

УДК 577.32

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
АМИНОКИСЛОТ С КРИОПРОТЕКТОРАМИ. ПРОЛИН И
ОКСИЭТИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГЛИЦЕРИНА****В.Г. Зобнина¹, О.А. Боряк¹, М.В. Косевич¹, В.В. Чаговец¹, В.В. Орлов¹,
В.В. Снегирь², В.А. Покровский², Е.Н. Животова^{3,4}, А.В. Зинченко⁴, А. Гомори⁵**¹ Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,Проспект Ленина 47, Харьков, 61103, Украина, zobnina@ilt.kharkov.ua² Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины,

ул. Генерала Наумова 17, Киев, 03680, Украина

³ Национальный фармацевтический университет,

ул. Пушкинская, 53, Харьков, 61002, Украина

⁴ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,

ул. Переяславская 23, Харьков, 61015, Украина

⁵ Институт биомолекулярной химии Химического исследовательского центра Венгерской академии наук, ул. Пустасери 59/67, II-1025, Будапешт, Венгрия

Поступила в редакцию 20 апреля 2009 г.

Принята 22 мая 2009 г.

В рамках проблемы изучения взаимодействия компонентов биополимеров – аминокислот – с криопротекторными соединениями на уровне межмолекулярных комплексов исследована модельная система – раствор пролина (Pro) в олигомерах оксиэтилированного глицерина ОЭГ-5 (M_n). Использование набора масс-спектрометрических методик с бомбардировкой быстрыми атомами, лазерной десорбцией-ионизацией, электрораспылением из растворов позволило получить взаимодополняющие данные о составе ион-сольватной оболочки аминокислоты пролина в жидком криопротекторном соединении ОЭГ-5. Зарегистрированный в режиме положительных ионов набор протонированных ассоциатов молекулы пролина с серией олигомеров - $\text{Pro} \cdot M_n \cdot \text{H}^+$ - свидетельствует о сольватации данной аминокислоты в растворе ОЭГ-5. Комплексы аминокислоты с олигомерами, катионизированные ионами щелочных металлов, в масс-спектрах не обнаружены даже при достаточно высокой интенсивности ассоциатов $M_n \cdot \text{Na}^+$, $M_n \cdot \text{K}^+$, что свидетельствует о наличии конкуренции между протонированным пролином и ионами Na^+ и K^+ за связывание с олигомерами ОЭГ-5. В масс-спектрах с электрораспылением интенсивность пика депротонированного пролина $[\text{Pro}-\text{H}]^-$ в режиме отрицательных ионов значительно превышает таковую для протонированной формы $[\text{Pro}+\text{H}]^+$ в режиме положительных ионов, что указывает на преобладание в растворе диссоциированной формы аминокислоты. Предложена модель, объясняющая стабилизацию комплексов $\text{Pro} \cdot M_n \cdot \text{H}^+$ навиванием олигомеров вокруг протонированной молекулы пролина с образованием олигомерами квазициклической структуры, подобной краун-эфирам, в которой эфирные кислороды обращены к органическому катиону. Сравнение с литературными данными относительно взаимодействия полиэфиров с ионами щелочных металлов позволило объяснить молекулярный механизм наблюдающейся конкуренции между органическим и неорганическими катионами за связывание с олигомерами ОЭГ-5. Обсуждается возможность существования тройных ассоциатов депротонированного пролина с катионными комплексами $M_n \cdot \text{Na}^+$, $M_n \cdot \text{K}^+$, суммарный нейтральный заряд которых не позволяет регистрировать их в масс-спектрах. Перспективы дальнейших исследований состоят в теоретическом моделировании обнаруженных комплексов, включающих пролин, ионы щелочных металлов, ОЭГ-5 в разных зарядовых состояниях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аминокислоты, пролин, криопротекторы, оксиэтилированные производные глицерина, ионы щелочных металлов, сольватация, масс-спектрометрия

Разработка и практическое применение новых синтетических криопротекторов требует детальной информации о физико-химических процессах с их участием, происходящих в биологических системах на молекулярном уровне. Весьма важным является вопрос о взаимодействии криопротекторов с биополимерами, призванном обеспечивать сохранение их ионно-сольватной оболочки при замещении естественной

водной среды на криопротекторную. Поскольку мономерные компоненты белков и пептидов – аминокислоты – значительно различаются по полярности, гидрофильности или гидрофобности, ионному состоянию, представляет интерес определить особенности взаимодействия с криопротекторами для ряда аминокислот, относящихся к различным группам. Исследование индивидуальных аминокислот представляет и самостоятельный интерес в связи с их заметным содержанием в биологических жидкостях.

В данной работе в качестве объекта исследований нами была выбрана система, состоящая из аминокислоты пролина и криопротектора на основе оксиэтилированных производных глицерина ОЭГ-5 (Схема 1).

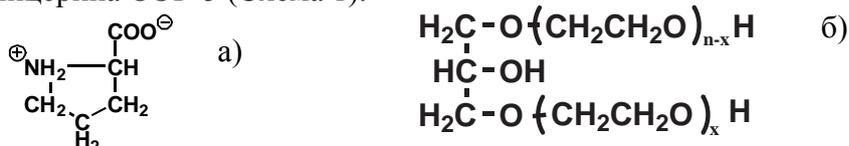


Схема 1. Объекты исследования: аминокислота пролин (а) и ОЭГ-н (б).

Серия новых криопротекторных соединений – оксиэтилированных производных глицерина ОЭГ-п (с разной степенью полимеризации п) была синтезирована в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина) [1]. Действие данных криопротекторов изучалось на клеточном уровне [2-4], однако исследование их взаимодействия с биомолекулами не проводилось. Для начального этапа исследований мы выбрали производные ОЭГ-5 с наименьшей средней степенью полимеризации n=5.

Выбор аминокислоты пролина был обусловлен рядом факторов. Данная аминокислота является протеиногенной и содержится в организме, как в свободном виде, так и в составе белков [5-7]. Специфические конформационные свойства пролина вызывают изгибы полипептидной цепи, что определяет особенности структуры коллагена [5-8]. Несмотря на то, что пролин по типу остатка относится к гидрофобным аминокислотам, высокая растворимость в полярных растворителях привлекает внимание исследователей к его роли в увеличении гидрофильности белковых молекул [9-11]. В ряду аминокислот пролин отличается наибольшей растворимостью в спиртах [12].

