

УДК 577.323

ПРОЯВЛЕНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ В ГЕТЕРОКОМПЛЕКСАХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ДАННЫМ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**Ю.Н. Близнюк, М.А. Семёнов, Т.В. Больбух, А.В. Шестопалова, В.Я. Малеев***Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085*

e-mail: julia.blyzniuk@yandex.ua

Поступила в редакцию 7 ноября 2011

Принята 1 декабря 2011

Методами ИК и КР спектроскопии исследовали образование гетерокомплексов биологически активных веществ (флавин-мононуклеотида (FMN), бромистого этидия (EB), профлавина (PRF), теofilлина (TPH) и кофеина (CAF)) в нейтральных водных растворах. Анализ ИК и КР спектров показал образование межмолекулярных водородных связей между функциональными атомными группами (C=O и NH₂) в гетерокомплексах FMN-EB, FMN-PRF и TPH-EB. Обнаруженное смещение частот колебаний карбонильных групп в ИК спектрах позволило оценить величину энтальпии Н-связей. Показано, что межмолекулярные водородные связи дополнительно стабилизируют стопочные структуры исследуемых гетерокомплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетероассоциация, водородная связь, инфракрасная спектроскопия, комбинационное рассеяние, биологически активные вещества.

ПРОЯВ МІЖМОЛЕКУЛЯРНИХ ВОДНЕВИХ ЗВ'ЯЗКІВ В ГЕТЕРОКОМПЛЕКСАХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА ДАНИМИ КОЛИВАЛЬНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ**Ю.М. Близнюк, М.О. Семенов, Т.В. Больбух, Г.В. Шестопалова, В.Я. Малеев***Институт радіофізики та електроніки НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, м. Харків, 61085*

Методами ІЧ та КР спектроскопії досліджували утворення гетерокомплексів біологічно активних речовин (флавін-мононуклеотида (FMN), бромистого етидія (EB), профлавіна (PRF), теofilіна (TPH) і кофеїна (CAF)) у нейтральних водних розчинах. Аналіз ІЧ та КР спектрів показав утворення міжмолекулярних водневих зв'язків між функціональними атомними групами (C=O та NH₂) у гетерокомплексах FMN-EB, FMN-PRF і TPH-EB. Виявлене зміщення частот коливань карбонільних груп в ІЧ спектрах дозволило оцінити величину ентальпії Н-зв'язків. Показано, що міжмолекулярні водневі зв'язки додатково стабілізують стопочні структури досліджуваних гетерокомплексів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гетероассоциация, водневий зв'язок, інфрачервона спектроскопія, комбінаційне розсіювання, біологічно активні речовини.

MANIFESTATION OF INTERMOLECULAR HYDROGEN BOND IN HETERO-COMPLEXES OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES PROBED BY THE METHODS OF VIBRATIONAL SPECTROSCOPY**Iu.N. Blyzniuk, M.A. Semenov, T.V. Bolbukh, H.V. Shestopalova, V.Ya. Maleev,***Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,**12 Ak. Proskura str., Kharkiv, 61085*

The investigation of the hetero-association of biologically active substances (flavin mononucleotide (FMN), ethidium bromide (EB), proflavine (PRF), theophylline (TPH) and caffeine (CAF)) was carried in neutral aqueous solutions by IR and Raman spectroscopy. The analysis of IR and Raman spectra showed the formation of intermolecular hydrogen bonds between the functional groups (C=O and NH₂) in FMN-EB, FMN-PRF and TPH-EB heterocomplexes. The observed shift of vibration frequencies of carbonyl groups in the IR spectra allowed us to estimate the values of the enthalpy of H-bonds. It is shown that intermolecular hydrogen bonds additionally stabilize these structures.

KEYWORDS: hetero-association, hydrogen bonding, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, biologically active substances.

Исследование процессов самоассоциации и гетероассоциации ароматических биологически активных веществ (БАВ), проведенное ранее методом двумерной ЯМР спектроскопии, показало, что равновесные константы гетероассоциации по величине

выше или имеют промежуточные значения по сравнению с константами самоассоциации исходных веществ. С другой стороны, в большинстве случаев обнаружено экранирование ароматических протонов обоих соединений, что свидетельствует о стопочной ассоциации ароматических молекул в гетерокомплексах [1].

Увеличение равновесных констант гетероассоциации и вместе с этим абсолютных значений изменения энтальпии связывалось с возможной стабилизацией гетерокомплексов в водном растворе межмолекулярными водородными связями. Однако до настоящего времени нет экспериментального подтверждения существования водородной связи в гетерокомплексах. Такие сведения для растворов исследуемых веществ можно получить с помощью методов колебательной спектроскопии: инфракрасной (ИК) и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света.

Известно, что в ИК-спектре формирование Н-связи между донорами протонов (группы атомов ОН, NH, NH₂, СН) и акцепторами (группы атомов С=О, С-О, С-Н, С=N) сопровождается низкочастотным сдвигом, а также ростом интенсивности и увеличением полуширины полос поглощения валентных колебаний. В то же время полосы поглощения деформационных колебаний (например, NH₂ и ОН- групп атомов) претерпевают высокочастотные сдвиги [2]. Эти признаки являются прямым доказательством образования Н-связи между взаимодействующими молекулами в растворе. К сожалению, из-за сильного поглощения ОН-групп в водных растворах изучение Н-связи типа N-H...O или N-H...N затруднено. В этом случае исследования Н-связи проводятся в растворах тяжелой воды, в которых происходит существенный низкочастотный изотопный сдвиг валентных и деформационных колебаний группы OD, что позволяет провести анализ поведения валентных колебаний акцептора (например, карбонильной группы С=О).

