

УДК 536.654:547.466

В. Г. Баделин, Г. В. Гиричев*, В. В. Тюнина*, А. В. Краснов*

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ L-СЕРИНА

MASS-SPECTROMETRIC STUDY AND QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS OF L-SERINE

Учреждение Российской Академии наук «Институт химии растворов РАН»
153045 Иваново, ул. Академическая, д. 1

*Ивановский государственный химико-технологический университет
153000 Иваново, пр. Ф. Энгельса, д. 10

Методом масс-спектрометрии исследован процесс сублимации гидроксилсодержащей аминокислоты L-серина. Определен диапазон температур, в котором происходит сублимация препарата без разложения, впервые получено значение энтальпии сублимации. Выполнен расчет энергии межмолекулярной водородной связи в кристалле. Проведен поиск наиболее устойчивых конформеров молекулы с последующей квантово-химической оптимизацией их геометрии.

Ключевые слова: сублимация, энтальпия сублимации, L-серин, энергия водородной связи, конформер, геометрические параметры, квантово-химические расчеты.

The process of sublimation of L-serine hydroxyl amino acid was investigated by mass-spectrometry. The range of temperatures corresponding to vaporization without decomposition was determined. The value of sublimation enthalpy was obtained for the first time. The calculation of intermolecular H-bond energy was carried out. The conformational search was realized. Geometric parameters were defined more by quantum chemical calculations.

Key words: sublimation, enthalpy of sublimation, L-serine, energy of intermolecular H-bond, conformer, geometric parameters, quantum chemical calculations.

В последние годы возрос интерес к изучению структурных и энергетических параметров молекул аминокислот и пептидов и их производных, рассматриваемых в качестве модельных соединений наноразмерных полипептидных цепей и белков [1, 2]. Эти соединения имеют большое значение для осуществления основных биохимических процессов, таких как, например, нейротрансмиссия, ферментативный катализ и синтез биоактивных соединений [3, 4]. Аминокислоты в конденсированной фазе существуют в виде цвиттер-ионов ($\text{H}_3\text{N}^+\text{-CHR-COO}^-$), в то время как в газовой фазе они принимают неионизованную молекулярную форму ($\text{H}_2\text{N-CHR-COOH}$) [4, 5]. Для кристаллического состояния аминокислот характерно наличие водородных связей $\text{N-H}^+\cdots\text{O-C}$, которые стабилизируют цвиттер-ионную форму в кристаллах [4, 6]. Для построения термодинамических циклов и оценки возможности образования интермедиатов в синтезе лекарственных веществ особый интерес представляет изучение сублимации структурных еди-

нищ белков – аминокислот и пептидов, часто осложняемое процессами разложения этих соединений.

Данная работа является продолжением исследований термодинамики сублимации аминокислот и низкомолекулярных пептидов [7, 8]. В настоящее время в литературе отсутствуют надежные сведения о термодинамике парообразования некоторых аминокислот, поскольку в условиях тензиметрических экспериментов они оказались термически неустойчивыми [9, 10], а эксперименты при низких давлениях, требующие наличия специальной и труднодоступной аппаратуры и соответствующих методик, не проводились. Для решения проблемы нами разработан подход, основанный на совместном использовании эффузионного метода Кнудсена с масс-спектрометрическим контролем состава пара [7]. В рамках этого подхода в данной работе исследован процесс сублимации аминокислоты L-серина, имеющей в своем составе неионогенную полярную ОН-группу, проведено определение молекулярных форм исследуемого соединения в насыщенном паре и квантово-химический расчет наиболее устойчивых конформеров.

Экспериментальная часть

Масс-спектрометрия применяется для определения аминокислотной последовательности белков и пептидов, идентификации веществ, изучения метаболических процессов при химическом и ферментативном расщеплении белков, в биотехнологии [4, 11, 12]. В данной работе использован эффузионный метод Кнудсена с масс-спектрометрическим контролем состава пара. Исследования проведены на магнитном масс-спектрометре МИ 1201, модернизированном для термодинамических исследований: регистрируемые токи ионов вплоть до 10^{-18} А, диапазон масс 2 – 1400 а.е.м., энергия ионизирующих электронов 70 эВ.

В работе применялось хроматографически гомогенное соединение фирмы Reanal (Венгрия) L-серин (Ser). Аминокислоту осушали под вакуумом при комнатной температуре непосредственно перед использованием.

