

Влияние хлороформа на состояние воды, адсорбированной сывороточным альбумином

О. В. Нечипор, В. М. Гунько, В. Н. Барвинченко, В. В. Туров

Институт химии поверхности НАН Украины
Ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

isc-sec@i12.com

Методом ^1H ЯМР спектроскопии с вымораживанием жидкой фазы изучено строение гидратной оболочки лиофилизированного и сорбированного на поверхности высокодисперсного кремнезема сывороточного альбумина человека, находящегося в слабополярном растворителе (хлороформе) или при его добавлении к гидратированной системе. Показано, что влияние хлороформа может приводить к изменению объемов внутренних областей белковой глобулы, характеризующихся различной гидрофильностью и заполненных структурированной водой, которая не замерзает при $T < 273\text{ K}$.

Ключевые слова: вода, сывороточный альбумин человека, высокодисперсный кремнезем, хлороформ, ^1H ЯМР спектроскопия.

Введение. Сывороточный альбумин человека (САЧ) является одним из основных и наиболее изученных белков плазмы крови [1—5]. В водной среде молекулы альбумина имеют форму деформированного сфероида, размеры которого зависят от значения pH. Полости глобулы заполнены водой [6]. Благодаря близости к поверхности белковой молекулы практически вся вода внутри глобулы испытывает возмущающее влияние полипептидных групп и аминокислотных остатков [6] и, следовательно, является связанной, что проявляется в снижении температуры замерзания. В полостях белковой молекулы вода может находиться в гидрофобном или гидрофильном окружении [7]. Гидратация САЧ осуществляется за счет формирования водородных связей молекул воды с полярными функциональными группами белка и ван-дер-ваальсовыми силами, ответственных за гидрофобные взаимодействия, при контактах с неполярными группами. Вопросы гидрофобной и гидрофильной гидрата-

ции белков подробно рассмотрены в работах [8—11]. Влияние гидрофобных фрагментов на связанную воду может проявляться в необычных свойствах системы. Так, на кривой зависимости плотности раствора альбумина от его концентрации в области малого содержания белка регистрируется минимум плотности, который связывают с гидрофобным эффектом [12].

Исследование закономерностей взаимодействия белковых макромолекул с компонентами водно-органических смесей в последние годы вызывает значительный интерес в связи с интенсивным развитием нового научного направления — ферментативного катализа в органических средах с низким содержанием воды [13]. При этом установлено, что вода играет ключевую роль в формировании структуры белков и их функционировании как в водном [14], так и в низководном органическом окружении [13, 15, 16]. Изучение закономерностей взаимодействия белков с водой в органическом окружении может способствовать созданию новых эффективных биокаталитических систем.

Можно ожидать, что слабополярные органические растворители будут сильно влиять на гидратацию САЧ [17, 18]. В результате лиофильного высушивания белка его конформация практически не меняется [19] по сравнению с нативной, однако добавление слабополярных молекул может вызывать изменение соотношения объемов внутренних полостей белковой глобулы, гидратированных по механизмам гидрофобной и гидрофильной гидратации [7—9].

Внесение белка в среду органического растворителя приводит к образованию гетерогенных систем, которые трудно исследовать с помощью оптических методов, поэтому целесообразно такие системы САЧ изучать калориметрическими методами [16, 20], с помощью ИК спектроскопии [16] и ^1H ЯМР спектроскопии.

Настоящая работа посвящена изучению строения гидратной оболочки лиофилизированного и сорбированного на поверхности высокодисперсного кремнезема САЧ в среде слабополярного органического растворителя — хлороформа или при его добавлении к гидратированной системе.

Материалы и методы. В работе использовали лиофилизированный САЧ («Биофарма», Украина), в котором содержание мономерной формы превышало 95 %. Дейтерированный хлороформ (CDCl_3) содержал 99,9 % изотопа дейтерия. В процессе приготовления образцов к навеске порошка САЧ (70—100 мг) добавляли фиксированную порцию дистиллированной воды (5—10 мг) при непрерывном встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре для равномерного распределения в объеме. Затем к образцам добавляли 10—300 мг дейтерированного органического растворителя и после установления равновесия (15 мин) образец помещали в датчик ЯМР спектрометра. Дейтерированный хлороформ использовали для того, чтобы сигнал протонов органической добавки не изменял интенсивности сигнала протонов связанной воды.