В настоящей работе для выявления Н-связей и их вклада в общую энергию стабилизации гетерокомплексов были получены колебательные спектры функциональных групп атомов (С=О и NH₂) различных БАВ: мутагенов бромистого этидия (ЕВ) и профлавина (PRF), растворимого аналога витамина В₂ – флавиномононуклеотида (FMN), лечебных препаратов – теофиллина (ТРН) и кофеина (САФ) и их смесей в условиях, приближенных к физиологическим. В качестве гетерокомплексов рассматривались комбинации БАВ, которые, согласно литературным данным, могут дополнительно стабилизироваться межмолекулярными Н-связями (FMN-ЕВ/PRF [3]) и не стабилизироваться ими (ТНР-FMN/PRF/ЕВ, САФ-ЕВ [1, 4]). ИК спектры поглощения карбонильных колебаний получены в спектральной области 1600–1750 см⁻¹, а спектры КР растворов исследуемых препаратов записывали в области деформационных колебаний в спектральном диапазоне 1600–1660 см⁻¹.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали лиганды флавиномононуклеотид и бромистый этидий фирмы “Fluka”, лиганды профлавина, кофеин и теофиллин фирмы “Sigma”, структурные формулы которых приведены на рис. 1. Все препараты использовались без дополнительной очистки. Концентрации растворов БАВ определяли с использованием молярных коэффициентов экстинкции: для флавиномононуклеотида $\epsilon_{445}=12500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5], для профлавина $\epsilon_{444}=41000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [6], для бромистого этидия $\epsilon_{480}=5860 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7] и для кофеина $\epsilon_{270}=10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [8]. Концентрацию теофиллина определяли по весу (M=180,16 г/моль).

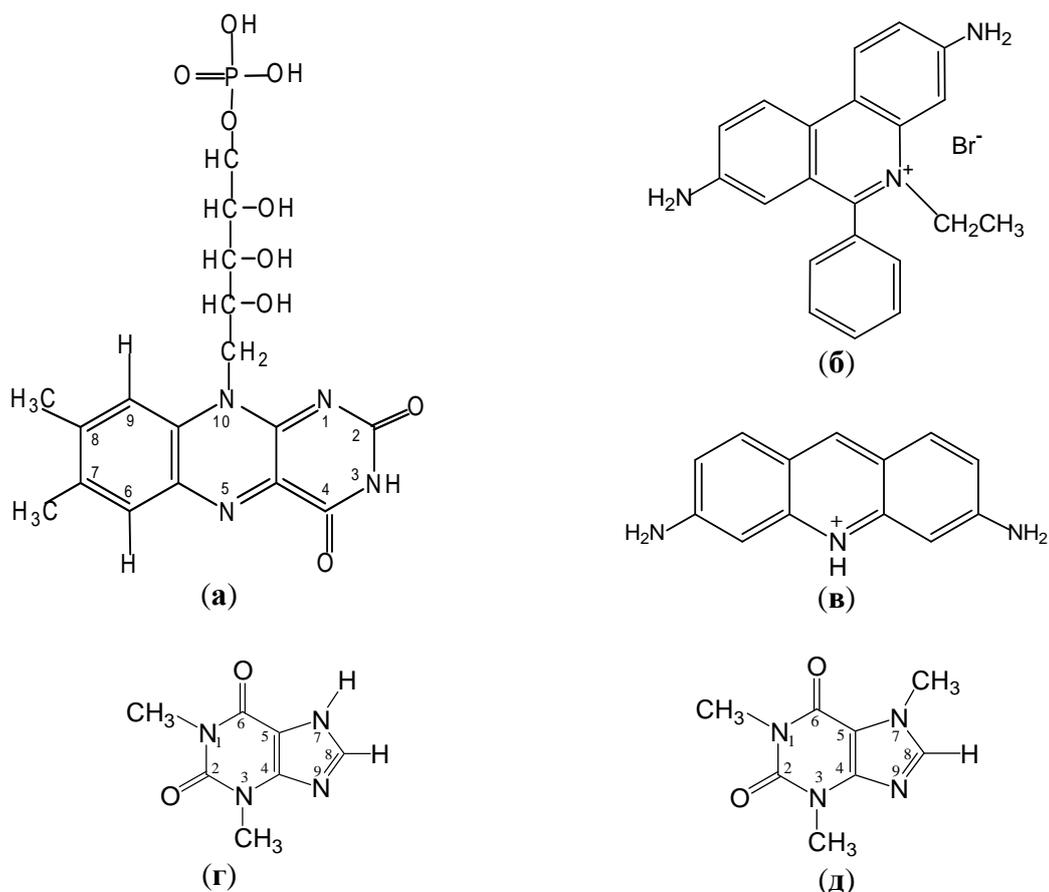


Рис. 1. Структурные формулы молекул флавин-мононуклеотида FMN (а), бромистого этидия EB (б), профлавина PRF (в), теофиллина TPН (г) и кофеина САF (д).

Для ИК-спектроскопии все исследуемые образцы растворяли в D_2O , нейтральное значение рD ($pD=6,9\div 7,1$) достигалось добавлением малого количества NaOD. Значения рD растворов измеряли с помощью иономера И-115 с ошибкой $\pm 0,05$. Концентрация лигандов FMN, EB, CAF и TPН в свободном состоянии и в смесях составляла $C=1,3\cdot 10^{-2}$ М, а в случае PRF из-за плохой растворимости была ниже и составляла $C=7,7\cdot 10^{-3}$ М. Поэтому в смесях FMN-PRF и TPН-PRF с соотношением концентраций 1:1 концентрация каждого из компонентов составляла $C=7,7\cdot 10^{-3}$ М. Образцы находились в герметичной жидкостной кювете. Так как максимум полосы поглощения деформационных колебаний OD-группы проявляется при 1200 см^{-1} , это позволило получить ИК-спектры исследуемых БАВ и их смесей в спектральной области $1600\text{--}1750\text{ см}^{-1}$.

Запись ИК-спектров FMN, PRF, EB, CAF, TPН и их смесей проводилась с помощью автоматического двухлучевого спектрофотометра UR-20 с призмой NaCl. Скорость сканирования составляла $50\text{ см}^{-1}/\text{мин}$. Для предохранения образца от разогрева использовался германиевый фильтр, помещенный в камеру глобара. Для записи спектров поглощения использовались кюветы с флюоритовыми окошками с толщиной рабочего слоя 50 мкм , сделанные по модели, предложенной Фишманом [9]. Значения частоты ν и оптической плотности D получались усреднением результатов двух-трех независимых экспериментов с несколькими измерениями в каждой точке. Достоверность определения частот проверялась по спектру эталонной пленки полистирола. Погрешность определения оптической плотности составляла не более 2%,

а частот — $1\text{--}2\text{ см}^{-1}$. Обработка ИК-спектров проводилась с помощью стандартных компьютерных программ.