Загрузку вещества в эффузионную ячейку осуществляли в сухой камере. Отношение площади открытого препарата к площади эффузионного отверстия составляло 1000. Поэтому можно считать пар внутри эффузионной ячейки равновесным, а возмущение, вносимое эффузионным отверстием, пренебрежимо малым. Исследования проводили в вакууме ($2 - 3 \cdot 10^{-6}$ Па). Для поддержания нужной температуры использовались две вольфрам-рениевые термодпары ВР-5/20.

Молекулы аминокислоты ионизировали, бомбардируя их пучком электронов в вакууме. В процессе нагревания и испарения образца проводили регистрацию масс-спектров, при этом количество расходуемого вещества составляло 10^{-5} г, что особенно ценно при исследовании дорогостоящих биологически активных соединений. Как правило, каждая температурная зависимость ионных токов включала в себя точки, полученные как при повышении, так и при понижении температуры.

Результаты и обсуждение

Масс-спектр электронной ионизации для исследуемой аминокислоты Ser приведен на рис. 1, определен состав образующихся ионов. Основные направления разрыва связей совпадают с указанными в работах [4, 13] и характерными для аминокислот. Установлено, что сублимация Ser в диапазоне температур 443 – 463 К происходит в виде

мономерных молекулярных форм. Разложение аминокислоты с образованием в эффузионной ячейке светло-коричневого остатка наблюдалось, начиная с $T = 470$ К.

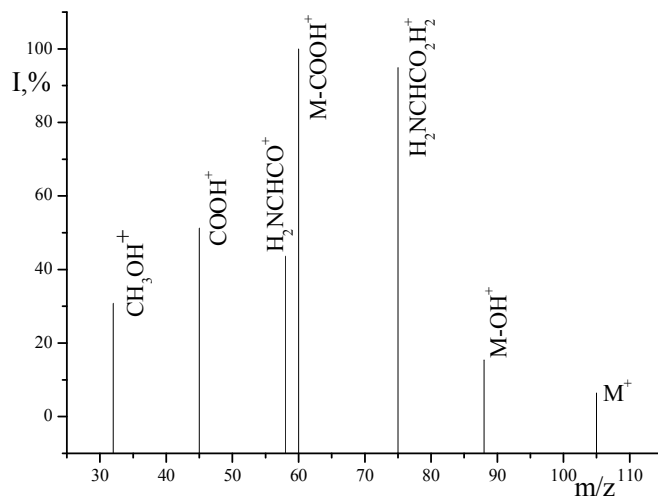


Рис. 1. Масс-спектр Ser при $T = 443$ К

Энтальпия сублимации серина определялась в рамках II закона термодинамики с использованием уравнения изобары [14] в виде:

$$\ln(IT) = -(\Delta H_{\text{sub}}/RT) + C. \quad (1)$$

Экспериментальные данные интенсивностей ионных токов (I) от температуры для Ser описываются линейной зависимостью, построенной в координатах $\ln(IT) = f(1/T)$. По углу наклона находится $\Delta H_{\text{sub}} = -R \cdot \text{tg} \alpha$ (рис. 2).

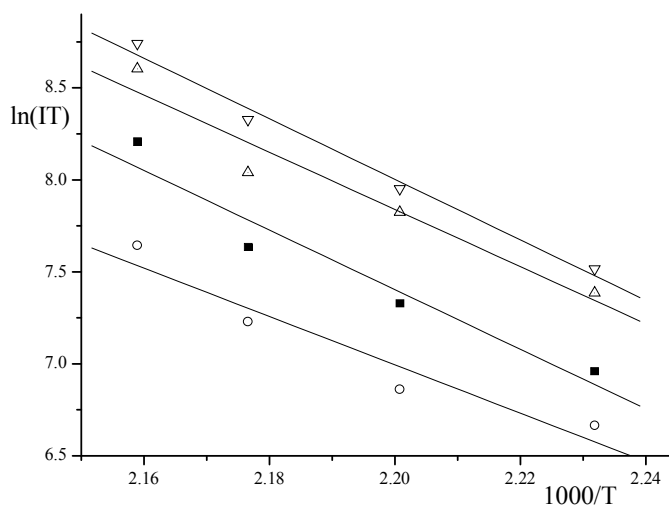


Рис. 2. Температурная зависимость ионных токов в масс-спектре насыщенного пара над Ser

