

УДК 539.2;543.422;547.466;548.33

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ИК СПЕКТРЫ
КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ, ДИПЕПТИДОВ И ПОЛИАМИНОКИСЛОТ.
IV. L-ЦИСТЕИН И DL-ЦИСТЕИН**© 2008 В.С. Миньков^{1,2*}, Ю.А. Чесалов^{1,3}, Е.В. Болдырева^{1,2*}¹НОЦ МДЭБТ, Новосибирский государственный университет²Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск³Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск

Статья поступила 30 января 2008 г.

Исследованы ИК спектры L-цистеина и DL-цистеина в диапазоне частот 4000—600 см⁻¹ в интервале температур 333—83 К. Проведен анализ изменений в спектрах при охлаждении L-цистеина и DL-цистеина (NH₃⁺—CH(CH₂SH)—COO⁻) в сравнении с ранее исследованными при варьировании температуры спектрами L-серина, DL-серина (NH₃⁺—CH(CH₂OH)—COO⁻) и трех полиморфных модификаций глицина (NH₃⁺—CH₂—COO⁻). Изменения в ИК спектрах при варьировании температуры соотнесены с ранее полученными дифракционными данными об анизотропном сжатии структуры и изменениях геометрических параметров водородных связей. Особое внимание уделено температурным областям, в которых методами колебательной спектроскопии, рентгеноструктурного анализа и калориметрии были обнаружены аномалии.

Ключевые слова: цистеин, оптические изомеры, ИК спектроскопия, водородные связи.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования молекулярных кристаллов при переменной температуре полезны для понимания динамики межмолекулярных взаимодействий, их вклада в образование структуры и их отклика на внешние изотропные воздействия. Особое внимание уделяют исследованию кристаллов аминокислот, которые можно использовать как модельные объекты для изучения динамики отдельных функциональных групп в биополимерах.

Аминокислоты — это базис, из которого строятся сложные биологические системы — белки и пептиды. Хотя в кристаллах аминокислот, в отличие от пептидов и белков, отсутствуют пептидные связи, цвиттер-ионы аминокислот связаны друг с другом водородными связями в бесконечные цепочки "голова к хвосту", которые сохраняются при деформации структуры и даже при ее реорганизации в ходе полиморфных превращений и могут служить моделями пептидных цепочек [1—3]. Цепочки цвиттер-ионов "голова к хвосту" в кристалле могут образовывать двумерные слои и спирали, схожие с β-складками и α-спиралями в белках, а также другие более сложные трехмерные структуры.

Важность изучения кристаллических аминокислот не исчерпывается только тем, что они являются составными частями белковых молекул. Аминокислоты часто встречаются в организме в свободном состоянии и имеют первостепенное биохимическое значение [4]. Помимо сво-

* E-mail: minkov@xray.nsu.ru, boldyrev@nsu.ru

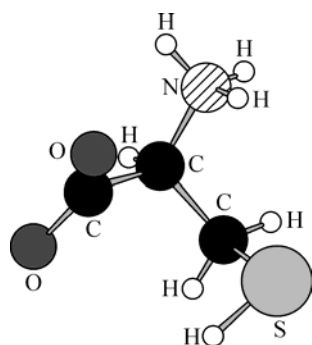


Рис. 1. Молекула цистеина с обозначением атомов

ей биологической значимости, кристаллы аминокислот обладают другими не менее интересными физическими свойствами, которые позволяют использовать данные системы как сегнетоэлектрики, пьезоэлектрики [5], нелинейные оптические материалы [6, 7]. Для ряда кристаллических аминокислот существуют полиморфные модификации, изучение которых представляет интерес для понимания взаимосвязи "структура—свойство" и, в частности, роли водородных связей.

Ранее изменения в ИК спектрах, вызываемые понижением температуры и соответствующим анизотропным сжатием кристаллической структуры, были исследованы для полиморфных модификаций глицина ($\text{NH}_3^+—\text{CH}_2—\text{COO}^-$) [8], L- и DL-серина ($\text{NH}_3^+—\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})—\text{COO}^-$) [9]. Для L- и DL-серина также недавно подробно исследована температурная зависимость спектров КР [10]. Логичным продолжением этих исследований является изучение влияния температуры на ИК спектры L- и DL-цистеина ($\text{NH}_3^+—\text{CH}(\text{CH}_2\text{SH})—\text{COO}^-$), имеющего аналогичную серину молекулярную структуру (рис. 1). Замена атома кислорода на атом серы приводит к заметному ослаблению водородных связей, которые может образовывать боковой фрагмент ($—\text{CH}_2\text{SH}$ вместо $—\text{CH}_2\text{OH}$). Вследствие этого при нормальных условиях тиольные группы в структуре цистеина разупорядочены по двум положениям, так что образуют водородные связи либо с атомом кислорода карбоксильной группы, либо с атомом серы другой сульфгидрильной группы соседних цвиттер-ионов [11, 12].

За последние годы были изучены ИК спектры цистеина в водных растворах при разных pH в диапазоне частот $1800—500\text{ см}^{-1}$ [13], а также спектры ИК, КР и неупругого рассеяния нейтронов при 10 К образцов L-цистеина и L-дейтеро-цистеина [14]. Спектры DL-цистеина ранее исследованы не были.

Цель нашей работы — сравнительное исследование ИК спектров кристаллических форм L- и DL-цистеина в интервале температур $333—83\text{ К}$ во многих точках для обеспечения детального анализа температурной зависимости положения максимумов и интенсивности различных полос поглощения без использования активных разбавителей или матриц.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы L-цистеина (ICN Biomedicals, химическая чистота 99,7 %) и DL-цистеина (Aldrich, химическая чистота 97 %). Фазовый состав всех образцов контролировали методом рентгенофазового анализа на порошковом дифрактометре с двухкоординатным детектором GADDS D8 Bruker, $\text{CuK}\alpha$, $2\theta\ 10—40^\circ$. Образцы L-цистеина представляли собой ромбическую полиморфную модификацию (пространственная группа $P2_12_12_1$, D_2^4) (рис. 2, а). По данным порошковой дифрактометрии в образце DL-цистеина присутствовало в виде примеси небольшое количество ромбической и моноклинной модификаций L-цистеина. Измерение вращения плоскости поляризации (Polamat A polarimeter) показало, что примесь L-цистеина составляет около 3 %. ВЖХ (Миллихром) подтвердила, что других примесей (по крайней мере, в количестве $>1\%$) в образце нет. В ИК спектрах DL-цистеина присутствие малого количества примеси L-цистеина никак не проявлялось. Дифрактограмма DL-цистеина соответствовала единственной известной на сегодня полиморфной модификации (пространственная группа $P2_1/a$, C_{2h}^5) (см. рис. 2, б) [15].