Для исследований методом спектроскопии КР все растворы готовились в стандартном фосфатном буферном растворе ($2,5 \times 10^{-2}\text{ М КН}_2\text{РО}_4$, $2,5 \times 10^{-2}\text{ М Na}_2\text{НРО}_4$) при $\text{pH}=6.86$. Концентрация всех исследуемых веществ составляла $C=1,5 \cdot 10^{-5}\text{ М}$. Смеси гетероассоциатов готовили в соотношении 1:1.

Спектры КР молекул FMN, PRF, EB, CAF, TRH и их смесей были записаны в спектральной области $1600\text{--}1660\text{ см}^{-1}$ на спектрометре DILOR Z-16 (Франция) с двойным монохроматором. Градуировка спектрометра осуществлялась по частотам спектра CCl_4 [10]. В работе использовали аргоновый лазер с линией возбуждения $\lambda = 488\text{ нм}$. Мощность лазерного излучения не превышала 20 мВт, что не вызывало фото- и теплоразрушения образцов. Спектральная ширина щели составляла $4,5\text{ см}^{-1}$, скорость сканирования $30\text{ см}^{-1}/\text{мин}$. Точность воспроизведения полос спектров КР была в пределах $\pm 2\text{ см}^{-1}$. Растворы БАВ и их смесей помещали в кварцевые кюветы квадратного сечения толщиной 10 мм и герметизировали. Обработка спектров КР выполнялась с помощью стандартной компьютерной программы. Все спектры записывали при комнатной температуре ($t=20\text{--}22^\circ\text{C}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий подход к анализу стопочной само- и гетероассоциации ароматических БАВ. Наиболее близким аналогом стопочной агрегации ароматических БАВ, рассматриваемой в представленной работе, является вертикальная и горизонтальная укладка пар оснований в нуклеиновых кислотах, изученная в настоящее время достаточно хорошо методами колебательной спектроскопии. В гетероциклах азотистых оснований нуклеиновых кислот при образовании межпарных Н-связей валентные колебания карбонильных групп смещаются в низкочастотную область на $10\text{--}30\text{ см}^{-1}$ [11]. Однако при образовании стопочной структуры оснований в спиральных молекулах нуклеиновых кислот [12] и цепей амидных групп в белковых молекулах [13], между карбонильными группами (они имеют большие значения дипольных моментов $0,3\text{--}0,5\text{ Д}$) возникают динамические взаимодействия дипольных моментов перехода, которые в ИК и КР спектрах смещают карбонильное колебание по частоте в ту или иную сторону. В рамках модели слабосвязанных осцилляторов [14, 15] частота наблюдаемого карбонильного колебания ($\nu_{\text{набл}}$) записывается как:

$$\Delta \nu_{\text{набл}} = \nu_0 - \Delta \nu_{\text{H-св}} \pm \sum_1^n \Delta \nu_{\text{рез}}, \quad (1)$$

где ν_0 — невозмущенная частота C=O -групп атомов (определяется в неполярных жидкостях), $\Delta \nu_{\text{H-св}}$ — смещение за счет образования Н-связи и $\sum_1^n \Delta \nu_{\text{рез}}$ — смещение за счет динамического или резонансного взаимодействия n карбонильных колебаний в стопке.

Очевидно, что для димерной формы ассоциата или гетероассоциата молекул формула (1) упрощается за счет только парного резонансного взаимодействия. Заметим также, что для стопок спиральных молекул величина смещения $\Delta \nu_{\text{рез}}^{\text{ИК}}$ в ИК спектре зависит от $\cos \varphi$, где φ — угол между соседними дипольными моментами перехода карбонильных колебаний. В спектрах КР $\Delta \nu_{\text{рез}}^{\text{КР}}$ не зависит от угла φ , поэтому $\Delta \nu_{\text{рез}}^{\text{КР}}$

всегда больше $\Delta\nu_{\text{рез}}^{\text{ИКС}}$. Следует также отметить, что проведенные исследования ИК спектров нуклеиновых кислот [16, 17] показали, что формирование стопочных структур азотистых оснований сопровождается уменьшением интенсивности внутри- и внекольцевых колебаний C=N и C=O-групп атомов (инфракрасный гипохромизм).

Таким образом, анализ колебательных спектров гетерокомплексов БАВ необходимо проводить с учетом проявлений в ИК спектрах водородных связей и резонансных взаимодействий карбонильных колебаний в стопочных структурах гетероассоциатов.

Гетероассоциация FMN и EB. В работе [3] методом ЯМР спектроскопии показано, что мутаген бромистый этидий в водных растворах при физиологических условиях (pH=7,1 и 0,1 М Na-фосфатный буфер) формирует стопочный гетерокомплекс с флавин-моноклеотидом с равновесной константой $K=640 \text{ M}^{-1}$ и энергией (энтальпией) $\Delta H=33 \text{ кДж/моль}$, что в 2-2,5 раза выше, чем константа самоассоциации для каждого из веществ. Предполагалось, что увеличение стабильности гетерокомплекса связано с образованием межмолекулярной связи $\text{C2=O2} \dots \text{H} - \text{N} - \text{H}$, о чем также свидетельствовали структуры, рассчитанные для смеси исходных веществ с соотношением 1:1 [3].

Для подтверждения существования межмолекулярной H-связи в гетерокомплексе FMN-EB нами были получены ИК спектр нейтрального раствора FMN в области поглощения карбонильных групп атомов (рис. 2, а) и спектры КР буферного раствора EB в области деформационных колебаний NH_2 -групп атомов (рис. 2, б). Согласно