Полученные значения энтальпии сублимации представлены в табл. 1. Для экстраполяции энтальпий сублимации за пределы изученного температурного интервала необходимо вводить поправку на теплоемкость и проводить вычисления по уравнению Кирхгоффа [15, 16]:

$$\Delta H_{\text{sub}}^{298} = \Delta H_{\text{sub}}^T + \int_{298}^T (C_p^{\text{crystal}} - C_p^{\text{gas}}) dT. \quad (2)$$

В работе [17] показано, что расчет стандартной энтальпии сублимации аминокислот может быть успешно проведен по уравнению (3):

$$\Delta_s H(298,15) = \Delta_s H(T) + 60[T - 298,15], \quad (3)$$

где коэффициент 60 аппроксимирует величину разности ΔC_p теплоемкостей кристаллической (C_p^{crystal}) и газовой (C_p^{gas}) фаз для данного класса соединений.

Таблица 1

Энтальпия сублимации L-серина

аминокислота	$\Delta H_{\text{sub}}(\text{exp.}),$ кДж/моль	$T_{\text{exp.}},$ К	$\Delta H_{\text{sub}}^{298},$ кДж/моль
Ser	141 ± 5	453	150 ± 5

Как видно из табл. 1, разность между экспериментальными и стандартными значениями энтальпий сублимации невелика и сопоставима с погрешностью эксперимента. Поэтому можно принимать энтальпию сублимации исследуемой аминокислоты независимой от температуры.

Молекулы аминокислот в кристаллическом состоянии находятся в цвиттер-ионной форме, где между ними существуют электростатические и водородные связи наряду с ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Представляло интерес оценить энергию межмолекулярных водородных связей в кристалле L-серина.

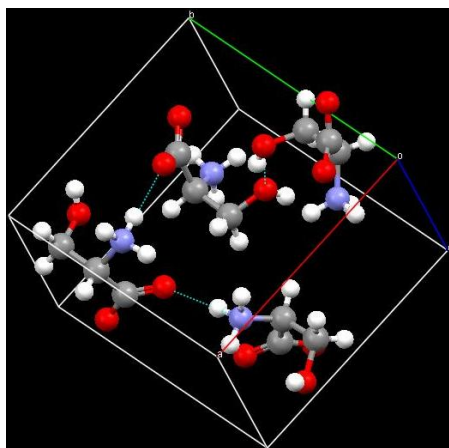


Рис. 3. Структура элементарной ячейки L-серина

Как видно из рис. 3, молекулы Ser внутри ячейки образуют сложные структуры. Таким образом, каждый цвиттер-ион в элементарной ячейке кристалла связан с соседними цвиттер-ионами за счет водородных связей. Расчет энергии водородной связи между молекулами в кристалле проводился по формуле [18]:

$$E^{HB} = D_{HB} \cdot [5(r_{hb}/r_{DA})^{12} - 6(r_{hb}/r_{DA})^{10}] \cdot \cos^4(\theta_{DNA}), \quad (4)$$

где $D_{HB} = 9,5$ ккал/моль – глубина равновесного парного потенциала при образовании водородной связи в димере H_2O ; $r_{hb} = 2,75$ Å; r_{DA} , θ_{DNA} – расстояние и угол между атомом донора и акцептора, соответственно. Расстояние между атомом донора (N) и акцептора (O) и угол θ_{DNA} взяты из Cambridge Structural Database (CSD). Значения энергии водородной связи для исследуемых дипептидов приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Структурные и энергетические параметры водородной связи
в кристаллическом L-серине**

аминокислота	Угол θ_{DNA} , °	Расстояние r_{NA} , Å	Расстояние r_{DA} , Å	Энергия водородной связи E^{HB} , кДж/моль
Ser	167,28	1,962	2,887	- 32,40

Несмотря на существование цвиттер-ионов в кристаллах аминокислот, в насыщенном паре данная форма не реализуется. Таким образом, при сублимации происходит переход из цвиттер-ионной в молекулярную форму. Для исследования различий между строением газообразной молекулы и молекулы в кристалле проведено сравнение рентгенографических (CSD) и теоретически рассчитанных структурных параметров. Структура цвиттер-иона приведена на рис. 4.