Использовали высокодисперсный кремнезем (ВДК) А-300 с удельной поверхностью около $300 \text{ м}^2/\text{г}$ (Экспериментальный з-д при Ин-те химии поверхности НАН Украины). К 2 г ВДК добавляли 200 мл 0,5 %-го раствора САЧ и проводили адсорбцию в течение 2 ч при постоянном перемешивании, затем центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин при температуре 20 ± 1 °С. Для удаления свободного белка осадок промы-

вали дистиллированной водой до исчезновения полосы поглощения, характерной для белка в электронных спектрах. Затем суспензию центрифугировали снова, и полученный осадок высушивали при комнатной температуре. Количество адсорбированного альбумина находили по разности исходной и равновесной концентрации САЧ в растворе после контакта с ВДК. Концентрацию белка в исходном и равновесном растворах определяли спектрофотометрически по поглощению при $\lambda = 280 \text{ нм}$ (характеристическая полоса САЧ), используя спектрофотометр Specord M-40 («Karl Zeiss», Австрия). В результате получены образцы кремнезема с содержанием белка 60 мг на 1 г ВДК, которые исследовали в средах (воздух, вода и хлороформ в различных соотношениях).

Спектры ЯМР записывали на спектрометре Bruker WP-100 SY. Для получения ^1H ЯМР спектров использовали 90° зондирующий импульс. Температуру в датчике регулировали термодатчиком Bruker VT-1000. Воспроизводимость интенсивности ^1H ЯМР сигнала составляла ± 10 % и для температуры ± 1 К. Спектры незамерзающей воды измеряли после охлаждения образца до 190—200 К [21—25]. Сигнал воды, входящей в состав льда (так же, как и протонов макромолекул), не вносил вклада в регистрируемый ^1H ЯМР сигнал ввиду малых времен ($\sim 10^{-6}$ с) поперечной релаксации протонов в твердых телах.

Измерения проводили с использованием стандартных ЯМР ампул (5 мм в диаметре), содержащих 70—300 мг вещества. Величину химических сдвигов протонного резонанса связанной воды определяли относительно сигнала протонов CHCl_3 $\delta_{\text{H}} = 7,26$ м. д. Измеряли температурные зависимости интегральных интенсивностей сигнала (I) незамерзающей воды, по которым рассчитывали зависимость концентрации незамерзающей воды ($C_{\text{ин}}$) от температуры (T), трансформируемую в зависимость изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) воды (в результате ее взаимодействия с белком и кремнеземом) от $C_{\text{ин}}$. Поскольку условием замерзания воды на межфазной границе белок/вода является равенство свободных энергий адсорбированной воды и льда [26], то понижение температуры замерзания ($273 - T$) адсорбированной воды определяет уменьшение свободной энергии воды, вызванное адсорбционными взаимодействиями ($\Delta G = G_0 - G$, где G_0 — свободная энергия льда при $T =$

= 273 К) [5]. Так как свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по линейному закону, то величину ΔG можно рассчитать по формуле [26]

$$\Delta G = 0,036 (273 - T). \quad (1)$$

Площадь под кривой $\Delta G(C_{инв})$ определяет величину межфазной энергии (γ_s) исследуемого образца в водной среде:

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{инв}^{max}} \Delta G dC_{инв}. \quad (2)$$

В этом выражении $C_{инв}^{max}$ — количество незамерзающей воды при $T \rightarrow 273$ К; K — константа, зависящая от типа использованных единиц в данном уравнении [23]. По зависимостям $\Delta G(C_{инв})$ рассчитывали параметры (концентрацию, свободную энергию Гиббса и величину межфазной энергии) сильно- и слабосвязанной воды. Под слабосвязанной водой понимают ту часть незамерзающей воды, свободная энергия которой лишь немного понижена за счет межмолекулярных взаимодействий с твердой поверхностью или адсорбированными органическими молекулами и которая замерзает при температуре около 273 К. Сильносвязанная вода может не замерзать даже при значительном охлаждении системы. Ее свободная энергия сильно понижена в результате взаимодействия с белком и кремнеземом [22, 23].