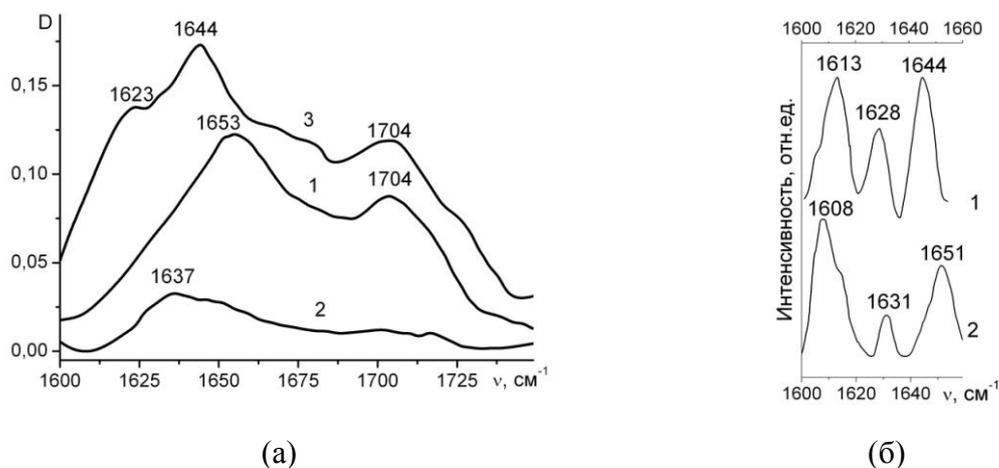


Рис. 2. **а** – ИК спектры поглощения флавин-моноклеотида (1), бромистого этидия (2) и гетерокомплекса FMN-EB (3); **б** – спектры КР бромистого этидия (1) и гетерокомплекса FMN-EB (2).

работам [18-20] высокочастотная полоса поглощения с максимумом при 1704 см^{-1} относится преимущественно к колебаниям карбонильной C4=O4-группы атомов FMN, а более низкочастотная полоса при 1653 см^{-1} связана с колебаниями карбонильной группы C2=O2 (см. рис. 1, а). В спектрах КР полосы при 1628 см^{-1} и 1644 см^{-1} относятся к деформационным колебаниям NH_2 -групп атомов EB (см. рис. 1, б) [21, 22].

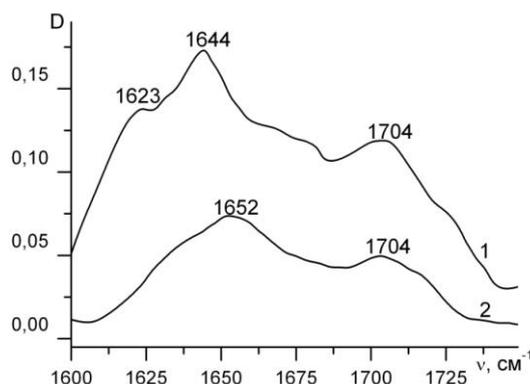


Рис. 3. ИК спектры поглощения гетерокомплекса FMN-EB (1) и суммарный спектр FMN+EB (2).

На рис. 3 приведены ИК спектр поглощения смеси FMN и EB с соотношением компонентов 1:1 и суммарный спектр FMN+EB, полученный суммированием спектров свободных лигандов, записанных при тех же условиях. Видно, что интенсивность спектра комплекса существенно возросла, частота колебания атомов C2=O2 в комплексе претерпела низкочастотный сдвиг на $\Delta\nu = 8 \text{ см}^{-1}$, в то же время полоса поглощения группы C4=O4 с максимумом при 1704 см^{-1} не сдвинулась по сравнению со свободным FMN. В спектре КР (рис. 2, б) полоса EB при 1644 см^{-1} сместилась в высокочастотную область на $\Delta\nu = 7 \text{ см}^{-1}$ при образовании комплекса. Такой характер изменения частот и интенсивностей в ИК и КР спектрах однозначно свидетельствует об образовании межмолекулярной Н-связи типа $\text{C2=O2} \dots \text{H} - \text{N} - \text{H}$ между молекулами FMN и EB в стопке. Этот вывод находится в согласии с предположением об образовании Н-связи в гетерокомплексе FMN-EB, полученным косвенным путем по данным спектроскопии ЯМР [3] на основании анализа энтальпии гетероассоциации [23] и вероятности переноса заряда [24].

Гетероассоциация FMN и PRF. ЯМР исследования комплексообразования флавин-мононуклеотида с другим мутагеном профлавином так же, как и в случае с бромистым этидием, показали, что равновесная константа гетероассоциации и энтальпия ($\Delta H = 41 \text{ кДж/моль}$) значительно выше, чем те же параметры для самоассоциации исходных веществ [3]. Превышение этих термодинамических параметров для гетероассоциатов также может быть связано с образованием межмолекулярной Н-связи между функциональными группами FMN и PRF.

На рис. 4 (а) приведены ИК спектры комплекса и суммарный спектр FMN+PRF. Видно, что интенсивность спектра комплекса значительно увеличивается, максимум полосы поглощения при 1652 см^{-1} (колебание C2=O2-группы FMN) сместился незначительно ($\Delta\nu = 2 \pm 1 \text{ см}^{-1}$), но максимум полосы поглощения C4=O4-группы FMN сдвинулся в комплексе в низкочастотную область на $\Delta\nu = 6 \text{ см}^{-1}$. В то же время в спектрах комбинационного рассеяния (рис. 4, б) полосы с максимумами при 1628 см^{-1} и 1650 см^{-1} , отвечающие за деформационные колебания NH₂-групп профлавина (рис.1, в), в комплексе претерпели высокочастотный сдвиг до 1635 см^{-1} и 1663 см^{-1} , соответственно. Такой характер частотных сдвигов полос и рост интенсивностей карбонильных колебаний в спектре поглощения свидетельствует об установлении межмолекулярных Н-связей типа $\text{C4=O4} \dots \text{H} - \text{N} - \text{H}$ и $\text{C2=O2} \dots \text{H} - \text{N} - \text{H}$ в

комплексе FMN-PRF, что согласуется с результатами, полученными в работах [3, 23, 24].