ИК спектры поглощения порошков исследуемых веществ, отпрессованных в тонкие пластинки, были измерены на ИК-Фурье спектрометре Digilab Excalibur 3100 с просвечивающим ИК микроскопом UMA-400 (фирма Varian) в диапазоне частот $4000—600\text{ см}^{-1}$ (разрешение 4 см^{-1} , точность определения частоты $0,1\text{ см}^{-1}$). Для нагревания и охлаждения образцов исполь-

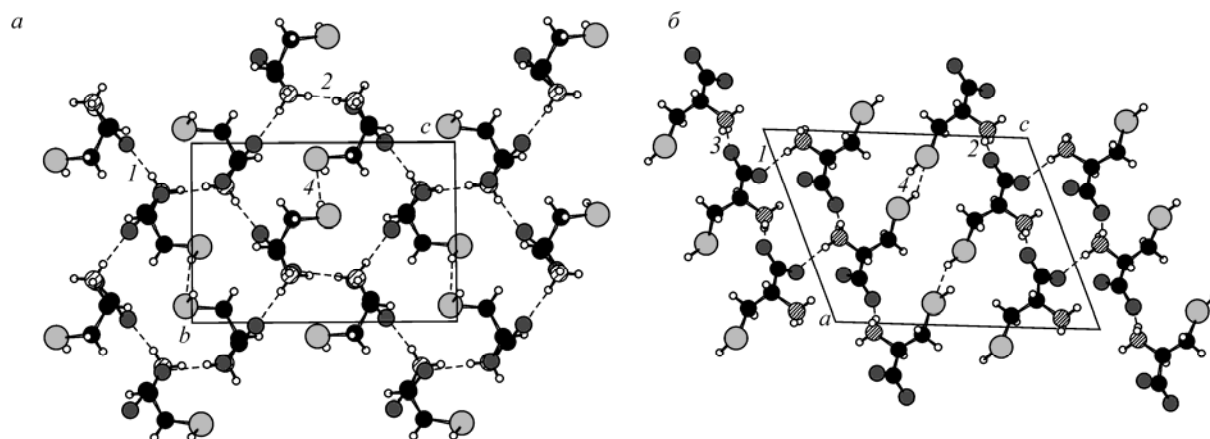


Рис. 2. Фрагменты кристаллической структуры: *a* — L-цистеина, *б* — DL-цистеина. Пунктир обозначает водородные связи (нумерация типов связей соответствует табл. 2)

зовали столик переменной температуры FTIR 600 фирмы Linkam с программатором температур (используемые в данной работе температурный интервал 333—83 К и шаг по температуре 10 град., точность определения температуры 0,1 К). Вследствие того, что нам не удалось получить достаточно тонкие образцы чистого (неразбавленного) L- и DL-цистеина (интенсивность поглощения полос в области $1750\text{—}1500\text{ см}^{-1}$ была слишком велика), мы использовали инертный наполнитель BaF_2 в соотношении 1:1. Использование фторида бария никак не повлияло на положение полос поглощения и их температурную зависимость, зато позволило нам исследовать температурные изменения ИК спектров поглощения, полученных с использованием ИК микроскопа во всей доступной области частот.

ИК спектры поглощения образцов L- и DL-цистеина при комнатной температуре были записаны также и по стандартной методике, т.е. от образцов, запрессованных в таблетки KBr (соотношение вещество : $\text{KBr} = 1 : 200$) на ИК-Фурье спектрометре Infracum FT-801 в диапазоне частот $4000\text{—}500\text{ см}^{-1}$ с разрешением 4 см^{-1} .

ИК спектры нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) L- и DL-форм цистеина в диапазоне частот $4000\text{—}580\text{ см}^{-1}$ (разрешение 4 см^{-1}) были получены на ИК-Фурье спектрометре Digilab Excalibur 3100 с использованием приставки MIRacle ATR фирмы Pike. Для получения ИК спектров по этой методике не требуется какой-либо специальной подготовки пробы, т.е. использование разбавителя или прессование таблеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение инфракрасных спектров L-цистеина и DL-цистеина, полученных при использовании различных методик регистрации. ИК спектры одних и тех же образцов цистеина, регистрируемые разными методиками, схожи, но не одинаковы (рис. 3). Различия наблюдаются в относительной интенсивности полос поглощения и в положении максимумов некоторых полос (смещения достигают 10 см^{-1} в DL-цистеине и 5 см^{-1} в L-цистеине). При использовании матрицы KBr наиболее сильно смещаются максимумы полос поглощения, отвечающие колебаниям функциональных групп, которые непосредственно участвуют в образовании водородных связей (NH_3^+ , CO_2^- и —SH). Самыми чувствительными оказались частоты колебаний $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$, $\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ и $\delta(\text{SH})$. Поэтому использование разбавителя KBr может привести к искажению ИК спектров L- и DL-цистеина из-за своего влияния на водородные связи в этих кристаллах.

Сравнение ИК спектров L- и DL- цистеина при комнатной температуре. Для сопоставления спектров L- и DL-цистеина при комнатной температуре были использованы спектры НПВО (рис. 4). Отнесение полос поглощения, основанное на данных работы [14], приведено

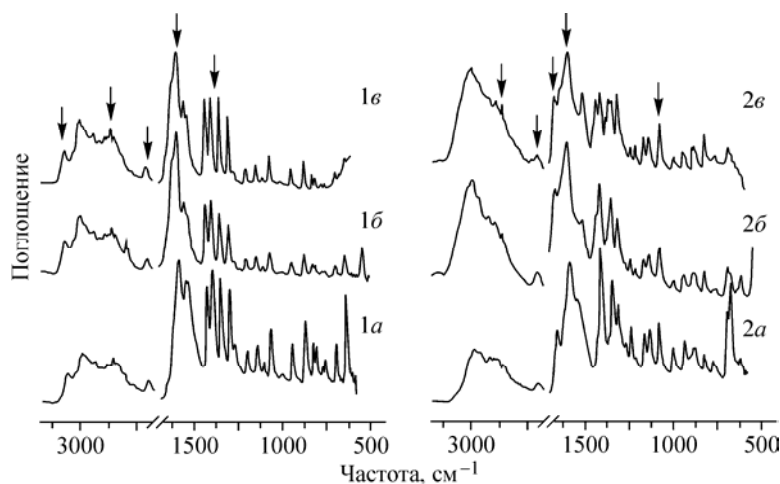


Рис. 3. ИК спектры L-цистеина (1) и DL-цистеина (2) при комнатной температуре: а — спектр НПВО, б — спектр поглощения, полученный в виде таблетки с KBr, в — спектр поглощения, полученный с использованием инертного разбавителя BaF₂. Стрелками обозначены наибольшие различия в положении полос поглощения