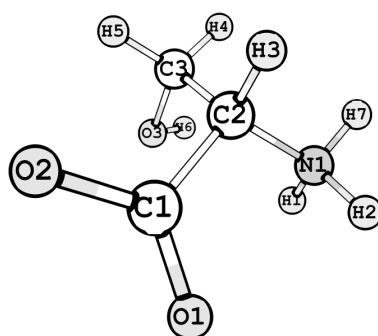


Рис. 4. Структура цвиттер-иона L-серина

Группы атомов в молекулах аминокислот, находящихся в газовой фазе, могут вращаться вокруг связей и образовывать, тем самым, большое число конформеров. С помощью процедуры «Conformational Search» (HyperChem, метод AM1) [19, 20] найдены и проанализированы возможные конформеры, возникающие в результате торсионного движения. При поиске торсионные углы C1-C2-C3-O3 и N1-C2-C1-O1 изменялись в интер-

вале $60 \div 180^\circ$. Из 18 найденных конформеров только три имели наиболее низкую энергию и являлись статистически значимыми. Геометрия данных форм молекулы Ser уточнялась методом B3LYP/6-31G* (GAUSSIAN 03) [21], их основные геометрические параметры представлены в табл. 3, а трехмерные изображения структур – на рис. 5 – 7.

Таблица 3

Геометрические параметры цвиттер-иона и трех основных конформеров L-серина

Параметры: r, Å; ∠, °	CSD	Конформер 1	Конформер 2	Конформер 3
r (C1-C2)	1,527	1,529	1,525	1,526
r (C2-C3)	1,510	1,535	1,548	1,549
r (C1-O1)	1,247	1,352	1,358	1,369
r (C1-O2)	1,239	1,219	1,210	1,207
r (C2-N1)	1,485	1,466	1,463	1,467
r (C3-O3)	1,433	1,417	1,406	1,417
r (O3-H6)	0,881	0,975	0,977	0,973
r (O1-H7)	---	0,977	0,977	0,977
∠ (C1-C2-C3)	112,6	110,2	109,7	111,0
∠ (C1-C2-N1)	110,8	111,3	117,4	108,4
∠ (C2-C3-O3)	110,2	111,7	109,8	112,4
∠ (C3-O3-H6)	106,9	105,3	104,4	107,1
∠ (O1-C1-O2)	125,2	121,8	122,6	121,9
∠ (H1-N1-H2)	102,6	108,6	106,4	106,4
∠ (C1-O1-H7)	---	106,6	105,9	106,3

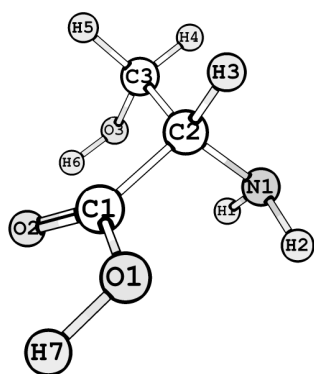


Рис. 5. Структура конформера 1 L-серина

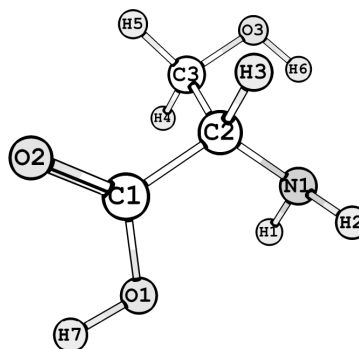


Рис. 6. Структура конформера 2 L-серина

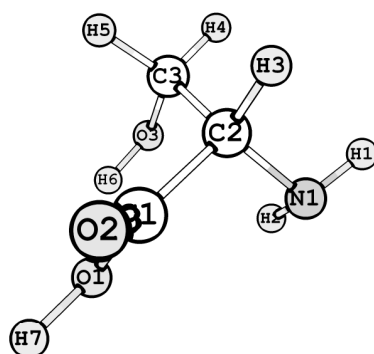


Рис. 7. Структура конформера 3 L-серина

Установлено, что строение наиболее устойчивых конформеров свободной молекулы отличается от конформации цвиттер-иона в кристалле. Следовательно, при переходе из кристаллической фазы в газовую происходит конформационное изменение, что необходимо учитывать при расчете энергии кристаллической решетки молекул аминокислот.