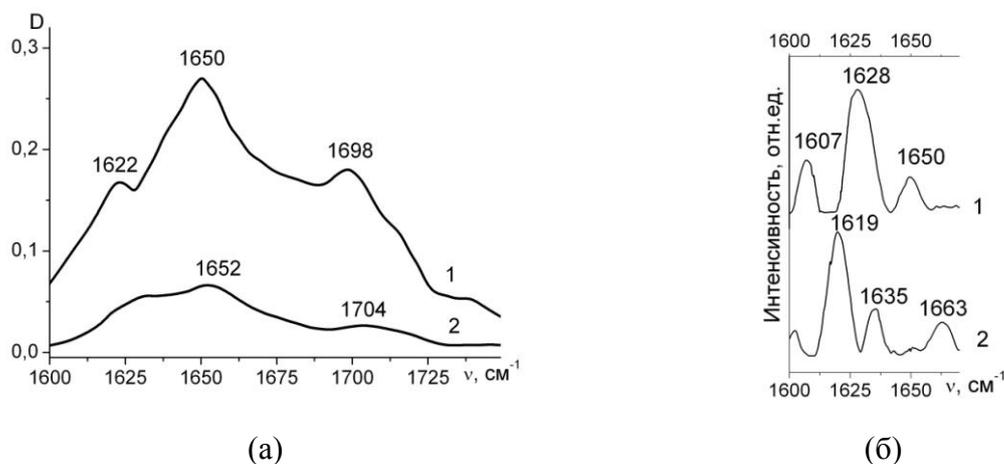


Рис. 4. **а** – ИК спектры поглощения гетерокомплекса FMN-PRF (1) и суммарный спектр FMN+PRF (2); **б** – спектры КР профлавина (1) и гетерокомплекса FMN-PRF (2).

Гетероассоциация FMN и ТРН. Теофиллин относится к ксантиновым производным, и его структура близка к кофеину, для которого надежно выполнены отнесения полос поглощения в ИК спектре на основе экспериментальных и расчетных исследований [25, 26]. Так, высокочастотная полоса поглощения ТРН при 1702 cm^{-1} (рис. 5 (а), спектр 2) связана с колебаниями кольца в фазе с основным вкладом карбонильной группы атомов $\text{C}2=\text{O}2$ (рис. 1, г); низкочастотная полоса поглощения при 1654 cm^{-1} связана с колебаниями кольца в противофазе с преимущественным вкладом колебания $\text{C}6=\text{O}6$ -групп атомов. Как видно из спектров FMN и ТРН (рис. 5, спектр 1 и 2) частоты карбонильных колебаний этих лигандов практически совпадают. Это обстоятельство упрощает анализ ИК спектра комплекса.

На рис 5 (а) приведены ИК спектры поглощения FMN, ТРН и их смеси, записанные в нейтральных D_2O растворах. Справа для сравнения приведен спектр смеси и суммарный спектр FMN и ТРН (рис. 5, б). Видно, что частоты колебаний карбонильной группы $\text{C}6=\text{O}6$ ТРН и $\text{C}2=\text{O}2$ FMN претерпели высокочастотный сдвиг на $\Delta\nu = 4\text{--}5 \text{ cm}^{-1}$, а интенсивность спектра значительно уменьшилась (инфракрасный гипохромизм). Отметим также, что высокочастотные полосы $\text{C}2=\text{O}2$ ТРН и $\text{C}4=\text{O}4$ FMN своего положения практически не изменили.

В отличие от рассмотренных выше комплексов (FMN-EB, FMN-PRF), высокочастотные смещения карбонильных колебаний и инфракрасный гипохромизм в смеси FMN-ТРН свидетельствуют о том, что образовался стопочный гетерокомплекс, в котором возникло динамическое взаимодействие колебательных моментов перехода.

Таким образом, анализ ИК спектров поглощения свидетельствует о том, что ассоциация FMN и ТРН осуществляется по типу π -стэкинга. Отсутствие признаков образования межмолекулярной Н-связи в системе FMN-ТРН согласуется с аналогичным выводом, сделанным ранее по данным ЯМР спектроскопии [4], и объясняет тот факт, что равновесная константа гетероассоциации этих соединений занимает промежуточное положение между равновесными константами самоассоциации FMN и ТРН [4].

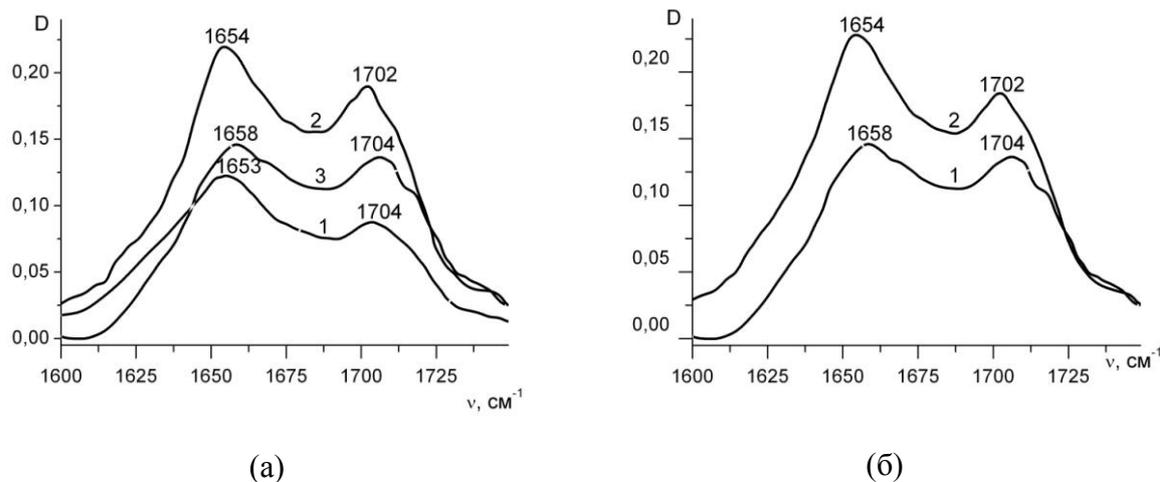


Рис. 5. **а** – ИК спектры поглощения флавин-моноклеотида (1), теофиллина (2) и гетерокомплекса FMN-ТРН (3); **б** – ИК спектры поглощения гетерокомплекса FMN-ТРН (1) и суммарный спектр FMN+ТРН (2).

Гетероассоциация ТРН и ЕВ. Исследования методом ЯМР показали, что в нейтральном растворе в смеси теофиллин и бромистый этидий формируется стопочный гетерокомплекс с равновесной константой 102 M^{-1} , что приблизительно на порядок больше, чем константы самоассоциации исходных веществ [4].