Известно, что пролин проявляет себя в качестве естественного криопротектора: так, в зимний период концентрация пролина в белках цитоплазмы меристем растительных почек повышается в 3-5 раз [13]. Пролин используется как элемент среды, связывающий воду, в предварительном культивировании клеточных культур для длительного хранения при пониженных температурах [14]. Данная аминокислота в составе косметических средств указывается среди компонентов, поддерживающих гидратацию кожи. Кроме того, исследование пролина представляет прикладной интерес в связи с началом его использования в нанотехнологиях, в частности, форме фуллеренового производного пролина (C60 based 3,4-fullero-proline) [15], в фармакологии и медицинской химии при разработке новых лекарственных средств на основе белков и пептидов [16].

Одним из эффективных методов исследования межмолекулярных взаимодействий биомолекул и молекулярных механизмов действия криопротекторов является мягкоионизационная масс-спектрометрия [17]. Ее возможности в изучении систем биомолекула-криопротектор были продемонстрированы нами ранее на примере растворов азотистых оснований в глицерине [18], аминокислоты валина в этиленгликоле [19], пролина в этаноле [20]. В данной работе использовались три масс-спектрометрические методики, с различными видами физического воздействия на изучаемый объект: метод с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), метод лазерной

десорбции/ионизации (ЛДИ) и метод ионизации электрораспылением растворов - электроспрей (ЭСИ).

Целью настоящей работы явилось исследование модельной системы «аминокислота пролин - криопротектор ОЭГ-5» с использованием набора масс-спектрометрических методов ББА, ЛДИ и ЭСИ для получения информации об особенностях межмолекулярных взаимодействий в системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали оксиэтилированные производные глицерина ОЭГ-5, (где $n=5$ - средняя степень полимеризации), синтезированные в ИПКиК НАН Украины (Харьков, Украина) [1], аминокислоту пролин производства Sigma, краун-эфир (18-crown-6), производство Serva (Германия, Гейдельберг).

В ЭСИ экспериментах использовали растворитель – метанол производства Sigma-Aldrich (Будапешт, Венгрия).

Масс-спектрометрические измерения проводили на трёх типах экспериментальных установок. Масс-спектры с ББА в режиме положительных и отрицательных ионов регистрировали с помощью секторного магнитного масс-спектрометра МИ-1201Э (НПО «SELMI», Сумы, Украина). В качестве бомбардирующего газа использовали аргон; энергия первичного пучка составляла 4,0 кэВ.

ЛДИ эксперименты проводили на масс-спектрометре Autoflex II (Bruker Daltonics GmbH, Germany) с азотным лазером ($\lambda = 337$ нм). Ионизацию/десорбцию образцов осуществляли лазерными импульсами длительностью 3 нс с частотой 20 Гц. Мощность лазера варьировали от 85% до 100% полной мощности. Энергия лазерного импульса при 100% мощности, определенная с помощью измерительного устройства PEM 100 LTB Lasertechnik Berlin (Германия), составляла 64 мкДж. Ускоряющее напряжение составляло 20 кВ. Время задержки экстракции ионов - 110 нс. Спектры регистрировались при суммировании 100 лазерных выстрелов. Каплю образца объемом 1-2 мкл наносили на стальную металлическую подложку, входящую в комплект Autoflex II.

Масс-спектрометр API 2000 Triple Quadrupole MS (Applied Biosystems, Канада) использовался для получения масс-спектров ЭСИ. Для обработки результатов было использовано программное обеспечение Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems Corporation and MDS Inc.).

Олигомеры ОЭГ-5 представляют собой вязкую жидкость с низким давлением насыщенных паров, в связи с чем их можно изучать в условиях вакуума в жидком состоянии при комнатной температуре (методики ББА и ЛДИ). Для приготовления образцов растворов ОЭГ-5 с заданной концентрацией, смешивали равные объемы водных растворов анализируемых веществ и ОЭГ-5; водную компоненту удаляли на стадии вакуумирования образца в шлюзовой камере прямого ввода масс-спектрометра. Для исследований методом ЭСИ растворы пролина в ОЭГ-5 разбавляли легколетучим растворителем – метанолом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масс-спектры оксиэтилированных производных глицерина ОЭГ-5

Масс-спектры ОЭГ-5 (олигомеры которого обозначаются далее как M_n) были получены нами ранее с использованием набора методик ББА, ЛДИ, МАЛДИ, ВИМС

[21]. В данной работе впервые получены масс-спектры ОЭГ-5 в режиме ЭСИ (Рис. 1в). Для сравнения на Рис. 1а,б приведены масс-спектры в режимах ББА и ЛДИ. Из Рис.1 следует, что характер масс-спектров, полученных в разных режимах, различается, что определяется особенностями ионообразования в использованных методах.

Масс-спектры с ББА жидкого образца ОЭГ-5 (Рис. 1,а) содержали серию интенсивных пиков протонированных молекул $M_n \cdot H^+$ с $n = 3-11$ с характерным для синтетических полимеров колоколообразным распределением интенсивностей олигомеров M_n и с максимумом, приходящимся на $n = 5$, m/z 313. Также присутствовала серия менее интенсивных пиков комплексов ОЭГ-5 с катионом K^+ , $M_n \cdot K^+$, $n = 3-10$, с максимумом на $n = 6$, m/z 395. Основным механизмом образования ионов в режиме ББА является протонирование.

В ЛДИ полимеров известным механизмом образования ионов является катионизация путем связывания с ионами щелочных металлов (ИЩМ) [22]. В масс-спектре ЛДИ (Рис. 1б) основная серия представлена олигомерами, катионизированными ионами K^+ , $M_n \cdot K^+$ с $n = 2-11$ и с максимумом распределения, приходящимся на $n = 5$; присутствует также примерно в пять раз менее интенсивная серия $M_n \cdot Na^+$, $n = 3-9$; однако, серия $M_n \cdot H^+$ полностью отсутствует. Можно отметить, что источником ионов K^+ , достаточ-