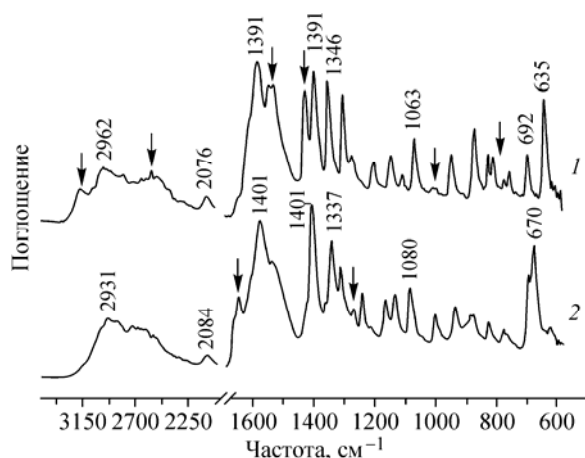


Рис. 4. Спектры НПВО L-цистеина (1) и DL-цистеина (2) при комнатной температуре. Стрелками обозначены области наибольших различий между спектрами

в табл. 1. Спектры существенно различаются во всем измеренном интервале частот, что позволяет достоверно различать кристаллические формы L- и DL-цистеина по их ИК спектрам. При этом наибольшие отличия наблюдаются в частотах колебаний групп атомов, участвующих в образовании водородных связей: $-\text{NH}_3^+$, $-\text{CO}_2^-$ и $-\text{SH}$.

Как и в предыдущих работах [8, 9], сопоставление спектров проведено не по спектральным диапазонам, а по характеристическим полосам поглощения функциональных групп молекулы цистеина.

Колебания карбоксильной группы. В ИК спектрах L- и DL-цистеина наблюдается несколько полос поглощения, относящихся к колебаниям группы CO_2^- : валентные $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ и $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$, а также деформационные $\omega(\text{CO}_2^-)$ и $\delta(\text{CO}_2^-)$. В случае L-цистеина асимметричные и симметричные валентные колебания данной группы находятся при 1579 и 1391 cm^{-1} соответственно. Для DL-цистеина эти полосы поглощения расположены при 1574 и 1401 cm^{-1} . Разница в частотах симметричных валентных колебаний для L- и DL-цистеина составляет 10 cm^{-1} . Частоты асимметричных валентных колебаний в спектрах этих соединений отличаются на 5 cm^{-1} . Различия в спектрах данных соединений в области валентных колебаний группы CO_2^- связаны, по-видимому, с различной прочностью водородных связей, образованных карбоксильной группой в хиральном и рацемическом цистеине. Это согласуется с рентгеноструктурными данными: водородные связи в DL-цистеине короче, чем в L-цистеине (см. рис. 2, табл. 2).

В ранее исследованных нами ИК спектрах L- и DL-форм серина разница между частотами асимметричных валентных колебаний составляла 10 cm^{-1} , а симметричных валентных колеба-

Т а б л и ц а 1

Экспериментальные частоты, смещения полос поглощения при охлаждении в интервале 333—83 К и их отнесение в спектрах НПВО L-цистеина и DL-цистеина при 293 К

L-цистеин		DL-цистеин		Отнесение	L-цистеин		DL-цистеин		Отнесение
Частота, см ⁻¹	Δ , см ⁻¹	Частота, см ⁻¹	Δ , см ⁻¹		Частота, см ⁻¹	Δ , см ⁻¹	Частота, см ⁻¹	Δ , см ⁻¹	
3162	-16	—	—	$\nu(\text{NH}_3^+)$	1196	7	1211	0	$\tau(\text{CH}_2)$
2962	2	2931	16	$\nu(\text{NH}_3^+)$	1140	2	1160	10	$\delta(\text{CH})$
2551,	<-10,	2544	-3	$\nu(\text{SH})$	1103	6	1129	10	$\rho(\text{NH}_3^+)$
2508	>10				1063	6	1080	4	$\rho(\text{NH}_3^+)$
2076	26	2084	18	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)+$	1003	4	999	4	$\rho(\text{NH}_3^+)$
				$+\tau(\text{NH}_3^+)$	993	3	—	—	$\rho(\text{NH}_3^+)$
1644	9	1647	9	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$	942	4	933	11	$\delta(\text{SH})$
1607	9	—	—	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$	866	4	883,	2,	$\nu(\text{CC})$
1579	-4	1574	0	$\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$			873	*	
1540	9	1535	*	$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$	823	5	823	3	$\omega(\text{CO}_2^-)$
1526	7	1500	-2	$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$	806	8	816	12	$\delta(\text{CO}_2^-)$
1421	6	1421	5	$\delta(\text{CH}_2)$	769	-3	774	4	$\rho(\text{CH}_2)$
1391	1	1401	5	$\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$	753	-1	—	—	$\rho(\text{CH}_2)$
1346	4	1337	5	$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$	692	-3	690,	1,	$\nu(\text{CS})$
1295	2	1308,	0,	$\omega(\text{CH}_2)$			670	-7	
		1290	6		663	1	—	—	$\nu(\text{CS})$
1268	-6	1266,	*,	$\rho(\text{CH})$	635	5	620	4	$\delta(\text{CO}_2^-)$
		1237	1						

* Невозможно определить, так как данная полоса поглощения, присутствующая в спектре НПВО, не наблюдается в ИК спектрах на пропускание.

Т а б л и ц а 2

Геометрические параметры водородных связей в структуре L-цистеина и DL-цистеина

L-цистеин						
T, К	1. N—H...O, Å (град.)	2. N—H...O, Å (град.)	3. N—H...O, Å (град.)	4. S...S, Å	S...O1, Å	S...O2, Å
295	2,792 (164)	3,017 (158)	2,762 (174)	3,849	3,673	3,383
200	2,782 (164)	2,993 (158)	2,755 (173)	3,837	3,636	3,365
105	2,778 (160)	2,964 (161)	2,756 (172)	3,850	3,574	3,352
DL-цистеин						
T, К	1. N—H...O, Å (град.)	2. N—H...O, Å (град.)	3. N—H...O, Å (град.)	4. S—H...S, Å (град.)		
295	2,781 (174)	2,829 (165)	2,809 (175)	3,855 (146,19)		

ний — 23 см^{-1} [9]. Как видно, различия в спектрах хиральной и рацемической форм в области валентных колебаний карбоксильной группы для серина заметно больше, что может говорить о более значимой разнице в прочности водородных связей в кристалле между L- и DL-формами. Действительно, в отличие от L-серина, в DL-серине карбоксильная группа участвует в образовании не только трех водородных связей N—H...O, но также и дополнительной связи O—H...O с боковым радикалом молекулы серина. В L- и DL-цистеине присутствуют только три водородные связи N—H...O между карбоксильной и амино-группами, и различие в энергии водородных связей определяется, в основном, их длинами.