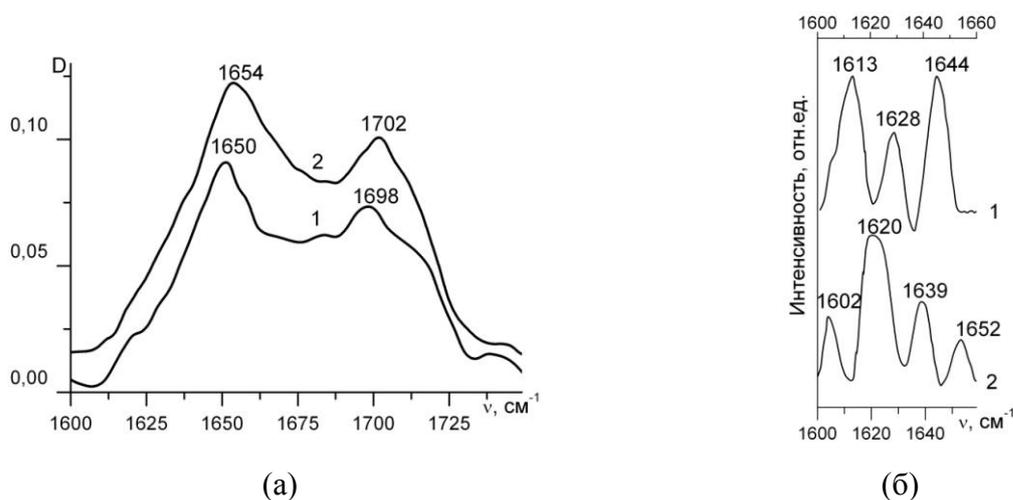


Рис. 6. **а** – ИК спектры поглощения гетерокомплекса ТРН-ЕВ (1) и суммарный спектр ТРН+ЕВ (2); **б** – спектры КР бромистого этидия (1) и гетерокомплекса ТРН-ЕВ (2).

Для выяснения возможности образования межмолекулярной Н-связи в стопочной структуре гетерокомплекса ТРН и ЕВ нами получены ИК и КР спектры в интервале частот функциональных групп ТРН и ЕВ. На рис. 6 (а) приведен спектр поглощения смеси ТРН-ЕВ в нейтральном D_2O растворе и суммарный ИК спектр ТРН+ЕВ. Обращает на себя внимание небольшой низкочастотный сдвиг ($\Delta\nu=4 \text{ cm}^{-1}$) карбонильных атомных групп ТРН $\text{C}2=\text{O}2$ и $\text{C}6=\text{O}6$, что свидетельствует об установлении более слабых Н-связей, чем в комплексах FMN-ЕВ и FMN-PRF. На рис. 6

(б) приведены КР спектры EB и смеси ТРН-EB. Видно, что полосы EB при 1628 см^{-1} и 1644 см^{-1} (деформационные колебания NH_2 -групп атомов) претерпели в смеси высокочастотные сдвиги к 1639 см^{-1} и 1652 см^{-1} , соответственно. Низкочастотные сдвиги карбонильных колебаний ТРН в ИК спектре и высокочастотные сдвиги деформационных колебаний NH_2 -групп EB в спектре КР указывают на формирование Н-связей. Однако это не согласуется с данными работы [4], из которых следует, что расстояние между донорно-акцепторными группами EB и ТРН слишком велико для того, чтобы возникла Н-связь. Вполне вероятно, что это расстояние могла перекрыть цепочка из молекул воды с Н-связями типа $-\text{C}=\text{O}\cdots(\text{H}-\text{O})_n\cdots(\text{H}-\text{N}-\text{H})$. Это предположение требует проведения моделирования структуры гетерокомплекса ТРН-EB с участием молекул воды в явном виде.

Гетероассоциация ТРН-PRF и САФ-EB. По данным спектроскопии ЯМР кофеин, бромистый этидий, теofilлин и профлавин в водных растворах формируют стопочные гетероассоциаты [1, 4]. Величины равновесных констант гетероассоциации принимают промежуточные значения между константами самоассоциации этих веществ, и образования межмолекулярных Н-связей в этих системах ранее обнаружено не было. Вместе с тем указанные молекулы в своих структурах содержат донорные и акцепторные группы, способные образовывать Н-связи.

На рис. 7 и 8 приведены ИК спектры смесей ТРН-PRF и САФ-EB и суммарные спектры поглощения молекул их составляющих. Видно, что частоты полос поглощения карбонильных групп ТРН (рис. 7) и САФ (рис. 8) в смесях практически не изменились по сравнению с суммарными спектрами. Такой же частотный эффект полос деформационных колебаний NH_2 -групп наблюдался в спектрах КР. Поэтому следует исключить существование в этих гетероассоциатах межмолекулярной Н-связи. Этот вывод согласуется с результатами анализа по данным ЯМР [1, 4]. По-видимому, стабилизация гетероассоциатов ТРН-PRF и САФ-EB определяется другими факторами. В частности, это может быть связано с формированием гидратной структуры изучаемых гетероассоциатов.

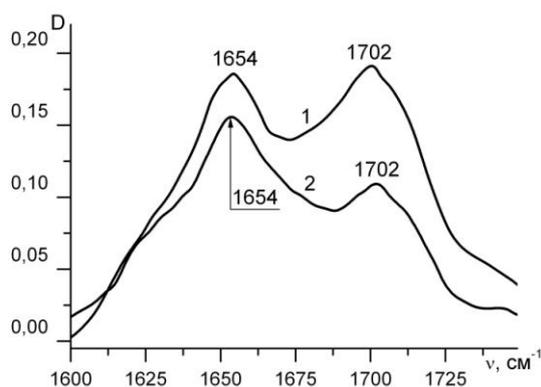


Рис. 7. ИК спектры поглощения гетерокомплекса ТРН-PRF (1) и суммарный спектр ТРН+PRF (2).

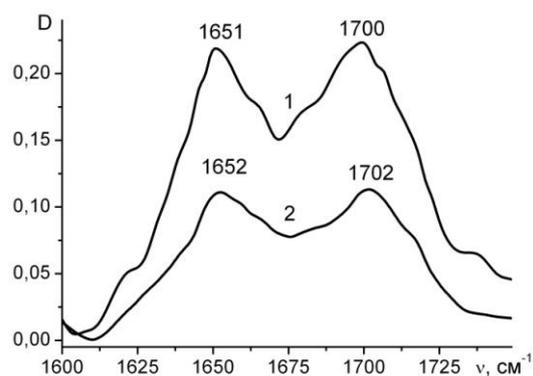


Рис. 8. ИК спектры поглощения гетерокомплекса САФ-EB (1) и суммарный спектр САФ+EB (2).