Содержание каждого типа воды ($C_{инв}^s$ и $C_{инв}^w$ для сильно- и слабосвязанной воды соответственно) и максимальные величины понижения свободной энергии для этих типов воды (ΔG_s и ΔG_w) можно получить линейной экстраполяцией линейных участков кривой $\Delta G(C_{инв})$ зависимостей к осям. Следует отметить, что есть два типа воды: 1) — это незамерзающая фракция ($C_{инв}$) и 2) — общее количество (C_{H_2O}). Часть незамерзающей воды, для которой $-\Delta G < 0,8$ кДж/моль может быть отнесена к слабосвязанной воде [21—25].

В более узких порах вода замерзает при более низких температурах, что описывается уравнением Гиббса-Томпсона [27]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (3)$$

где $T_m(R)$ — температура плавления льда, локализованного в порах радиуса R ; $T_{m,\infty}$ — температура

плавления объемного льда; ρ — плотность твердой фазы; σ_{sl} — энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью; ΔH_f — объемная энтальпия плавления. Это уравнение можно использовать для вычисления распределения пор по размерам из температурной зависимости величины $C_{инв}$, полученной на основе метода ^1H ЯМР спектроскопии с послойным вымораживанием воды, для водных суспензий твердых тел или гидратированных биологических объектов [28], когда применение других методов анализа пористой структуры затруднительно.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены спектры ^1H ЯМР воды, связанной с САЧ при разных концентрациях дейтерохлороформа в диапазоне 0—46 % масс, при разных температурах. Концентрация воды для всех образцов была постоянной и равной 193 мг/г. В отсутствие хлороформа спектры представляют собой синглет, ширина которого с понижением температуры увеличивается от 1 до 20 кГц, а величина химического сдвига в точке максимальной интенсивности близка к 5 м. д. (сигнал 1), что совпадает с химическим сдвигом объемной воды [26]. Большая ширина сигнала адсорбированной воды обусловлена малой молекулярной подвижностью воды, связанной с молекулами САЧ [29]. При добавлении хлороформа на фоне широкого сигнала начинает проявляться более узкий сигнал с химическим сдвигом $\delta_H = 1,3$ м. д. (сигнал 2). Его интенсивность увеличивается с ростом концентрации хлороформа (C_{CDCl_3}). С понижением температуры интенсивность сигнала 2 остается постоянной.

Если величина C_{CDCl_3} достаточна для выделения хлороформа в отдельную фазу (рис. 2) (80 % масс в суспензии), то интенсивность сигнала 1 при $T < 275$ К становится заметно ниже, чем при такой же температуре в образцах с меньшим содержанием хлороформа (рис. 1), а интенсивности сигналов 1 и 2 сближаются. Спектральные характеристики сигнала 2 практически не зависят от температуры. Как видно из данных рис. 2, сигнал 2 наблюдается даже в том случае, когда замерзает основная часть жидкого хлороформа.

Величина химического сдвига воды определяется двумя основными факторами — прочностью водородных связей и средним числом водородных связей на одну молекулу воды [30, 31]. Расчеты показывают, что прочность водородных связей слабо зависит от количества молекул воды [25]. Мо-