Колебания аминогруппы. В ИК спектре L-цистеина проявляется полоса поглощения 3162 см^{-1} , которую авторы [14] относят к колебанию $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$. В ИК спектре DL-цистеина наблюдается очень слабо выраженное плечо с максимумом при $\sim 3150 \text{ см}^{-1}$.

Валентные колебания протонированной аминогруппы в ИК спектрах L- и DL-цистеина дают интенсивное широкое поглощение сложной формы в области $3100\text{—}2700 \text{ см}^{-1}$ с центрами тяжести при ~ 2960 и $\sim 2930 \text{ см}^{-1}$ соответственно. Как видно, частоты валентного колебания группы NH_3^+ в DL-цистеине смещены в область меньших частот на $\sim 30 \text{ см}^{-1}$ по сравнению с L-цистеином, что может свидетельствовать о наличии более прочных водородных связей, образованных этой группой в кристаллах DL-формы. В отличие от цистеина, в ИК спектрах серина центр тяжести широкого поглощения в области $3300\text{—}2500 \text{ см}^{-1}$ в DL-форме сдвинут в область более низких частот на $\sim 50 \text{ см}^{-1}$ относительно его положения в L-форме. Частоты же деформационных колебаний этой группы в спектре DL-цистеина несколько выше, чем в L-форме.

Как и в спектрах кристаллов большинства аминокислот [16], в ИК спектрах L- и DL-цистеина наблюдается поглощение со сложным контуром в диапазоне частот $2050\text{—}2100 \text{ см}^{-1}$: 2076 и 2084 см^{-1} для L- и DL-цистеина соответственно. Однозначного мнения относительно отнесения этого поглощения не существует. Одни исследователи относят его к обертонам или составным частотам [17], другие — к колебаниям N—H...O [18]. В соответствии с недавней работой [19], данное поглощение отнесено к составному колебанию $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+) + \tau(\text{NH}_3^+)$. В ранее исследованных нами ИК спектрах аминокислот данная полоса поглощения расположена при 2039 см^{-1} (L-серин), 2122 см^{-1} (DL-серин). Таким образом, значения данной частоты в спектрах L- и DL-цистеина лежат между значениями этой частоты в спектрах L- и DL-серина. Следует обратить внимание на то, что, в отличие от серина, в цистеине разница между положениями максимумов данной полосы поглощения в хиральной и рацемической формах невелика — всего 8 см^{-1} (для серина 83 см^{-1}). Это может свидетельствовать о большей разнице в энергии водородных связей между L- и DL-формами в серине, чем в цистеине.

Колебания тиольной группы. В ИК спектрах DL-цистеина валентному колебанию SH-группы отвечает узкая полоса поглощения при 2544 см^{-1} . В L-цистеине тиольная группа может образовывать два типа контактов S—H...S и S—H...O [11, 12]. Первый контакт предпочтительнее, так как образование контакта S—H...S выгоднее по энергии на $4,11 \text{ кДж/моль}$ [20], что находит подтверждение в спектроскопическом исследовании данного образца. В ИК спектрах оптически активного L-цистеина присутствуют две полосы поглощения при 2508 и 2551 см^{-1} , относящиеся к колебаниям $\nu(\text{SH})$. Первая полоса поглощения может быть отнесена к валентным колебаниям S—H...S, вторая — к колебаниям S—H...O. Авторы работы [14] относят полосу поглощения при 939 см^{-1} к колебанию $\delta(\text{SH})$. В ИК спектрах L- и DL-цистеина проявляются частоты при 942 и 933 см^{-1} соответственно. Все это свидетельствует о наличии в L-цистеине более прочных водородных связей в сравнении с DL-цистеином, образованных тиольными группами молекулы цистеина.

Изменения в ИК спектрах L- и DL-цистеина в интервале температур $333\text{—}83 \text{ К}$. При охлаждении образцов L- и DL-цистеина в интервале температур $333\text{—}83 \text{ К}$ в их ИК спектрах наблюдается смещение максимумов и уменьшение полуширины полос поглощения, перераспределение интенсивности и расщепление некоторых полос (рис. 5). Наибольшее смещение

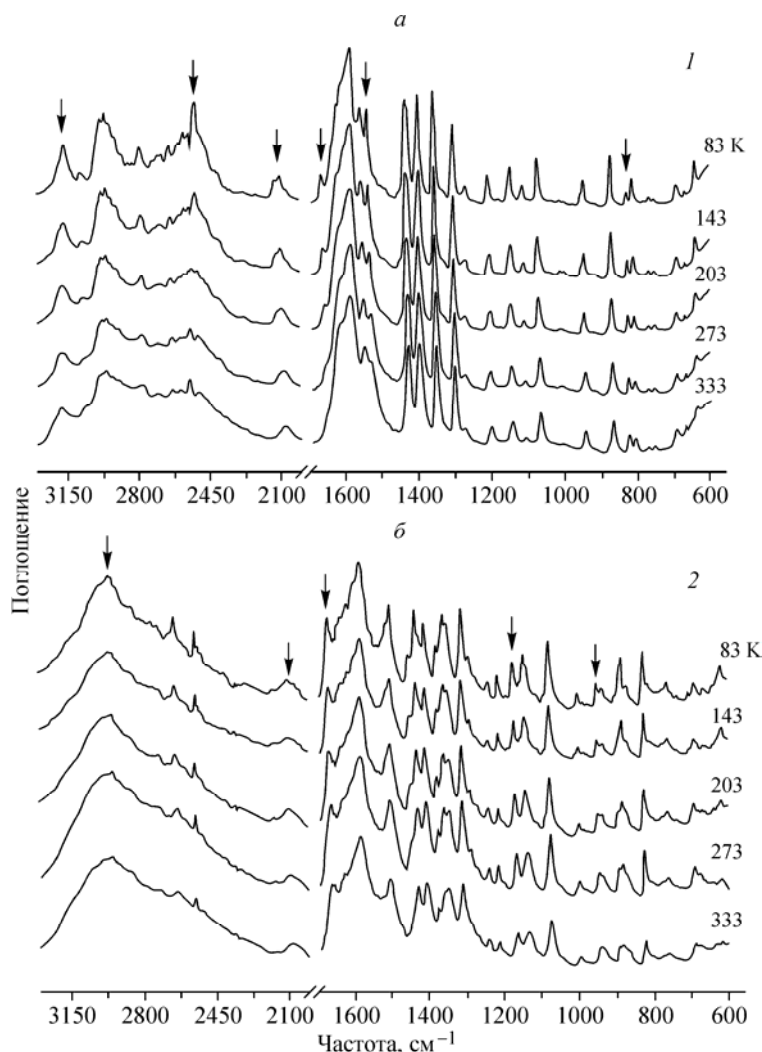


Рис. 5. ИК спектры L-цистеина (1) и DL-цистеина (2) при разных температурах. Стрелками обозначены области наибольших изменений при охлаждении

претерпевают полосы поглощения, которые относятся к колебаниям непосредственно участвующих в образовании водородных связей групп (NH_3^+ , CO_2^- и SH). Интересно отметить перераспределение интенсивности для колебаний $\nu(\text{SH})$, которое при понижении температуры переходит в единственную узкую и интенсивную полосу.