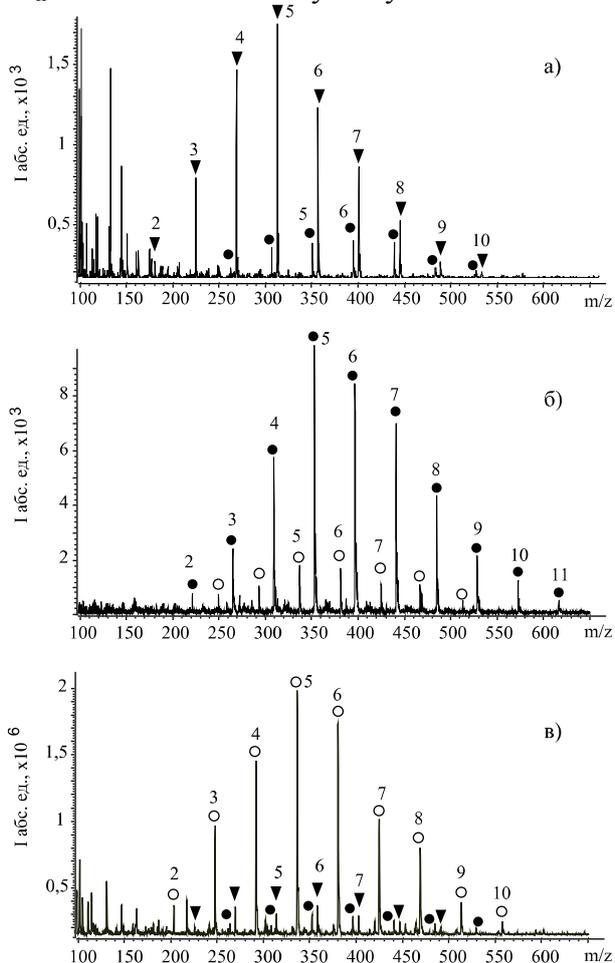


Рис.1. Масс-спектры положительных ионов ОЭГ-5, полученные в различных режимах ионизации: а) ББА, б) ЛДИ, в) ЭСИ. Обозначения: \blacktriangledown - $M_n \cdot H^+$, \circ - $M_n \cdot Na^+$, \bullet - $M_n \cdot K^+$, где M_n – молекулы олигомеров со степенью полимеризации n , указанной цифрами над соответствующими пиками.

ным для регистрации доминирующей серии $M_n \cdot K^+$, являются следовые количества соединений калия, использованных при синтезе ОЭГ-5 [1].

В режиме ЭСИ масс-спектры были получены для образца ОЭГ-5, растворённого в метаноле (Рис. 1в). Масс-спектры содержат серию интенсивных пиков комплексов ОЭГ-5 с катионом Na^+ , $M_n \cdot Na^+$, $n=1-14$, с максимумом распределения на $n=5$, $m/z=335$. В спектрах также присутствуют примерно в восемь раз менее интенсивная серия олигомеров, катионизированных K^+ , $M_n \cdot K^+$, $n=1-11$, максимум на $n=6$, и сравнимая с ней по интенсивности серия протонированных олигомеров $M_n \cdot H^+$, с $n=1-11$, максимум на $n=6$. Дополнительным источником ионов Na^+ , обеспечивающим высокую интенсивность серии $M_n \cdot Na^+$, предположительно, может служить метанол.

Независимо от механизма ионизации, все три методики дают распределение доминирующих серий, согласующееся с хроматографическими параметрами молекулярно-массового распределения данных полимеров, определенными при синтезе ОЭГ-5 [1]. Следовательно, все три использованные масс-спектрометрические методики пригодны для адекватного описания ОЭГ-5.

Масс-спектры системы «пролин - ОЭГ-5»

Система «пролин - ОЭГ-5» была исследована набором методов с БА, ЛДИ, ЭСИ (Рис. 2).

В БА масс-спектре бинарной системы (Рис. 2а) распределение пиков, соответствующих ОЭГ-5, практически не отличается от такового в спектре чистого ОЭГ-5 (Рис. 1а). В спектре присутствует сигнал протонированного мономера пролина $\text{Pro}\cdot\text{H}^+$, m/z 116; кластеры пролина с ИЦМ отсутствуют. Примечательным является факт регистрации протонированных ассоциатов пролина с олигомерами ОЭГ-5- $\text{Pro}\cdot\text{M}_n\cdot\text{H}^+$ ($n=3-10$, максимум на $n=5$), что свидетельствует о сольватации аминокислоты данным криопротектором. Однако катионизированная серия ассоциатов пролина с ОЭГ-5 отсутствует. В серии $\text{Pro}\cdot\text{M}_n\cdot\text{H}^+$, показанной в увеличенном масштабе на Рис. 3, интенсивности всех пиков близки, т.е. их колоколообразная огибающая имеет

