

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 544.142.4

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛОВ С ОВАЛЬБУМИНОМ ПО ДАННЫМ МЕТОДА ЯМР

© 2009 Л.Н. Курковская*, И.И. Левина

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Статья поступила 29 апреля 2009 г.

По данным ЯМР установлен тип предпочтительного взаимодействия производных фенола с овальбумином. Водородное связывание группы ОН фенолов с аминокислотами белка приводит к последующему выпадению твердого комплекса. Скорость этого процесса зависит от заместителя в бензольном ядре.

Ключевые слова: фенолы, овальбумин, Н-связь, метод ЯМР.

Среди различных классов органических веществ, загрязняющих окружающую среду, значительная доля приходится на ароматические соединения и, в частности, фенолы [1]. Эти экотоксиканты могут связываться и с компонентами пищи, в том числе и с белками.

Одним из основных свойств белков является их способность к нековалентным видам связывания, главным образом за счет гидрофобных взаимодействий и образования водородных связей с подходящими субстратами. Потенциально фенолы способны к обоим видам связывания с белками [2].

В настоящей работе предпринята попытка выявить предпочтительный вид связывания фенолов с овальбумином — одним из распространенных пищевых белков, который содержит несколько основных аминокислот [3], являющихся потенциальными центрами связывания с фенолами. Меняя протондонорную способность фенолов, можно выявить роль и степень кислотности-основности взаимодействия между белком и фенолами с помощью метода ЯМР.

В качестве объектов исследования взяты фенол и его производные с акцепторными заместителями, увеличивающими его протондонорную способность. Кинетика комплексообразования прослеживалась на протяжении нескольких часов, так как контрольный эксперимент в условиях отсутствия фенола продемонстрировал помутнение раствора овальбумина (денатурацию белка) менее чем через сутки. При соотношении фенол—белок $3 \cdot 10^{-2}/2,25 \cdot 10^{-4}$ М/л в D_2O наблюдалось помутнение раствора с последующим выпадением твердого осадка. Скорость процесса комплексообразования, оцененная по убыванию интенсивности сигналов фенольных протонов, зависела от типа заместителя (рис. 1), время полупревращения составляло от нескольких часов (фенол) до нескольких минут (*n*-NO₂—фенол). При этом в случае отсутствия гидроксильной группы (бензол) сигнал оставался неизменным, а в случае *n*-NO₂—фенола (сильный протондонор) выпадению осадка предшествовало значительное уширение дублетов ароматических протонов. Полученный осадок, растворенный в $DMSO-d_6$, демонстрирует двойной набор дублетов спектра A_2B_2 , причем слабополярные сигналы практически совпадают, а наибольшее изменение сдвига испытывают сигналы *орто*-ОН протонов (рис. 2), что свидетельствует о кислотности-основности характера взаимодействия.

Скорость образования комплекса в основном соответствует константам Гаммета *пара*-заместителей [4], а меньшую активность альдегидной группы по сравнению с Br-замещением (см. рис. 1, кривые 3 и 4 соответственно) можно объяснить участием ее карбонила в дополнительном комплексообразовании с аминокислотными остатками овальбумина.

* E-mail: nmrhigh@sky.chph.ras.ru

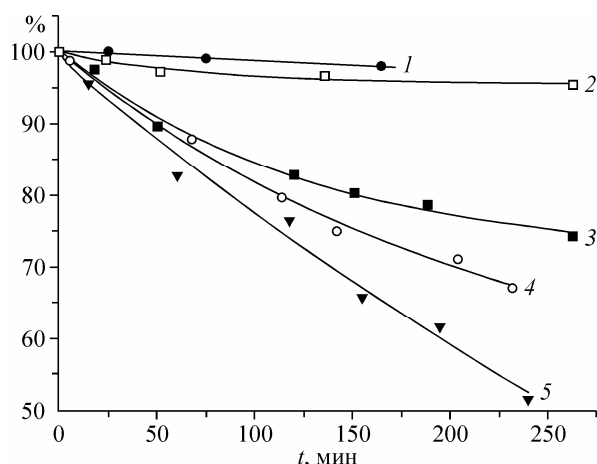


Рис. 1. Количество свободного фенола в зависимости от времени его взаимодействия с овальбумином в D_2O при заместителях в бензольном кольце: 1 — орто-СНО, 2 — незамещенный фенол, 3 — пара-СНО, 4 — пара-Вг, 5 — пара-НО₂

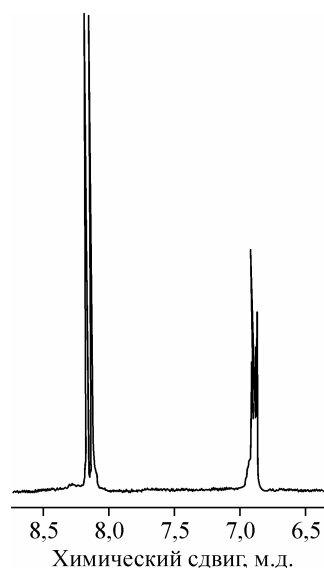


Рис. 2. Химические сдвиги ароматических протонов осадка комплекса пара-нитрофенола с овальбумином в $DMSO-d_6$

Подтверждением вывода о донорно-акцепторном характере взаимодействия фенолы—белок является тот факт, что включение группы ОН во внутримолекулярную водородную связь в случае салицилового альдегида (орто-СНО) не приводит к образованию комплекса последнего с белком: сигналы ароматических протонов остаются неизменными в течение всего времени наблюдения (см. рис. 1, кривая 1).

Спектр ЯМР ^{13}C при добавлении белка к незамещенному фенолу (замещенные, к сожалению, не растворяются в D_2O в концентрации, достаточной для накопления сигналов до момента денатурации белка) демонстрирует неизменность сдвигов всех СН-углеродных атомов: 115,67, 120,91 и 130,27 м.д. для орто-, пара- и мета-углеродных атомов соответственно, тогда как четвертичный атом испытывает некоторое уширение и слабopольное изменение: 155,64 и 155,84 м.д., характерное для донорно-акцепторного взаимодействия фенолов с основаниями [5].

Спектры ЯМР 1H и ^{13}C сняты на спектрометре ЯМР Bruker WM-250 в растворителях D_2O и $DMSO-d_6$; химический сдвиг для протонов измерен относительно стандартов DSS и TMS соответственно. В качестве опорного сигнала для измерения интенсивности сигналов ароматических протонов использовали синглет стандарта DSS. Для спектра ^{13}C в качестве стандарта в водный раствор смеси белок—фенол был добавлен C_2D_2 с последующим пересчетом сдвигов к TMS.

Авторы выражают благодарность Н.К. Генкиной за подбор условий эксперимента и внимание к работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Food Toxicology — real or imaginary problem? / Eds. G.G. Gibson, R. Walker. — L.: Taylor & Francis, 1985.
2. Кузубова Л.И. Токсиканты в пищевых продуктах. — Новосибирск: Изд-во СО АН СССР, 1990.
3. Nisbet A.D., Saundry R.H., Moir A.I.G. et al. // Eur. J. Biochem. — 1981. — **115**, N 2. — P. 335.
4. Жданов Ю.А., Минкин В.И. Корреляционный анализ в органической химии. — Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1966.
5. Деви Г., Нельсон Г. Руководство по ядерному магнитному резонансу углерода-13. — М.: Мир, 1975.