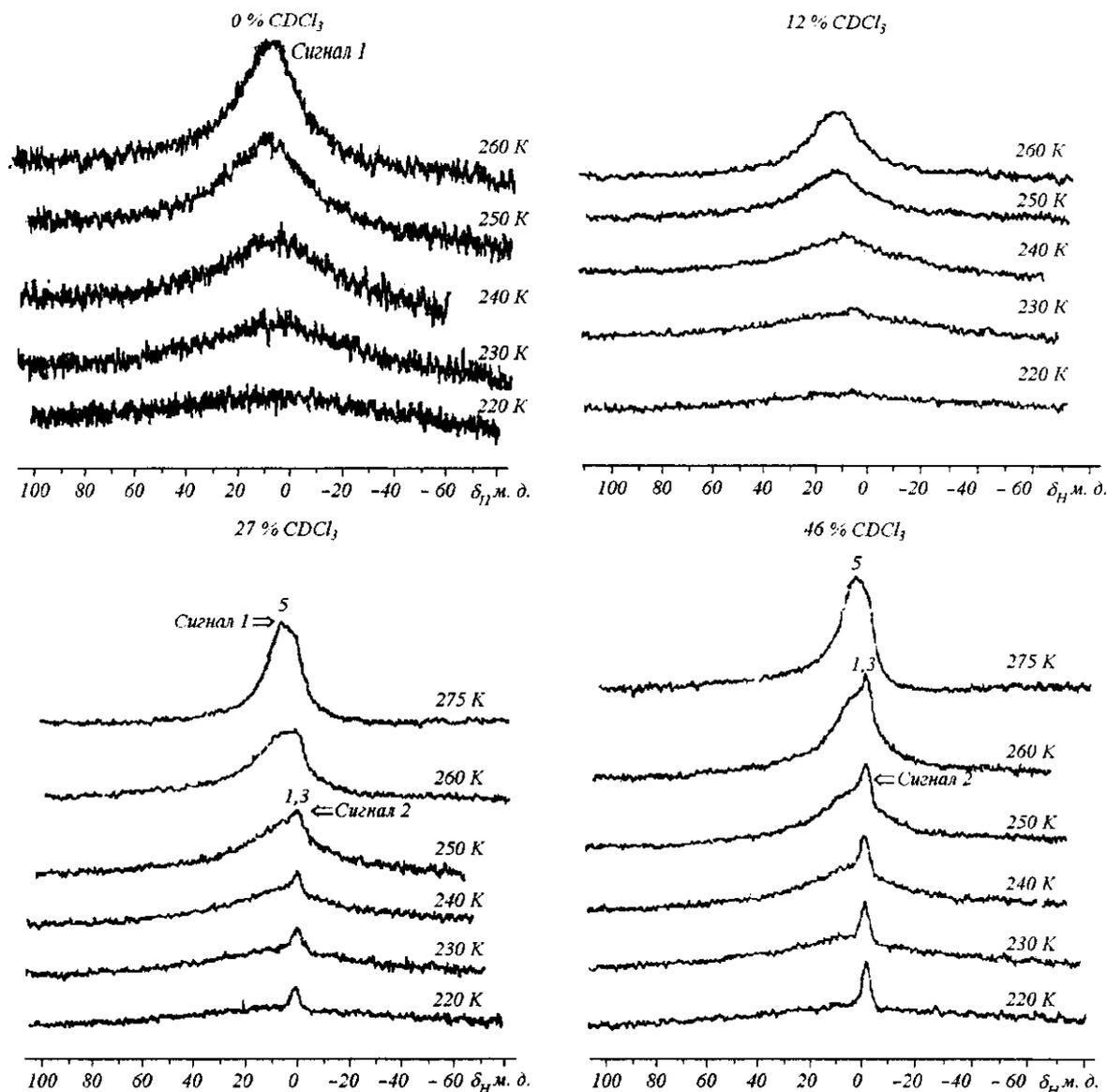


Рис. 1. Влияние добавления хлороформа на форму спектров ¹H ЯМР воды, связанной с альбумином ($C_{H_2O} = 193$ мг/г)

лекулы воды, не участвующие в образовании водородосвязанных комплексов, имеют химический сдвиг $\delta_0 = 1,3-1,7$ м. д. [26]. Такая величина химического сдвига наблюдается для воды, растворенной в хлороформе, бензоле и других слабополярных растворителях [32]. Для льда, когда все молекулы воды имеют по четыре водородные связи, химический сдвиг протонного резонанса составляет $\delta_2 = 7$ м. д. [33]. Исходя из этого данные рис. 1, 2 можно интерпретировать следующим образом: сигнал 1 относится к воде, входящей в состав полиассоциатов с сеткой водородных связей, аналогичной

таковой в объемной воде, а сигнал 2 соответствует молекулам воды, находящимся в слабоассоциированном состоянии. Ранее слабоассоциированные формы воды на межфазной границе гидратированных твердых тел с гидрофобной средой регистрировали для смесей аэросила с метилаэросилом [34] и триметилсилилированных аэросилов, в которых степень замещения поверхностных гидроксильных групп на триметилсилильные не превышала 50 % [35].

На рис. 3 приведены температурные зависимости концентрации незамерзающей воды (а) и рас-

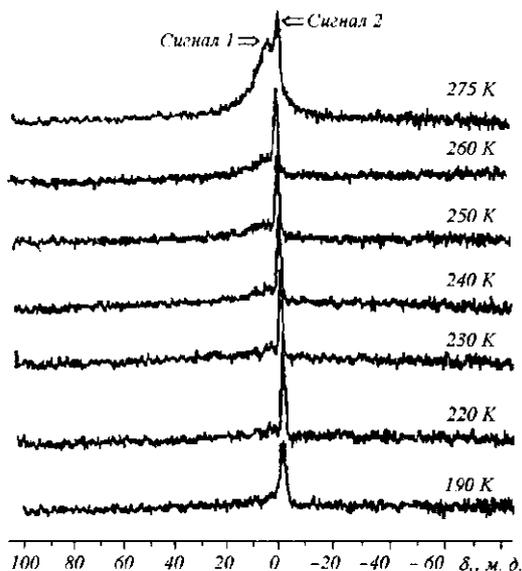


Рис. 2. Температурные изменения спектров ^1H ЯМР воды ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 193 \text{ мг/г}$), адсорбированной на САЧ при $C_{\text{CDCl}_3} = 80 \%$ масс