Оценка энтальпии образования межмолекулярной Н-связи по данным колебательной спектроскопии. Выше на примере двух систем – FMN-EB и FMN-PRF

– было однозначно показано образование межмолекулярной Н-связи в гетерокомплексах по характеристическому смещению частоты колебаний атомов, принадлежащих соответствующим донорно-акцепторным группам. В свою очередь, по величине характеристического смещения частоты можно судить об энтальпии Н-связи. Выполним оценку энтальпии Н-связи для данных двух систем.

Энтальпия образования Н-связи может быть оценена, если известна невозмущенная ν_0 частота карбонильного колебания (см. формулу (1)). Частота ν_0 может быть определена из колебательного спектра исследуемого вещества в растворе неполярной жидкости, поскольку молекулы такой жидкости не возмущают карбонильные колебания. В работе [27] показано, что в растворе хлороформа карбонильное колебание С2=О2-группы рибофлавин тетраацетата имеет невозмущенную частоту $\nu_0=1685 \text{ см}^{-1}$, колебание группы С4=О4 – $\nu_0=1710 \text{ см}^{-1}$. Полагая, что в комплексе FMN-EB резонансное взаимодействие незначительно возмущает карбонильное колебание С2=О2 (в случае азотистых оснований нуклеиновых кислот $\Delta\nu_{\text{рез}} \approx \pm 10 \text{ см}^{-1}$ [12]), формулу (1) можно записать как:

$$\nu_{\text{набл}} = \nu_0 - \Delta\nu_{\text{Н-св}}, \quad (2)$$

где $\Delta\nu_{\text{набл}}^{\text{С=О}} = 1644 \text{ см}^{-1}$, $\nu_0 = 1685 \text{ см}^{-1}$, следовательно, $\Delta\nu_{\text{Н-св}}$ будет равняться $41 \pm 10 \text{ см}^{-1}$. Энтальпию образования Н-связи можно вычислить, используя эмпирическую зависимость от частотного смещения карбонильного колебания [28, 29]

$$\Delta H = C \cdot \Delta\nu_{\text{Н-св}} \text{ (кДж / моль)} \quad (3)$$

где $C = 0,205 \text{ кДж} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$. С помощью этой зависимости мы находим, что энтальпия межмолекулярной Н-связи в гетерокомплексе FMN-EB относительно взаимодействия вода-вода будет $\Delta H = 8,4 \text{ кДж/моль}$, что составляет приблизительно 25 % от общей энтальпии формирования гетероассоциата [3].

Проведя такие же расчеты для гетероассоциата FMN-PRF, получим для Н-связи С4=О4... Н – N – Н энтальпию $\Delta H = 7,3 \text{ кДж/моль}$, а для Н-связи С2=О2... Н – N – Н – $\Delta H = 2,5 \text{ кДж/моль}$.

ВЫВОДЫ

Анализ ИК спектров поглощения в области карбонильных С=О колебаний ($\nu = 1660\text{--}1750 \text{ см}^{-1}$) и спектров КР в области деформационных колебаний NH₂-групп атомов ($\nu = 1600\text{--}1660 \text{ см}^{-1}$) показал, что в нейтральных растворах в стопочных структурах гетероассоциатов FMN-EB, FMN-PRF, ТРН-EB формируются межмолекулярные Н-связи, которые вместе с межплоскостными взаимодействиями дополнительно стабилизируют гетероассоциаты. Этот результат является первым прямым экспериментальным подтверждением образования межмолекулярных Н-связей в гетерокомплексах ароматических БАВ, до сих пор идентифицируемых лишь по косвенным признакам преимущественно из анализа данных ЯМР спектроскопии и молекулярного моделирования. В гетероассоциатах FMN-ТРН, ТРН-PRF и САФ-EB признаки Н-связей нами не были обнаружены, что также подтверждается данными ЯМР спектроскопии и молекулярного моделирования. Оценка энтальпии Н-связи показала, что межмолекулярные Н-связи в гетероассоциатах FMN-EB и FMN-PRF