Как видно из табл. 3, структурные параметры конформеров, полученные из квантово-химических расчетов, находятся в удовлетворительном согласии с результатами рентгеноструктурного анализа (CSD). Наибольшее отклонение в вычисленных межатомных расстояниях наблюдается для связей С-О и О-Н, вовлекаемых в образование внутри- и межмолекулярных водородных взаимодействий, и С2-С3, вокруг которой происходит вращение группы -CH₂ОН.

Таким образом, использование эффузионного метода Кнудсена в сочетании с масс-спектрометрическим контролем состава пара позволило впервые получить энтальпию сублимации L-серина. Определен диапазон температур 443 – 463 К, в котором сублимация исследуемой аминокислоты происходит без разложения. Проведен конформационный поиск наиболее устойчивых форм Ser, существующих в газообразном состоянии, и расчет их структурных параметров. Полученные данные подтверждают существование водородных связей в кристалле аминокислоты. Рассчитаны структурные и энергетические характеристики Н-связей в Ser. Довольно большая величина ΔH_{sub} для исследуемой аминокислоты, по сравнению с невысокими значениями энтальпий сублимации молекулярных органических соединений (менее 100 кДж/моль) [17], обусловлена электростатическим взаимодействием цвиттер-ионов друг с другом и наличием водородных связей в кристалле.

Список литературы

1. No K. T., Kwon O. Y., Kim S. Y. et al. // J. Phys. Chem. 1995. Vol. 99. № 34. P. 13019 – 13027.
2. Abramov Y. A., Volkov A., Wu G., Coppens Ph. // J. Phys. Chem. B. 2000. Vol. 104. № 9. P. 2183 – 2188.
3. Kaczor A., Reva I. D., Proniewicz L. M., Fausto R. // J. Phys. Chem. A. 2007. Vol. 111. № 15. P. 2957 – 2965.
4. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М. : Мир, 1985. 456 с.

5. Wu R., McMahon T. B. // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130. P. 3065 – 3078.
6. Kwon O. Y., Kim S. Y., No K. T. et al. // J. Phys. Chem. 1999. Vol. 100. № 44. P. 17670 – 17677.
7. Баделин В. Г., Тюнина Е. Ю., Гиричев Г. В., Гиричева Н. И., Пелинец О. В. // ЖСХ. 2007. Т. 48. № 4. С. 682 – 688.
8. Баделин В. Г., Левочкина Г. Н., Тюнина Е. Ю., Тюнина В. В. // Изв. Вузов. Сер. хим. и хим. технол. 2010. Т. 53. № 1. С. 29 – 31.
9. De Kruijff C. G., Voogd J., Offringa J. C. A. // J. Chem. Thermodyn. 1979. Vol. 11. P. 651 – 656.
10. Sabbah R., Laffitte M. // Bull. Soc. Chim. France. 1978. Part 1. № 1/2. P. 50 – 52.
11. Вульфсон Н. С., Заикин В. Г., Микая А. И. Масс-спектрометрия органических соединений. М. : Химия, 1986. 312 с.
12. Масс-спектрометрия и химическая кинетика / под ред. В. Л. Тальрозе. М. : Наука, 1985. 344 с.
13. Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре. М. : Мир, 1989. 623 с.
14. Пентин Ю. А., Вилков Л. В. Физические методы исследования в химии. М. : Мир, 2006. 683 с.
15. Кемпбел Дж. Современная общая химия. М. : Мир, 1975. Т. 3. 235 с.
16. Бредшнайдер С. Свойства газов и жидкостей. М. ; Л. : Химия, 1966. Гл. V. С. 162 – 165.
17. Chickos J. S., Acree Jr. W. E. // J. Phys. Chem. Ref. Data. 2002. Vol. 31. № 2. P. 537 – 702.
18. Allinger N. L. // J. Am. Chem. Soc. 1977. Vol. 99. № 25. P. 8127 – 8134.
19. Dewar M. J. S., Zoebisch E. G., Healy E. F., Stewart J. J. P. // J. Am. Chem. Soc. 1985. Vol. 107. P. 3902 – 3909.
20. Smellie A., Kahn S. D., Teig S. L. // J. Chem. Inf. and Comp. Science. 1995. Vol. 35. P. 285 – 294.
21. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery J. A., Vreven Jr., T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Knox X. Li, J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Mallick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., Pople J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003. 15.SDD, Gaussian 03, Revision B.03.

Поступила в редакцию 9.06.2010 г.