раствора от $1,46$ до $5,90$ моль/кг для β -аланина и от $1,20$ до $3,46$ моль/кг для аргинина наблюдается резкое снижение активности растворителя под влиянием растворенных молекул аминокислот.

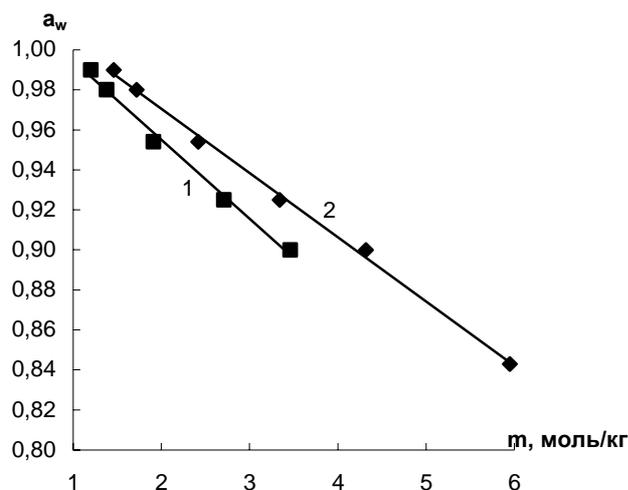


Рис.2. Зависимость активности воды от концентрации аминокислоты:
1 – Arg; 2 – β -Ala

Из данных по изотермам поглощения воды аминокислотами рассчитаны величины изменения энергии Гиббса (ΔG_{hydr}) [9] при взаимодействии аминокислоты с одной молекулой воды (таблица 1).

Таблица 1. Изменение свободной энергии Гиббса в процессе взаимодействия одной молекулы воды с аминокислотой

Аминокислота	$-\Delta G_{\text{hydr}}$, кДж/моль
Gly	10,41
β -Ala	4,31
Val	7,23
Leu	1,13
Thr	3,14
Arg	5,66

Изменение энергии Гиббса в процессе взаимодействия молекул растворителя с образцами аминокислот определяет химическое сродство между молекулой воды и активными центрами.

Таким образом, выявлены закономерности взаимодействия воды с твердыми образцами алифатических аминокислот и определены количественные характеристики гидратации, обусловленные доступностью структуры аминокислоты для проникновения молекул воды, природой бокового радикала и активностью реакционных центров.

Список литературы

1. Абросимов В.К., Агафонов А.В., Чумакова Р.В. и др. Биологически активные вещества в растворах: структура, термодинамика, реакционная способность. М.: Наука, 2001. 403 с.
2. Бирштейн Т.М. Гидрофобные взаимодействия неполярных молекул / Состояние и роль воды в биологических объектах. М., 1967. С.16.
3. Маленков Г.Г. // Журнал структур. химии. 1966. Т.7, №3. С.16.
4. Привалов П.Л. Биофизика. 1968. Вып.1. С. 163-177.
5. Хургин Ю.И., Баранов А.А., Ворбьев М.М. // Изв. АН СССР. Сер.хим. 1995. №11. С.1594-1600.
6. Эрдей-Груз Т. Явления переноса в водных растворах. М., 1982. С. 158.
7. Маленков Г.Г. Структура воды в кристаллогидратах некоторых биологически активных веществ / Состояние и роль воды в биологических объектах. М., 1967. С.41.
8. Есипова Н.Г., Чиргадзе Ю.Н. // Состояние и роль воды в биологических объектах. М., 1967. С.41.
9. Котова Д.Л., Бейлина Д.С., Крысанова Т.А. // Журнал физ. химии. 2004. Т.78, №3. С.458.
10. Котова Д.Л., Виноградова О.А., Калинина Л.М. // Журнал физ. химии. 2002. Т.76, №12. С.2247.
11. Киргинцев А.Н. Очерки о термодинамике водно-солевых систем. Новосибирск: Наука, 1976. 136 с.
12. Наканиси К. Инфракрасная спектроскопия и строение органических соединений. Москва: Мир, 1987. 188 с.
13. Lin Vien, Colthup N.B., Fateley W.G., Grasseli J.G. San Diego: Academic Press, Inc., 1991
14. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. Москва: Мир, 1985. 455 с.
15. Грег С., Синг К. Адсорбция. Удельная поверхность. Пористость. Москва: Мир, 1984. С. 306.
16. Савицкая Е.М., Ныс П.С., Брунс Б.П. // Докл. АН СССР. 1965. Т.164, №2. С. 378.
17. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия: Химические подходы к механизму действия ферментов. Москва: Мир, 1983. 512 с.