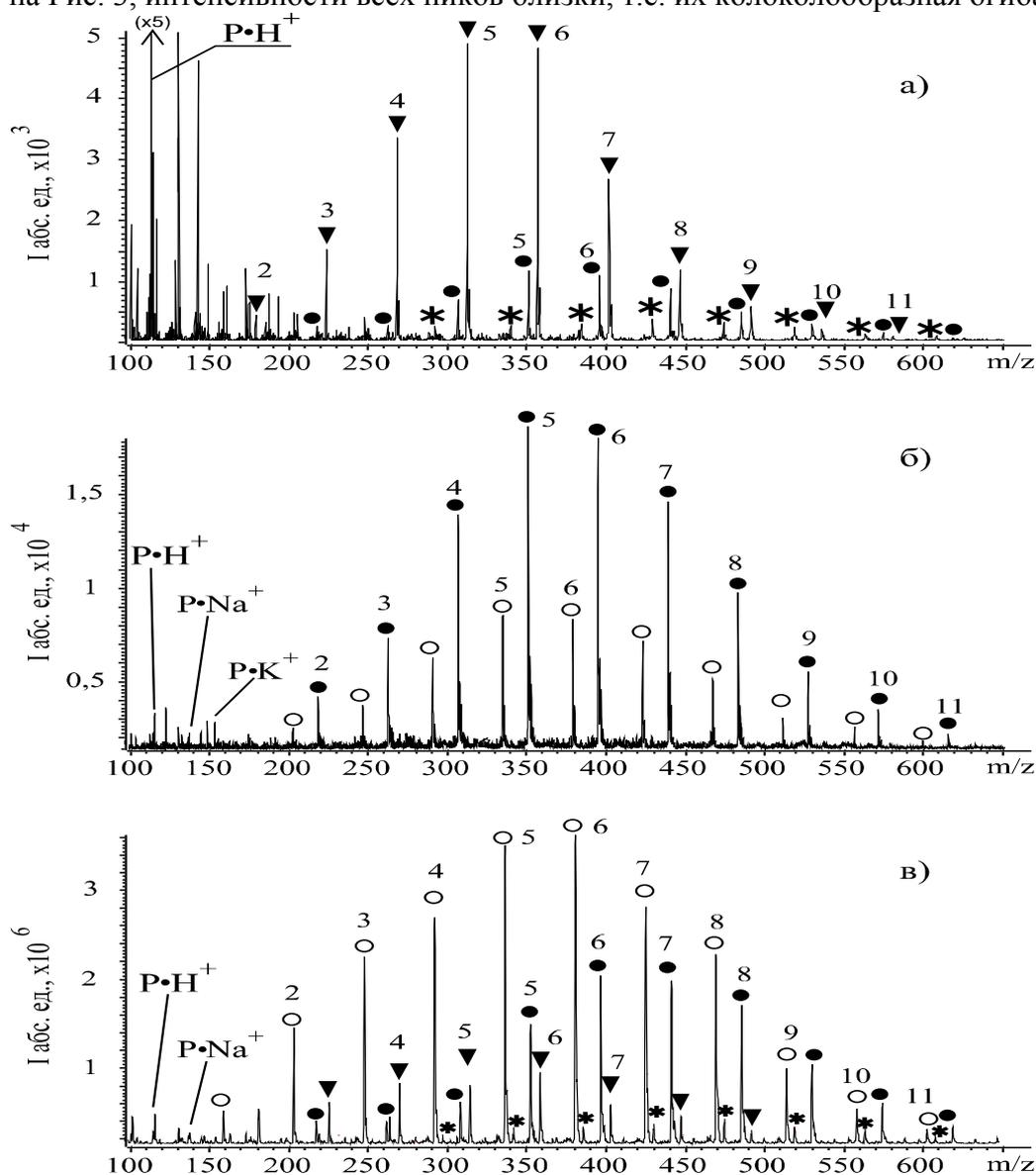


Рис.2. Масс-спектры положительных ионов системы (пролин - ОЭГ-5), полученные в различных режимах ионизации: а) БА, б) ЛДИ, в) ЭСИ. Обозначения: ▼ - $\text{M}_n\cdot\text{H}^+$, ○ - $\text{M}_n\cdot\text{Na}^+$, ● - $\text{M}_n\cdot\text{K}^+$, * - $\text{P}\cdot\text{M}_n\cdot\text{H}^+$, где P – пролин, M_n – олигомеры ОЭГ-5, цифрами указана степень полимеризации n.

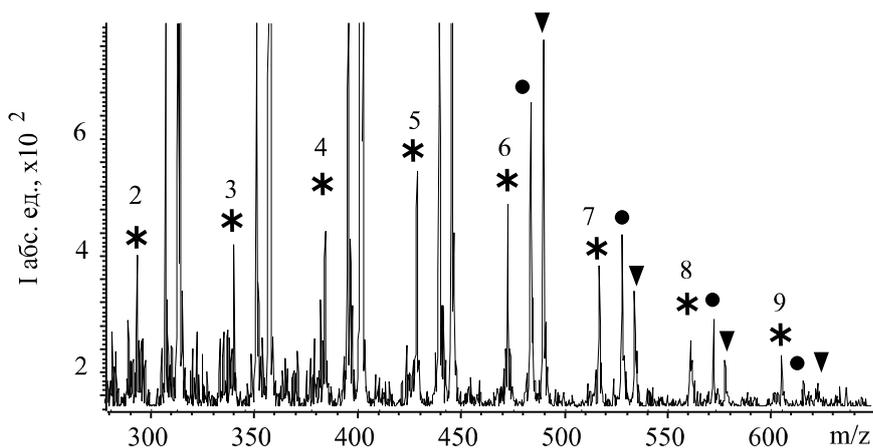


Рис.3. Увеличенный участок ББА масс-спектра системы (пролин - ОЭГ-5), содержащий серию кластеров пролина с олигомерами ОЭГ-5 * - $\text{Pro}\cdot\text{M}_n\cdot\text{H}^+$.

более пологий характер, чем огибающая серии индивидуальных олигомеров $\text{M}_n\cdot\text{H}^+$. Данный факт свидетельствует о некоторой зависимости эффективности связывания пролина с полимером от числа мономерных звеньев n , требующей дальнейшего изучения с привлечением теоретического моделирования соответствующих комплексов.

В ЛДИ масс-спектре системы (Рис. 2б) зарегистрированы серии, соответствующие комплексам ОЭГ-5 с ИЦМ: более интенсивная с K^+ - $\text{M}_n\cdot\text{K}^+$, $n=1-12$, максимум на $n=6$, и менее интенсивная с Na^+ - $\text{M}_n\cdot\text{Na}^+$, $n=1-12$, максимум на $n=5$. Относительная интенсивность серии $\text{M}_n\cdot\text{Na}^+$ примерно в два раза выше таковой в спектрах чистого ОЭГ-5, что может быть связано с высокой чувствительностью ЛДИ даже к следовым количествам ИЦМ, источником которых в данном случае может быть образец пролина. Протонированная форма олигомеров, как и следовало ожидать, отсутствует, однако, при этом присутствуют протонированный мономер пролина: $\text{Pro}\cdot\text{H}^+$, m/z 116, а также сопоставимые с ним по интенсивности пики пролина, катионизированного ионами K^+ и Na^+ : $\text{Pro}\cdot\text{K}^+$, $m/z=154$, $\text{Pro}\cdot\text{Na}^+$, $m/z=138$. Комплексы пролина с ОЭГ-5 не наблюдаются ни в катионизированной, ни в протонированной форме.

В масс-спектрах ЭСИ (Рис. 2в) бинарной системы, в сравнении со спектрами чистого ОЭГ-5 (Рис. 1в), наблюдается перераспределение интенсивностей в сериях протонированных и катионизированных олигомеров: так, если отношение суммарной интенсивности пиков в сериях $\text{M}_n\cdot\text{Na}^+$ к $\text{M}_n\cdot\text{K}^+$ к $\text{M}_n\cdot\text{H}^+$ в спектре для чистого ОЭГ-5 было 8:1:1, то в спектре для раствора пролина в ОЭГ-5 это соотношение составляет 8:4:2. Максимум в серии $\text{M}_n\cdot\text{Na}^+$ приходится на $n=6$, в $\text{M}_n\cdot\text{K}^+$ - на $n=6-7$, в $\text{M}_n\cdot\text{H}^+$ - на $n=6$, т.е. наблюдается смещение максимума на одно звено в область больших масс. Пролин в спектре представлен протонированной $\text{Pro}\cdot\text{H}^+$ и катионизированной натрием $\text{Pro}\cdot\text{Na}^+$ формами в соотношении примерно 3:1. Взаимодействие аминокислоты с олигомерами подтверждается наличием серии $\text{Pro}\cdot\text{M}_n\cdot\text{H}^+$ ($n=1-10$, максимум на $n=6$). Несмотря на преобладание в ЭСИ масс-спектрах катионизации олигомеров ОЭГ-5, комплексы пролина с ОЭГ-5 в катионизированной форме не наблюдаются.