Колебания карбоксильной группы. Понижение температуры приводит к уменьшению частоты асимметричного на $\sim 4 \text{ см}^{-1}$ и неизменности симметричного валентных колебаний группы CO_2^- в ИК спектрах L-цистеина. Для DL-цистеина наблюдается увеличение частоты симметричного валентного колебания карбоксильной группы на $\sim 5 \text{ см}^{-1}$ при неизменности асимметричного. При этом величина расщепления $\Delta = \nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-) - \nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ в ИК спектрах как L-, так и DL-цистеина уменьшается при уменьшении температуры. В случае координационных соединений величина Δ определяется способом координации (моно- или бидентатной), а также зависит от прочности связи между металлом и группой CO_2^- [21, 22]. Так, при бидентатном способе координации значение Δ уменьшается при увеличении прочности образующейся связи [22]. В случае кристаллических аминокислот и дипептидов карбоксильная группа образует аналогичную бидентатной координации бифуркационную связь с аминогруппой, что позволяет

предположить возможность использования Δ для характеристики спектральных данных и их интерпретации с точки зрения изменения прочности водородных связей, образованных карбоксильной группой. Корреляция между величиной Δ в ИК спектрах и геометрическими параметрами водородных связей по структурным данным ранее наблюдалась нами уже для многих соединений: полиморфных модификаций глицина [8], серина [9], глицилглицина [23] и теперь подтверждается также для цистеина. Уменьшение разности Δ при охлаждении образцов цистеина указывает на упрочнение водородных связей, в которых участвует группа CO_2^- , что соответствует рентгеноструктурным данным — уменьшению длин водородных связей $\text{N—H}\dots\text{O}$.

В ИК спектрах ранее исследованных нами L- и DL-серина также имело место уменьшение данного расщепления, причем для L-формы изменение Δ было в ~ 2 раза больше в отличие от DL-формы. В ИК спектрах α - и γ -форм глицина при охлаждении до 93 К также наблюдали уменьшение расщепления Δ (до 4 см^{-1}). В случае же β -глицина, наоборот, наблюдали увеличение расщепления Δ примерно на 5 см^{-1} , что можно связать с ослаблением соответствующих водородных связей [8].

Увеличение частот всех деформационных колебаний карбоксильной группы на $\sim 8 \text{ см}^{-1}$ свидетельствует об упрочнении всех водородных связей, в которых принимает участие группа CO_2^- .

Колебания аминогруппы. В отличие от ИК спектров L-цистеина, в которых можно выделить полосу поглощения $\nu(\text{NH}_3^+)$ в области $3200\text{—}3100 \text{ см}^{-1}$, в ИК спектрах DL-цистеина полосы поглощения валентных колебаний аминогруппы сильно перекрываются между собой и другими полосами поглощения в области частот $3100\text{—}2700 \text{ см}^{-1}$, аналогично перекрыванию в ИК спектрах L- и DL-серина [9]. При охлаждении в L-цистеине смещение данной полосы в сторону меньших частот составляет 16 см^{-1} , что свидетельствует об упрочнении водородных связей, образованных данной группой. В ИК спектре DL-цистеина центр широкой полосы поглощения, характеризующей валентные колебания аминогруппы, практически не изменяется при варьировании температуры. В ИК спектрах L- и DL-серина для той же полосы при охлаждении образцов от 295 до 93 К наблюдается смещение центра тяжести сложного поглощения в области меньших частот $3200\text{—}2500 \text{ см}^{-1}$. Для L-серина данный сдвиг составляет около -60 см^{-1} , а в случае DL-серина — около -30 см^{-1} [9]. Из этого следует, что в серине водородные связи, образованные аминогруппой, более чувствительны к изменению температуры по сравнению с цистеином.

В ИК спектрах L- и DL-цистеина с уменьшением температуры частоты всех деформационных колебаний группы NH_3^+ в разной степени смещаются в область более высоких частот, что свидетельствует об упрочнении всех водородных связей. Величина данных смещений как для L-, так и DL-цистеина составляет $\sim 10 \text{ см}^{-1}$. В ИК спектрах L-цистеина и DL-цистеина при охлаждении от 333 до 83 К наблюдается увеличение примерно на 26 и 18 см^{-1} частоты максимума сложного поглощения $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+) + \tau(\text{NH}_3^+)$ около 2080 см^{-1} (рис. 6). В L- и DL-серине смещение максимума частоты этого сложного колебания составило 30 и 15 см^{-1} .

В настоящее время очень велик интерес к торсионным колебаниям группы NH_3^+ в кристаллах аминокислот и малых органических молекул, и они активно исследуются методом КР в условиях низких температур [10, 24—30] и высоких давлений [31—33]. К сожалению, исследовать влияние температуры на торсионные колебания NH_3^+ -группы по ИК спектрам в ходе наших экспериментов не представлялось возможным, так как частоты этих колебаний находятся вне области поглощения температурной ячейки.

Колебания тиольной группы. Изменение частоты $\nu(\text{SH})$ при варьировании температуры для L- и DL-цистеина сильно различается. Так, в случае DL-цистеина данная полоса поглощения смещается в сторону низких частот на $\sim 3 \text{ см}^{-1}$. Для L-цистеина, в котором тиольная группа

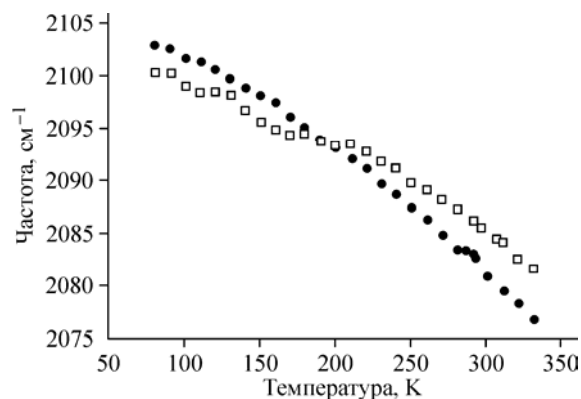


Рис. 6. Зависимость частоты составного колебания $\delta_{as}(\text{NH}_3^+) + \tau(\text{NH}_3^+)$ от температуры для L-цистеина (темные круги) и DL-цистеина (светлые квадраты)