вносят незначительную часть в общую энергию стабилизации комплексов. Этот вывод согласуется с результатами теоретического расчета вклада различных физических факторов в суммарную энергетику гетероассоциации [30], согласно которому взаимодействие с водной средой и межмолекулярные взаимодействия хромофоров молекул в гетерокомплексах вносят основной вклад в стабилизацию гетерокомплексов, а также с оценкой вклада гидратированной воды в случае нуклеиновых кислот [31].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evstigneev M. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles / Maxim Evstigneev. – Lambert Academic Publishing, 2010. – 96 p. – Contents: p. 1–2. – ISBN: 978-3-8433-5389-2.
2. Chirgadze Ju.N. Infekrasnye spektry i struktura polipeptidov i belkov / Jurij Nikolaevich Chirgadze. – M.: Nauka, 1965, – 135 s. – Bibliogr.: s. 131–133. – UDK 547. 69:66.085.1.
3. Evstigneev M.P. ¹H NMR study of the hetero-association of flavin-monomonucleotide with mutagenic dyes: ethidium bromide and proflavine / M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina, D.B. Davies // *Molecular Phys.* – 2006. – V. 104, N. 4. – P. 647–654.
4. Andrejuk D.D. Structural and thermodynamic analysis of the hetero-association of theophylline with aromatic drug molecules / D.D. Andrejuk, A.A. Hernandez Santiago, V.V. Khomich, [et all.] // *J. Mol. Str.* – 2008. – Vol. 889. – P. 229–236.
5. Flavin mononucleotide fluorescence intensity decay in concentrated aqueous solutions / H. Grajek, I. Gryczynski, P. Bojarski, [et al.] // *Chem. Phys. Letters* – 2007. – Vol. 439. – P. 151–156.
6. Dourlent M. A quantitative analysis of proflavine binding to polyadenylic acid, polyuridylic acid, and transfer RNA / M. Dourlent, C. Helene // *Eur. J. Biochem.* – 1971. – Vol. 23. – P. 86–95.
7. Bresloff J.L. Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interactions / J.L. Bresloff, D.M. Crothers // *Biochemistry* – 1981. – Vol. 20. – P. 3547–3553.
8. Cesaro A. Thermodynamics of caffeine in aqueous denaturant solutions / A. Cesaro, E. Russo, D. Tessarotto // *J. Solut. Chem.* – 1980. – Vol. 9, N. 3. – P. 221–235.
9. Fishman E. A Very High Temperature Infrared Cell for Pure Liquids or Solutions / E. Fishman // *Appl. Opt.* – 1962. – Vol. 1. – P. 493–495.
10. Graselli Dzh. Primenenie spektroskopii KR v himii / Dzh. Graselli, M. Snejvili, B. Balkin; per. s angl. E.A. Pazjuk. – M.: Mir, 1984. – 216 s.: il.– Predm. ukaz.: s. 214–216. –Bibliogr. V konce gl. – UDK 543.424.
11. Kyogoku Y. An infrared study of hydrogen bonding between adenine and uracil derivatives in chloroform solution / Y. Kyogoku, R.C. Lord, A. Rich // *J Am Chem Soc.* – 1967. – Vol. 89, N. 3. – P. 496–504.
12. Semenov M.A. Carbonyl vibration resonance interactions helical polynucleotides Poly(dA)·Poly(dT) and PolyG·PolyC / M.A. Semenov, T.V. Bolbuch // *Studia biophysica* – 1984. – Vol. 102, N. 3. – P. 215–220.
13. Nevskaya N. A. Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of α -helix / N. A. Nevskaya, Yu. N. Chirgadze // *Biopolymers* – 1976. – Vol. 15, N. 4. – P. 637–648.
14. Miyazawa T. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations / T. Miyazawa // *J. Chem. Phys.* – 1960. – Vol. 32. – P. 1647–1652.
15. Jelliot A. Infekrasnye spektry i struktura polimerov / Artur Jelliot. – M.: Mir – 1972. – 159 s. – Predm. ukaz.: s. 157-159. –Bibliogr.: s.151–156. – UDK 543.422.4:677.494.7.
16. Semenov M.A. Gidratirujutsja li azotistye osnovanija pri nizkoj vlazhnosti? / M.A. Semenov, B.I. Suhorukov, V.Ja. Maleev // *Biofizika* – 1981. – T. 26, N. 6. – S. 979–984.
17. Maleev V.Ja. Giperhromizm nukleinovyh kislot v infekrasnoj oblasti / V.Ja. Maleev, M.A. Semenov // *Biofizika* – 1971. – T. 16, N. 3. – S. 389–397.
18. Bowman W.D. Normal mode analysis of lumiflavin and interpretation of resonance Raman spectra of flavoproteins / W.D. Bowman, T.G. Spiro // *Biochemistry* – 1981. – Vol. 20, N. 11. – P. 3313–3318.
19. Lee N.-S. Fourier Transform Raman Spectroscopic Investigation of Silver Ion - Flavin Mononucleotide Complexation / N.-S. Lee // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 1991. – Vol. 12, N. 5 – P. 465–467.
20. Kim M. Observation of a carbonyl feature for riboflavin bound to riboflavin-binding protein in the red-excited raman spectrum / M. Kim, P.R. Carey // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – Vol. 115, N. 15. – P. 7015–7016.
21. Parker F. S. Application of Infrared, Raman and Resonance Raman spectroscopy in biochemistry / Frank S. Parker. – New York: Plenum press – 1983. – 550 p. – General index: p. 517–550. – Contents: p. xi–xiv. – ISBN 0-306-41206-3.
22. Benevides J. M. Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation / J. M. Benevides, G. J. Thomas, Jr. // *Biochemistry* – 2005. – Vol. 44, N. 8. – P. 2993–2999.

23. Relation between structure and enthalpy for stacking interactions of aromatic molecules / A.A. Hernandez Santiago, S. Rosas Castilla, A. Morales Rodriguez, [et al.] // *Molecular Phys.* – 2010. – Vol. 108, N. 15. – P. 1941–1947.
24. Additional stabilization of hetero-complexes of aromatic molecules: H-bonds or charge-transfer / V.V. Kostjukov, A.A. Mosunov, A.A. Ermolaev, [et al.] // *J. Mol. Str.* – 2011. – Vol. 985. – P. 403–406.
25. Falk M. Self-association of caffeine in aqueous solution: an FT-IR study / M. Falk, M. Gil, N. Iza // *Canad. J. Chem.* – 1990. – Vol. 68, N. 8 – P. 1293–1299.
26. Theoretical and pH dependent surface enhanced Raman spectroscopy study on caffeine / I. Pavell, A. Szeghalmi., D. Moigno, [et al.] // *Biopolymers* – 2003. – Vol. 72, N. 1. – P. 25–37.
27. Kyogoku Y. Specific association of riboflavin and adenine derivatives in chloroform solution and the effect of barbiturates on the association / Y. Kyogoku, B.S. Yu // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1969. – Vol. 42, N. 5. – P. 1387–1393.
28. Boriskina E.P. Fizicheskie faktory stabil'nosti trehsiral'nyh struktur kolagenovogo tipa / E.P. Boriskina, T.V. Bol'buh, M.A. Semenov, V.Ja. Maleev // *Biopolimery i kletka* – 2006. – T. 22, N. 6. – С. 458–467.
29. Energies of peptide–peptide and peptide–water hydrogen bonds in collagen: Evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry and differential scanning calorimetry / O.P. Boryskina, T.V. Bolbukh, M.A. Semenov, [et al.] // *J. Mol. Struct.* – 2007. – Vol. 827, N. 1. – P. 1–10.
30. Parsing of the free energy of aromatic-aromatic stacking interactions in solution / V.V. Kostjukov, N.M. Khomytova, A.A. Hernandez Santiago, [et al.] // *J. Chem. Thermodyn.* – 2011. – Vol. 43. – P. 1424–1434.
31. Semenov M.A. Hydration and stability of nucleic acids in the condensed state / M.A. Semenov, E.G. Bereznyak // *Comments Mol. Cel. Biophys.* – 2000. – Vol. 10, N. 1. – P. 1–23.