Конкурентное связывание пролина и ИЦМ с ОЭГ-5

В плане основной задачи данной работы, состоящей в выяснении особенностей взаимодействия аминокислоты с криопротекторным веществом, полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что пролин образует стабильные ассоциаты (сольваты) с олигомерами ОЭГ-5. Примечательно, что эти ассоциаты регистрируются только в методах ББА и ЭСИ, и только в протонированной

форме $\text{Pro} \cdot \text{M}_n \cdot \text{H}^+$. Отсутствие таких протонированных ассоциатов в методе ЛДИ связано с известным из литературы преобладанием в ЛДИ механизма катионизации [22-25]. Однако, катионизированная форма сольватов $\text{Pro} \cdot \text{M}_n$ в масс-спектрах ЛДИ тоже отсутствует, равно как и в БАА, и в ЭСИ. Молекулярный ион пролина в ЛДИ также регистрируется преимущественно в протонированной форме. Таким образом, отсутствует прямая корреляция между способом приобретения заряда (протонирование или катионизация) чистыми олигомерами ОЭГ-5 и их ассоциатами с пролином.

Перечисленные особенности спектров позволяют сделать предположение об избирательности взаимодействия аминокислоты с «чистыми» олигомерами в сравнении с олигомерами, связанными с ионами Na^+ и K^+ , непосредственно в растворе. Экспериментальные и теоретические литературные данные, касающиеся взаимодействия полиэфиров (таких как полиэтиленгликоль - ПЭГ) с ИЦМ [26-28] показывают, что стабилизация кластеров молекул полимеров с ИЦМ осуществляется благодаря навиванию цепочки полимера вокруг катиона с образованием своего рода супрамолекулярных комплексов. Можно предположить, что взаимодействие гидрофобного кольца пролина или NH_3^+ группы в цвиттерионной форме с катионными комплексами олигомеров ОЭГ-5 с ИЦМ, образующимися в растворе, невыгодно, в связи с чем соответствующие тройные комплексы не образуются и не регистрируются в спектрах, независимо от метода ионизации.

Для проверки возможности и эффективности взаимодействия пролина со связанными с Na^+ олигомерами ОЭГ-5, методом БАА была исследована тройная система «пролин - ОЭГ-5 - NaCl » (концентрация NaCl 10^{-1} М). В представленном на Рис. 4 БАА масс-спектре этой системы основной серией, в отличие от спектров чистого ОЭГ-5 (Рис. 1а), является серия $\text{M}_n \cdot \text{Na}^+$, а протонированная серия имеет крайне низкую интенсивность. Учитывая высокую чувствительность БАА к «готовым» ионам можно заключить, что большая часть олигомеров в растворе ассоциирована с ионами Na^+ . Даже при таком значительном содержании в системе ионов натрия ассоциаты $\text{Pro} \cdot \text{M}_n \cdot \text{Na}^+$ в спектре отсутствуют, а сам пролин регистрируется преимущественно в протонированной форме. Последнее может свидетельствовать как о низком сродстве пролина к иону натрия, так и том, что практически все ИЦМ в системе достаточно прочно ассоциированы с олигомерами ОЭГ-5.

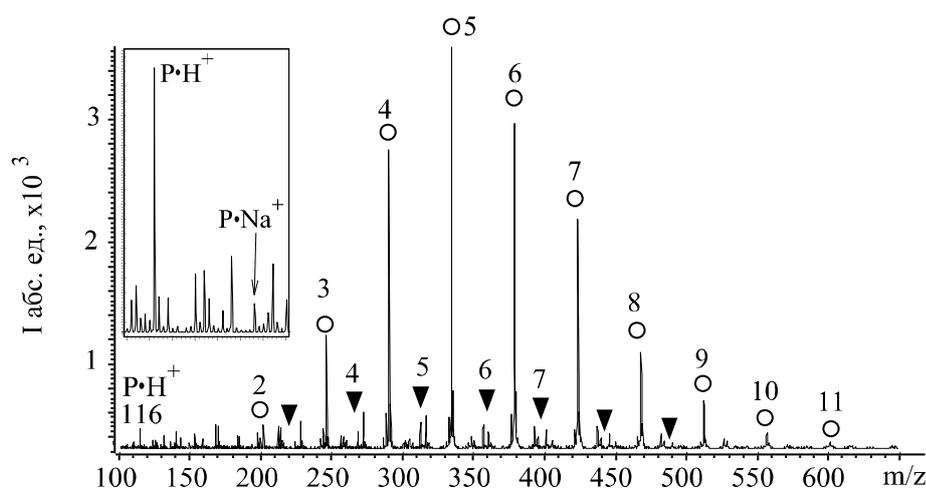


Рис. 4. БАА масс-спектры положительных ионов тройной системы (пролин - ОЭГ-5 - NaCl). \blacktriangledown - $\text{M}_n \cdot \text{H}^+$, \circ - $\text{M}_n \cdot \text{Na}^+$, P – пролин.

Полученные экспериментальные результаты можно интерпретировать в терминах конкурентного взаимодействия, а именно, существования конкуренции между пролином и ИЦМ за связывание с ОЭГ-5; одновременного связывания и аминокислоты

(в нейтральной или цвиттерионной форме), и ИЦМ с олигомерами с образованием тройных комплексов не происходит. С точки зрения описания взаимодействия аминокислоты с ее ион-сольватным окружением в растворе ОЭГ-5 на данном этапе можно заключить, что пролин сольватируется преимущественно нейтральными молекулами ОЭГ-5, а прямые контакты с катионными супрамолекулярными комплексами $M_n \cdot Na^+$, $M_n \cdot K^+$ менее вероятны.

Структура и стабилизация комплексов пролина и ИЦМ с ОЭГ-5

Полученные данные позволяют сделать некоторые предположения о структуре зарегистрированных комплексов. Как уже упоминалось выше, стабилизация комплексов полиэфиров с ионами металлов достигается путем навивания полимерной цепочки на одноатомный ион [26-28] с принятием ею конфигурации, подобной структуре краун-эфира [29, 30]. В таких комплексах эфирные кислороды (несущие частичный отрицательный заряд) обращены к находящемуся в центре кольца положительно заряженному иону. По аналогии, с большой долей уверенности можно считать, что олигомеры ОЭГ-5 с достаточной длиной цепочки при образовании комплексов с ИЦМ принимают подобную квазициклическую конформацию. Количественные оценки стабильности таких комплексов представляют интересную задачу для дальнейших теоретических расчетов и компьютерного моделирования.