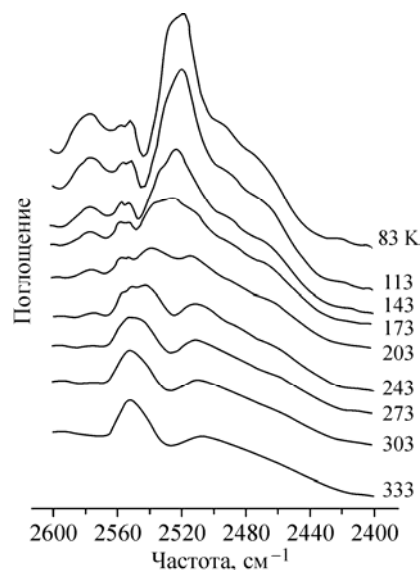


Рис. 7. Изменения частот колебаний SH-группы молекулы L-цистеина при варьировании температуры

разупорядочена, наблюдаются более существенные изменения (рис. 7). При комнатной температуре колебаниям данной группы отвечают две полосы поглощения, характеризующие наличие двух типов контактов: S—H...S и S—H...O [11, 12]. С понижением температуры эти полосы поглощения претерпевают смещения на $\sim 10 \text{ см}^{-1}$. На нижнем температурном пределе наших экспериментов (83 К) доминирует только одна узкая и интенсивная полоса при 2516 см^{-1} , отвечающая контакту S—H...S.

В ИК спектрах образцов L- и DL-цистеина частота деформационных колебаний группы SH возрастает при понижении температуры на 4 и 11 см^{-1} соответственно. Это может свидетельствовать о том, что при понижении температуры водородные связи, образованные данной группой, становятся прочнее. Для сравнения, при охлаждении кристаллов DL-серина полоса поглощения, отвечающая неплоскостным деформационным колебаниям гидроксильной группы, смещается в высокочастотную область. В L-серине при понижении температуры в области около 140 К движение гидроксильной группы замораживается [10, 34], что проявляется в ИК спектрах как эффективное смещение максимума широкой сложной полосы в высокочастотную область [9], а в спектрах КР — как расщепление одной широкой полосы со сложным контуром на хорошо разрешенные компоненты, относительная интенсивность которых перераспределяется по мере дальнейшего понижения температуры [10, 34]. Изменение ориентации бокового фрагмента ($-\text{CH}_2\text{OH}$) и смену типа межмолекулярных водородных связей с $\text{OH}\dots\text{OH}$ на $\text{OH}\dots\text{O}(\text{CO})$ в L-серине наблюдали при фазовом переходе, вызываемом действием давления [35—37].

Скелетные колебания и колебания групп CH_2 и CH . Частоты валентных колебаний групп CH_2 и CH , находящиеся в области $3000\text{—}2800 \text{ см}^{-1}$, сильно перекрываются с частотами валентных колебаний аминогруппы. При этом частоты деформационных колебаний этих групп как в L-цистеине, так и в DL-цистеине изменяются на величину около 6 см^{-1} . При охлаждении в DL-цистеине сдвиг в высокочастотную область на 10 см^{-1} частоты колебания $\delta(\text{CH})$, возможно, объясняется вкладом колебания $\rho(\text{NH}_3^+)$. Изменения частот скелетных колебаний для L- и DL-цистеина не превышают 4 см^{-1} .

Именно для колебаний групп CH и CH_2 наиболее ярко проявляются различия во влиянии температуры на ИК спектры хиральных и рацемических кристаллов цистеина. В спектрах DL-цистеина смещения максимумов полос поглощения колебаний $\tau(\text{CH}_2)$ и $\rho(\text{CH})$ при понижении

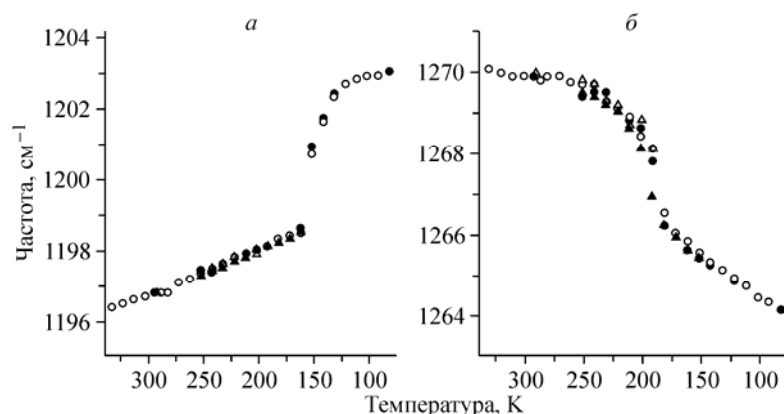


Рис. 8. Температурная зависимость положения максимумов полос поглощения в спектре L-цистеина для колебаний $\nu(\text{CH}_2)$ (а) и $\rho(\text{CH})$ (б)

температуры монотонные, в то время как в спектрах L-цистеина зависимость частот колебаний $\nu(\text{CH}_2)$ и $\rho(\text{CH})$ от температуры имеет S-образный характер — в узком температурном интервале происходит резкое изменение положений максимумов полос (рис. 8). Такое скачкообразное изменение положения максимума воспроизводится при многократном охлаждении и нагревании образца и не имеет гистерезиса. Полосы поглощения этих частот колебаний узкие во всем исследованном температурном интервале; с понижением температуры полосы все более сужаются.

В настоящее время в литературе наблюдается большой интерес к водородным связям C—H...O, которые, как полагают, могут образовываться в кристаллах некоторых аминокислот [38, 39]. Водородные связи этого типа играют важную роль в формировании структур в ряде молекулярных кристаллов, биополимеров и супрамолекулярных ансамблей [40—42]. При образовании водородных связей C—H...O в ИК спектрах должны наблюдаться заметное уширение, увеличение относительной интенсивности и сдвиг полос поглощения, соответствующих колебаниям связей C—H. В исследованных нами ИК спектрах L- и DL-цистеина в интервале температур 333—83 К полосы поглощения, относящиеся к деформационным колебаниям групп CH_2 и CH, чувствительны к изменению температуры. В случае L-цистеина наблюдалось скачкообразное изменение частот внеплоскостных колебаний данных групп. Однако заметного уширения и изменения интенсивности полос поглощения для колебаний данных групп не наблюдалось ни при каких температурах, а при понижении температуры, когда можно было бы ожидать упрочнения водородных связей C—H...O, полосы, напротив, сужаются. Все это не подтверждает предположения о наличии в данных структурах взаимодействий, которые можно было бы охарактеризовать как водородные связи C—H...O. В ранее исследованных ИК спектрах полиморфных модификаций глицина [8], L- и DL-серина [9], глицилглицина [23] водородные связи C—H...O также не наблюдали. Единственный значительный сдвиг в область больших частот полосы поглощения $\rho(\text{CH}_2)$ в ИК спектрах α -глицина при понижении температуры был связан с сокращением расстояний между группами CH_2 соседних двойных слоев в структуре [8].