Далее возникает закономерный вопрос: могут ли олигомеры ОЭГ-5 (и полиэфиры как таковые) формировать такие квазициклические структуры вокруг органических катионов (цвиттерионов). Мы предприняли поиск соответствующих литературных данных и обнаружили единственную работу 2007 года [31], в которой с помощью ЭСИ масс-спектрометрии впервые были зарегистрированы комплексы ПЭГ с пятичленным гетероциклическим соединением, синтезированным с использованием пролина в качестве предшественника, и высказано предположение об изгибании цепочки ПЭГ вокруг органической молекулы, приводящем к формированию структуры, подобной краун-эфиру. Можно предположить, что зарегистрированные в наших исследованиях методами ЭСИ и БА комплексы протонированного пролина с ОЭГ имеют подобную структуру. Образование комплексов с малыми ионами, имеющими большую пространственную плотность заряда, по всей видимости, более выгодно, что и лежит в основе конкуренции между пролином и ИЦМ за связывание с олигомерами ОЭГ-5.

Проведение аналогий между структурами супрамолекулярных комплексов, образуемых полиэфирами и краун-эфирами, стимулировало поиск литературных данных о взаимодействии аминокислот с краун-эфирами, которых к настоящему времени накоплено достаточно много [32-36]. Основные сведения, имеющие отношение к теме данной работы, сводятся к следующему. Практически все аминокислоты образуют устойчивые комплексы с краун-эфирами. Кислороды кольца краун-эфира координируют водороды положительно заряженной аминогруппы аминокислот, приобретающей заряд либо за счет протонирования, либо вследствие перехода нейтральной аминокислоты в цвиттерионную форму. Пролин выделяется из всего ряда аминокислот тем, что содержит иминогруппу в составе пятичленного цикла, однако он также образует устойчивые комплексы с краун-эфирами. Поскольку одной из задач при разработке краун-эфиров было создание соединений, селективно захватывающих катионы, сродство краун-эфиров к ИЦМ высоко.

Нами были проведены поисковые эксперименты методом БА по взаимодействию основных объектов данной работы с краун-эфирами, детальное описание которых будет опубликовано позже. Предварительные результаты показывают следующие. При добавлении к образцу ОЭГ-5 краун-эфира (18-Crown-6), последний полностью

экстрагирует остаточные количества ионов K^+ , что отражается в полном исчезновении в спектрах ББА серии $M_n \bullet K^+$, присутствующей в чистом образце ОЭГ-5 (см. Рис. 1а). Связывание ионов калия отражается в наличии в масс-спектре ассоциата краун-эфира с калием, наряду с более интенсивным сигналом протонированного краун-эфира. При добавлении краун-эфира к раствору пролина в ОЭГ-5, краун-эфир захватывает пролин: в масс-спектре появляется пик ассоциата протонированного пролина с краун-эфиром, что подтверждает возможность захвата данной аминокислоты краун-подобными структурами. При этом серия ассоциатов пролина с ОЭГ-5 исчезает из спектров, что указывает на конкуренцию за связывание как неорганических, так и органических катионов, завершающуюся в пользу краун-эфира. Очевидная причина заключается в том, что достаточно жесткое кольцо краун-эфира обеспечивает стабилизацию кулоновских или множественных водородных связей с катионами, в то время как тепловые колебания незамкнутого кольца, создаваемого полиэфирами, вызывают периодическое разрушение части таких связей, т. е. частичную дестабилизацию комплекса.

Отметим, что в полученных нами ББА и ЭСИ масс-спектрах положительных ионов для растворов примерно десятка аминокислот в ОЭГ-5, ассоциаты (аминокислота-ОЭГ-5) удалось зарегистрировать только для пролина и гистидина. Молекулы этих аминокислот содержат пятичленные гетероциклы, которые, как мы предполагаем, могут формировать супрамолекулярные комплексы с олигомерами. Отсутствие в спектрах сигналов сольватов остальных аминокислот может быть обусловлено рядом причин: низкой стабильностью комплексов NH_3 -групп аминокислот с описанными выше незамкнутыми кольцевыми структурами олигомеров, пребыванием аминокислоты в нейтральной форме, а также возможной низкой растворимостью (данные отсутствуют) этих аминокислот в ОЭГ-5.

Масс-спектры отрицательных ионов системы «пролин – ОЭГ-5»

Более полную информацию об ионном составе системы аминокислота-криопротектор можно получить с привлечением данных масс-спектрометрии отрицательных ионов.

Значение рН ОЭГ-5 (определенное при его синтезе) составляет 6,5, а изоэлектрическая точка пролина, по литературным данным [12, 37], приходится на рН 6,3. Соответственно, в чистом ОЭГ-5 должна преобладать депротонированная форма пролина (а «высвобождающиеся» протоны могут связываться как с ОЭГ-5, так и с нейтральными молекулами пролина). Действительно, полученные масс-спектры отрицательных ионов ЭСИ (Рис. 5) и ББА подтвердили это предположение: пик депротонированного пролина $[Pro-H]^-$ с высокой абсолютной интенсивностью был максимальным в спектрах, в несколько раз превышая интенсивности серии $[M_n-H]^-$. При этом, наряду с серией $[M_n-H]^-$, наблюдалась серия депротонированных ассоциатов ОЭГ-5 с пролином $[M_n \bullet Pro-H]^-$, имеющая сравнимую с олигомерами интенсивность в режиме ЭСИ и намного меньшую интенсивность в режиме ББА. В методе ЭСИ относительные интенсивности депротонированных ассоциатов $[M_n \bullet Pro-H]^-$ в режиме отрицательных ионов выше, чем протонированных ассоциатов $Pro \bullet M_n \bullet H^+$ в режиме положительных ионов. Таким образом, подтверждается возможность образования отрицательно заряженных ассоциатов пролина с ОЭГ-5. В отличие от краун-эфиров, обладающих селективностью по отношению к катионам, олигомеры ОЭГ могут связываться как с протонированной, так и депротонированной формой пролина.

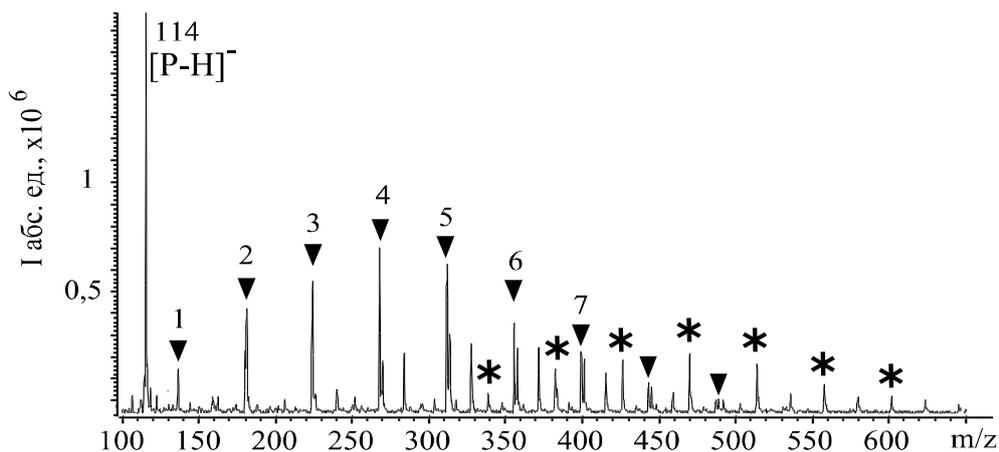


Рис. 5. Масс-спектры отрицательных ионов системы (пролин - ОЭГ-5), полученные в режиме ЭСИ
 ▼ – $[M_n-H]^-$, * - $[P \cdot M_n-H]^-$.

Наличие депротонированной формы пролина в системе «пролин-ОЭГ-5» позволяет объяснить некоторые особенности ее масс-спектров, в частности, отсутствие ассоциатов вида $Pro \cdot M_n \cdot Na^+$. С этой целью можно провести аналогии, опять таки, с супрамолекулярными комплексами, образуемыми краун-эфирами. Для последних установлено, что COO^- группа депротонированных аминокислот связывается с ионами щелочных металлов, захваченных краун-эфиром [32]. Можно предположить, что в исследуемой нами системе именно депротонированная, а не нейтральная, форма пролина связывается с комплексом ОЭГ-5 - Na^+ . Такое связывание, однако, приводит к нейтрализации комплекса, что делает невозможным прямое наблюдение его в масс-спектрах.

Наблюдение более интенсивных, чем в режиме БА, серий разнообразных комплексов в режиме ЭСИ обусловлено более высокой степенью электролитической диссоциации компонентов системы в разбавленном метанольном растворе с их последующей ассоциацией при высыхании распыленных капель раствора.

Для проверки высказанного нами предположения о стабилизации комплексов аминокислоты пролина с олигомерами ОЭГ-5 за счёт закручивания цепочки олигомера вокруг аминокислоты необходимо провести компьютерное моделирование таких комплексов. Выполненные нами пробные расчёты методом молекулярной механики подтвердили закручивание цепочек M_5 и M_{10} вокруг нейтральной молекулы пролина в цвиттерионной форме и протонированного пролина. Более детальный расчёт комплексов пролина с набором олигомеров ОЭГ-5 составит предмет дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

В рамках проблемы изучения взаимодействия компонентов биополимеров – аминокислот – с криопротекторными соединениями исследована модельная система – раствор пролина в олигомерах оксиэтилированного глицерина ОЭГ-5. Использование набора масс-спектрометрических методик с бомбардировкой быстрыми атомами, лазерной десорбцией-ионизацией и электрораспылением из растворов позволило получить взаимодополняющие данные об особенностях взаимодействия пролина с олигомерами ОЭГ-5.

Показано, что протонированный пролин образует сольватные ассоциаты с олигомерами ОЭГ-5, которые регистрируются в протонированной $M_n \cdot Pro \cdot H^+$ и

депротонированной $[M_n \cdot \text{Pro}-\text{H}]^-$ формах, однако катионизированные сольваты не регистрируются ни в одном из применявшихся методов ионизации.

Обнаружена конкуренция за связывание протонированного пролина и ионов щелочных металлов Na^+ , K^+ олигомерами ОЭГ-5. Добавление к бинарной системе соли NaCl (как источника ионов Na^+) подтвердило отсутствие связывания нейтрального (цвиттерионного) пролина с комплексом олигомер-ион щелочного металла.

Предложена модель, объясняющая стабилизацию комплексов пролина с ОЭГ-5 навиванием олигомеров вокруг протонированной молекулы пролина. Данная модель позволяет прояснить механизм конкуренции между аминокислотой и ионами щелочных металлов за связывание с олигомерами и причины отсутствия катионизированных сольватов пролина: поскольку стабилизация супрамолекулярных комплексов олигомеров как с неорганическими, так и с органическими катионами достигается за счет формирования квазициклических структур, то «внешнее» присоединение нейтральной молекулы пролина к комплексу $M_n \cdot \text{Na}^+$ и катиона Na^+ к комплексу $M_n \cdot \text{Pro} \cdot \text{H}^+$ является, по всей видимости, невыгодным.

В то же время, депротонированная форма пролина может связываться с комплексом $M_n \cdot \text{Na}^+$ с образованием нейтральных продуктов, которые масс-спектрометрически не детектируются.

Полученные экспериментальные данные дают представление о составе ион-сольватной оболочки аминокислоты пролина в жидком криопротекторном соединении ОЭГ-5. Перспективы дальнейших исследований состоят в теоретическом моделировании обнаруженных комплексов, включающих пролин, ионы щелочных металлов, ОЭГ-5 в разных зарядовых состояниях.

Благодарности: Работа выполнена при частичной поддержке гранта 24/09-нано НАН Украины, гранта 8-4918/08-УНТЦ фонда УНТЦ и НАН Украины, программы научного сотрудничества между Украинской и Венгерской национальными академиями наук, Центра коллективного пользования прибором «Масс-спектрометрический комплекс с лазерной десорбцией и ионизацией Autoflex II» НАН Украины. Авторы выражают благодарность сотрудникам Химического исследовательского центра ВАН (Венгрия) Ozohanics Oliver и Pollreisz Ferenc за помощь в получении ЭСИ масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чеканова В.В. Синтез, токсичность и криопротекторная активность оксиэтилированных амидов: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук.: спец. 03.00.19 «Криобиология» – Х., 1993. – 17с.
2. Zhivotova E.N. Zinchenko A.V., Kuleshova L.G. et. al. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n=30$ at temperatures lower than 283 K // *CryoLetters*. – 2007. – V. 28, № 4. – P. 261-270.
3. Животова Е.Н., Зинченко А.В., Чеканова В.В. и др. Термический анализ бинарных систем вода-оксиэтилированный глицерин (степень полимеризацию $n=5$ и 25) при температурах ниже 273 К // *Доповіді Національної академії наук України*. - 2006. – №9. – С. 74-79.
4. Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов // *Криобиология и криомедицина*. -1981. – вып. 8. – С. 34-40.
5. Досон Р., Элиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. - М.: Мир, 1991. – 544 с.
6. Химическая энциклопедия. М: Большая российская энциклопедия, 1988-1998. Т. 1-5.

7. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. М. Аминокислоты. Пептиды. Белки. – М.: Мир, 1985. – 456с.
8. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987. – 815с.
9. Michaux C., Wouters J., Perpete E.A. et. al. Stepwise hydration of protonated proline // *The journal of physical chemistry B letters* – 2008. – V. 112. – P. 7702-7705.
10. McLain S.E., Soper A.K., Terry A.E. et. al. Structure and hydration of L-proline in aqueous solutions // *The Journal of Physical Chemistry B* – 2007. – V. 111. P. 4568-4580.
11. Schobert B., Tschesche H. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins // *Biochimica et Biophysica Acta* – 1978. – V. 541. – P. 270-277.
12. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. – К.: Наукова думка, 1971. – 1013с.
13. Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Шимова Ю.С. и др. Белки цитоплазмы меристем почек ели: динамика аминокислотного состава // *Химия растительного сырья* – 2007. №. 4. С. 95–100.
14. Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии // <http://www.biotechnolog.ru/>, 2005
15. Sofou P., Elemen Y., Panou-Pomonis E. Synthesis of a praline-rich [60]fullerene peptide with potential biological activity // *Tetrahedron* – 2004. – V. 60. – P. 2823-2828.
16. Cusan C., Da Ros T., Spalluto G. A new multi-charged C₆₀ derivative: synthesis and biological properties // *European Journal of Organic Chemistry* – 2002. – V. 9, Issue 17. – P. 2928-2934.
17. Kosevich M.V. Low temperature secondary emission mass spectrometry. Cryobiological applications // *European Journal of Mass Spectrometry*. – 1998. – Vol. 4 – P. 251-264.
18. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S. et. al. Study of frozen solutions of nucleic acid nitrogen bases by means of low temperature fast-atom bombardment mass spectrometry // *Rapid Communications Mass Spectrometry*. – 1996. – V. 10 – P. 197-199.
19. Косевич М.В., Зобнина В.Г., Боряк О.А. и др. Исследование раствора аминокислоты валина в криопротекторе этиленгликоле при низких температурах методом вторично-ионной масс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия*. – 2006. – Т. 3 – С. 33-42.
20. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S. Mass spectrometric study of liquid solution of amino acid proline in ethanol at temperatures below 0°C // *Proceedings of Kharkov State University, Biophysical Bulletin* – 2000. – V. 488, Issue 1. – P. 44-48.
21. Косевич М.В., Зобнина В.Г., Животова Е.Н. и др. Масс-спектрометрическое исследование криопротекторов на основе оксиэтилированных производных глицерина // *Масс-спектрометрия* – 2009 – Т. 6, №1 – С. 7-20.
22. Hillenkamp F., Peter-Katalinić J. MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 346 p.
23. Garrison B.J., Delcorte A., Zhigilei L.V. et. al. Big molecule ejection – SIMS vs. MALDI // *Applied Surface Science* – 2003. – V. 203-204. – P. 69-71.
24. Wang B.H., Dreisewerd K., Bahr U. et. al. Gas-phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted laser desorption // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* – 1993. – V. 4, Issue 5. – P. 393-398.
25. Hanton S.D., Owens K.G., Chavez-Eng C. et. al. Updating evidence for cationization of polymers in the gas phase during matrix-assisted laser desorption/ionization // *European Journal of Mass Spectrometry* – 2005. – V. 11, Issue 1. – P. 23–30.
26. Gidden J., Wyttenbach Th., Batka J.J. et. al. Folding energetics and dynamics of macromolecules in the gas phase: alkali ion-cationized poly(ethylene terephthalate) oligomers // *Journal of the American Chemical Society* – 1999. – V. 121. – P. 1421-1422.
27. Gidden J., Wyttenbach Th., Batka J.J. et. al. Poly (ethylene terephthalate) oligomers cationized by alkali ions: structures, energetics, and their effect on mass spectra and the

- matrix-assisted laser desorption/ionization process // *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* – 1999. – V. 10. – P. 883–895.
28. Заикин В.Г. Масс-спектрометрия синтетических полимеров – М.: ВМСО, 2009. – 332 с.
29. Wyttenbach Th., Gert von Helden, Bowers M. T. Conformations of alkali ion cationized polyethers in the gas phase: polyethylene glycol and bis[(benzo-15-crown-5)-15-ylmethyl] pimelate // *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* – 1997. – V. 165/166. – P. 377-390.
30. Shishkina S.V., Shishkin O.V., Grygorash R.Ya. et. al. Molecular and crystal structure of crown ethers containing biphenyl fragment // *Journal of Molecular Structure* – 2007. – V. 832, Issues 1-3. – P. 199-208.
31. Dan Qian Xu, Shu Ping Luo, Yi Feng Wang et. al. Organocatalysts wrapped around by poly(ethylene glycol)s (PEGs): a unique host-guest system for asymmetric // *Chem. Commun.* – 2007. – P. 4393 – 4395.
32. Gerbaux P., De Winter J., Cornil D. et. al. Noncovalent interactions between ([18]crown-6)-tetracarboxylic acid and amino acids: electrospray-ionization mass spectrometry investigation of the chiral-recognition processes // *Chemistry - A European Journal* – 2008. – V. 14. – P. 11039-11049.
33. Liao X.C., Wang X.W., Tao J.C. Liquid membrane transport behavior of functional substituted crown ethers for amino acids // *Chinese Chemical Letters* – 2002. – V. 13, Issue 10. – P. 1003-1004.
34. Buschmann H-J., Schollmeyer E., Mutihac L. The complexation of amino acids by crown ethers and cryptands in methanol // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* –1998. – V. 30, Issue 1. – P. 21-28
35. Tatsuya O., Katsutoshi I., Kazuya U. et. al. Amino acid dominant factors affecting extraction behavior of amino compounds by a calix[6]arene carboxylic acid derivatives // *Analytica Chimica Acta* – 2004. – V. 509, Issue 2. – P. 137-144.
36. Furusawa K. Obata C., Matsumura H. et. al. Bilayer membranes of amphiphilic crown ethers with amino acid residue // *Chemistry Letters* – 1990. – V. 19, Issue. 7. – P.1047.
37. Snow J.T. Peptides. Derivatized amino acids. California, 1988.