Изменения ИК спектров в области фазовых переходов, обнаруженных ранее другими методами. Особый интерес представляло проанализировать изменения в ИК спектрах в интервалах температур, в которых для L- и DL-цистеина другими методами исследования были обнаружены аномалии или фазовые переходы.

Так, в ромбическом L-цистеине, как уже отмечалось выше, тиольная группа в силу своей разупорядоченности образует два типа контактов (водородных связей). При понижении температуры наблюдали смену типа водородных связей (S—H...S и S—H...O на S—H...S) методом рентгеноструктурного анализа (при 30 К имели место только контакты S—H...S [20]). Фазовый переход "порядок—беспорядок" наблюдали методом адиабатической калориметрии при температуре около 70 К при нагревании образца, изначально охлажденного до более низкой температуры, причем величина эффекта и точное значение температуры, при котором он наблюдался, сильно зависели от того, до какой температуры было произведено первоначальное

охлаждение образца (чем ниже первоначальная температура, тем заметнее эффект при последующем нагревании) [43, 44].

В наших ИК спектроскопических экспериментах при варьировании температуры мы видим изменения в спектрах L-цистеина (доминирование полосы поглощения, относящейся к валентным колебаниям контакта S—H...S, начиная с 200 К и ниже; скачкообразное изменение частоты колебаний групп СН и СН₂— при понижении температуры до 150 К для $\tau(\text{CH}_2)$ и до 200 К для $\rho(\text{CH})$). Каких-либо особенностей в изменении доступных для измерения частот колебаний карбоксильной, а также аминокрупп в этом температурном диапазоне не наблюдали. Данные спектроскопии КР [45] согласуются с данными ИК спектроскопии. По данным рентгеноструктурного анализа в области температур около 200 К наблюдается минимум на кривой зависимости параметра ячейки *b* от температуры [43].

В случае DL-цистеина при охлаждении кристаллов до температуры между 250 и 240 К методом спектроскопии КР наблюдали фазовый переход с разрушением кристалла, сопровождающийся большим гистерезисом (обратное превращение при температуре около 310 К) [45], что согласуется и с результатами исследования данной системы методом адиабатической калориметрии [46]. В то же время в ИК спектрах DL-цистеина никаких аномалий во всем исследованном интервале температур от 83 до 333 К при многократном повторении циклов "охлаждение—нагрев" выявлено не было.

Таким образом, система L- и DL-цистеин может служить наглядным примером того, что чувствительность разных методов исследования к изменениям динамики отдельных функциональных групп и соответствующим им структурным искажениям и энергетическим изменениям может быть очень различной. Это обусловлено тем, что движения разных групп активируются в разных температурных диапазонах и характеризуются различным временным масштабом. Некоторые динамические изменения не приводят к заметному изменению энергии системы и не фиксируются даже чувствительными калориметрическими методами; не все динамические изменения проявляются в изменении средних положений атомов, фиксируемых рентгеноструктурным анализом. Еще одна характерная особенность кристаллических аминокислот, имеющая большое значение для функционирования состоящих из аминокислотных остатков биополимеров, состоит в том, что существенные изменения динамики разных функциональных групп могут происходить при разных температурах, как это наблюдалось в случае L-цистеина для колебаний групп NH₃—СН, СН₂, SH. Ранее аналогичный эффект наблюдали для L-серина (на примере групп ОН и NH₃) [10].

ВЫВОДЫ

1. Методика приготовления образцов влияет на ИК спектры L- и DL-цистеина. В основном отличия наблюдаются в относительной интенсивности полос поглощения и в положении их максимумов (смещения достигают 8 см⁻¹). Использование матрицы КВг для регистрации ИК спектров влияет на водородные связи в кристаллах L- и DL-цистеина.

2. ИК спектры L- и DL-цистеина при комнатной температуре существенно различаются во всей измеренной области, что позволяет достоверно различать кристаллические формы L- и DL-цистеина по ИК спектрам. Наибольшие отличия наблюдаются в значениях частот колебаний групп NH₃⁺, CO₂⁻ и SH, участвующих в образовании водородных связей.

3. На основании изменений в ИК спектрах колебаний функциональных групп и скелета в интервале температур 333—83 К можно заключить, что при понижении температуры в структурах L- и DL-цистеина происходит упрочнение водородных связей, в том числе образованных тиольными группами.

4. Каких-либо особенностей в изменении частот колебаний тиольной, карбоксильной, а также аминокрупп в спектрах L- или DL-цистеина в исследованном температурном диапазоне не наблюдали; при понижении температуры наблюдали скачкообразное изменение частот колебаний $\rho(\text{CH})$ при ~200 К и $\tau(\text{CH}_2)$ при ~150 К (уменьшение и увеличение соответственно), которые оказались наиболее чувствительными к упорядочению ориентации и координации ти-

ольной группы в боковом радикале к акцептору протона (S или O) в межмолекулярной водородной связи.

5. Изменение частоты валентных колебаний тиольной группы при варьировании температуры для L- и DL-цистеина сильно различается. Для DL-цистеина данная полоса поглощения смещается в сторону низких частот на $\sim 3 \text{ см}^{-1}$. Для L-цистеина при комнатной температуре колебаниям данной группы отвечают две полосы поглощения, характеризующие наличие двух типов контактов S—H...S и S—H...O. С понижением температуры эти полосы поглощения претерпевают сильные смещения (на $\sim 10 \text{ см}^{-1}$), их интенсивность перераспределяется. На нижнем температурном пределе наших экспериментов (83 К) доминирует только одна узкая и интенсивная полоса при 2516 см^{-1} , отвечающая контакту S—H...S.

Работа выполнена при поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 49 и № 110, грантов Российского фонда фундаментальных исследований (05-03-32468), BRNE (NO-008-XI/BG6108 и RUX0-008-NO-06).

Авторы благодарят за помощь в проведении экспериментов А.Ф. Ачкасова, а также сотрудников, охарактеризовавших образцы дифрактометрически (к.х.н. Т.Н. Дребущак), при помощи измерения оптической активности (к.х.н. Н.А. Панкрушину), хроматографически (к.х.н. И.Н. Азарову), и к.ф.-м.н. А.П. Федотова за помощь в съемке ИК спектров образцов в таблетках KBr на приборе Infracum FT-801.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vinogradov S.N. // *Int. J. Peptide Protein Res.* – 1979. – **14**, N 4. – P. 281.
2. Suresh C.G., Vijayan M. // *Ibid.* – 1983. – **22**, N 2. – P. 129.
3. Boldyreva E.V. In: *Models, Mysteries, and Magic of Molecules* / Eds. J.C.A. Boeyens and J.F. Ogilvie. – Springer, 2007.
4. Майстер А. Биохимия аминокислот. – М.: Изд-во иностр. лит., 1961.
5. Lemanov V.V., Popov S.N., Pankova G.A. // *Solid State Phys.* – 2002. – **44**, N 10. – P. 1840.
6. Riechkoff K.E., Peticolas W.L. // *Science.* – 1965. – **147**. – P. 610.
7. Misoguti L., Bagnato V.S., Zilio S.C. et al. // *Opt. Mater.* – 1996. – **6**, N 3. – P. 147.
8. Чернобай Г.Б., Чесалов Ю.А., Бургина Е.Б. и др. // *Журн. структур. химии.* – 2007. – **48**, № 2. – С. 339. (*J. Struct. Chem.* – 2007. – **48**, N 2. – P. 332 – 339.)
9. Чесалов Ю.А., Чернобай Г.Б., Болдырева Е.В. // Там же. – 2008. – 49, № 4. – С. 655. (*J. Struct. Chem.* – 2008. – **49**, N 4. – P. 627 – 638.)
10. Kolesov B.A., Boldyreva E.V. // *J. Phys. Chem.* – 2007. – **111**. – P. 14387 – 14397.
11. Kerr K.A., Ashmore J.P. // *Acta Crystallogr.* – 1973. – **29B**. – P. 2124.
12. Kerr K.A., Ashmore J.P., Koetzle F. // *Ibid.* – 1975. – **31B**. – P. 2022.
13. Wolpert M., Hellwig P. // *Spectrochim. Acta.* – 2006. – **A64**. – P. 987.
14. Pawlukojc A., Leciejewicz J., Ramirez-Cuesta A.J., Nowicka-Scheibe J. // *Ibid.* – 2005. – **61A**. – P. 2474.
15. Luger P., Weber M. // *Acta Crystallogr.* – 1999. – **55C**. – P. 1882.
16. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963.
17. Marques M.P.M., Amorim da Costa A.M., Ribeiro-Claro P.J.A. // *Phys. Chem.* – 2001. – **105A**. – P. 5292.
18. Цундель Г. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие. Исследование полиэлектролитов методом инфракрасной спектроскопии. – М.: Мир, 1972.
19. Jarmelo S., Reva I., Carey P.R., Fausto R. // *Vibration. Spectr.* – 2007. – **43**. – P. 395.
20. Moggach S.A., Clark S.J., Parsons S. // *Acta Crystallogr.* – 2005. – **61E**. – P. o2739.
21. Накамото К. ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. – М.: Мир, 1991.
22. Kakihana M., Nagumo T., Okamoto M., Kakihana H. // *J. Phys. Chem.* – 1987. – **91**. – P. 6128.
23. Чесалов Ю.А., Чернобай Г.Б., Болдырева Е.В. // *Журн. структур. химии.* – 2008. – **49**, № 6. – С. 1052.
24. Murlı C., Thomas S., Venkateswaran S., Sharma S.M. // *Physica B.* – 2005. – **364**. – P. 233.
25. Moreno A.J.D., Freire P.T.C., Melo F.E.A. et al. // *J. Raman Spectroscop.* – 2004. – **35**. – P. 236.
26. Wang C.H., Storms R.D. // *J. Chem. Phys.* – 1971. – **55**. – P. 3291.
27. Wang R.D., Storms R.D. // *Ibid.* – P. 5110.
28. Barthes M., Vik A.F., Spire A. et al. // *J. Phys. Chem.* – 2002. – **A106**. – P. 5230.
29. Forss S. // *Raman Spectroscop.* – 1982. – **12**, N 3. – P. 266.
30. Barthes M., Bordallo H.N., Denoyer F. et al. // *Eur. J. Phys. B.* – 2004. – **37**. – P. 375.

31. *Murli C., Sharma S.M., Karmakar S., Sikka S.K.* // *Physica B.* – 2003. – **339**. – P. 23.
32. *Murli C., Vasanthi R., Sharma S.M.* // *Chem. Phys.* – 2006. – **331**. – P. 77.
33. *Freire P.T.C., Melo F.E.A., Mendes Filho J. et al.* // *Vibr. Spectroscop.* – 2007. – **45**(2). – P. 99 – 102.
34. *Bordallo H.N., Kolesov B.A., Boldyreva E.V., Juranyi F.* // *J. Amer. Chem. Soc. (Commun.)*. – 2007. – **129** (36). – P. 10984 – 10985.
35. *Moggach S.A., Allan D.R., Morrison C.A. et al.* // *Acta Crystallogr.* – 2005. – **B61**. – P. 58 – 68.
36. *Kolesnik E.N., Goryainov S.V., Boldyreva E.V.* // *Doklady Phys. Chem.* – 2005. – **404**. – P. 61 – 64 (Rus.), or 169 – 172 (Engl.).
37. *Boldyreva E.V., Sowa H., Seryotkin Yu.V. et al.* // *Chem. Phys. Lett.* – 2006. – **429**. – P. 474 – 478.
38. *Dawson A., Allan D.R., Belmonte S.A. et al.* // *Cryst. Growth Design.* – 2005. – **5**, N 4. – P. 1415.
39. *Weissbuch I., Popovitz-Biro R., Lahav M., Leiserowitz L.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2005. – **11**, N 10. – P. 3039.
40. *Jeffrey G.A.* *An Introduction to Hydrogen Bonding.* – UK: Oxford University Press, 1997.
41. *Derewenda Z.S., Lee L., Derewenda U.J.* // *Mol. Biol.* – 1995. – **252**. – P. 248.
42. *Anfinsen C.B., Edsall J.T., Richard F.M.* // *Advanc. Protein Chem.* – 1986. – **86**. – P. 370.
43. *Paukov I.E., Kovalevskaya Yu.A., Drebuschak V.A. et al.* // *J. Phys. Chem. B. Lett.* – 2007. – **111** (31). – P. 9186 – 9188.
44. *Paukov I.E., Kovalevskaya Yu.A., Boldyreva E.V.* // *J. Therm. Anal. Calorimetry.* – 2008. – **93**, N 2. – P. 423.
45. *Kolesov B.A., Minkov V.S., Boldyreva E.V. et al.* // *J. Phys. Chem. B.* – DOI: 10.1021/jp804/42 c.
46. *Paukov I.E., Kovalevskaya Yu.A., Boldyreva E.V.* // *J. Therm. Anal. Calorimetry.* – 2008, accepted.