считанные на их основе зависимости $\Delta G(C_{\text{ув}})$ (*в*) для гидратированного САЧ с содержанием хлороформа 0—80 % масс. В области $\Delta G < -1 \text{ кДж/моль}$ на зависимостях $\Delta G(C_{\text{ув}})$ для порошков САЧ наблюдаются вертикальные участки, обусловленные незамерзающей водой при $T > 250 \text{ К}$ (рис. 3, *а*). В соответствии с критериями сильно- и слабосвязанной воды, приведенными выше, гидратированный САЧ содержит только сильносвязанную воду. В среде хлороформа наблюдается резкое уменьшение концентрации связанной воды при $T > 220 \text{ К}$ и переход части сильносвязанной воды в слабосвязанную (которая замерзает вблизи 273 К). На рис. 3, *б*, *г*, приведены аналогичные результаты для САЧ, адсорбированного на поверхности ВДК А-300. При этом, как видно из рисунка, превращения части сильносвязанной воды в слабосвязанную в среде хлороформа не наблюдается.

Можно предположить, что в гидратированных молекулах САЧ слабоассоциированная вода находится в структурных полостях, ограниченных гидрофобными группами. Благодаря структурным ограничениям или особенностям межмолекулярных взаимодействий в этих полостях молекулам воды термодинамически выгоднее существовать в слабоассоциированном состоянии.

Следует отметить, что химический сдвиг слабоассоциированной воды совпадает с таковым воды, растворенной в хлороформе [25]. Однако раствори-

мость воды в хлороформе не превышает 0,6 % при комнатной температуре и быстро уменьшается с понижением температуры. Концентрация слабоассоциированной воды в системе альбумин/вода/хлороформ на рис. 2 составляет 1,7 %, что на порядок больше предельной концентрации растворенной воды в хлороформе при $T = 190 \text{ К}$ [35]. Учитывая, что основная часть хлороформа при такой температуре замерзает, можно сделать вывод о том, что концентрация слабоассоциированной воды в хлороформе, не замерзшем из-за взаимодействия с молекулами САЧ, должна была бы достигать нескольких десятков процентов.

В процессе лиофильного высушивания большинство молекул САЧ сохраняют свою нативную глобулярную структуру, в которой с воздухом граничат преимущественно гидрофильные участки, легко адсорбирующие воду и формирующие гидратную оболочку белковых молекул в воздушной и водной средах [7]. При добавлении хлороформа его молекулы сосредотачиваются в основном на гидрофобных участках белка, не связанных с водой (или в гидрофобных полостях). В порошках гидрофобная и гидрофильная составляющие пространственно разделены и до определенной величины присутствие хлороформа незначительно влияет на гидратные свойства белковых молекул. Скачкообразное изменение характеристик воды, связанной с САЧ при изменении концентрации хлороформа (рис. 3, *а*, *в*), вероятно, обусловлено таким изменением нативной конформации белковых молекул, которое обеспечивает минимум свободной энергии системы при переходе от воздушной к слабополярной среде CDCl_3 . При этом более доступными для хлороформа становятся гидрофобные области молекул САЧ, в то время как гидрофильные центры изменяют свое пространственное расположение таким образом, чтобы обеспечивалась их минимальная свободная энергия в неполярной среде. Этот процесс сопровождается общим уменьшением гидратированности молекул САЧ (рис. 3, *а*, *в*) и, скорее всего, формированием дополнительных внутримолекулярных водородных связей между функциональными группами САЧ. Для САЧ, адсорбированного на поверхности ВДК (рис. 3, *б*, *г*), подобного эффекта не наблюдается, что, вероятно, обусловлено слабой конформационной лабильностью адсорбированного альбумина.

В соответствии с данными, приведенными на рис. 2, при $T < 240 \text{ К}$ в спектрах ^1H ЯМР воды для

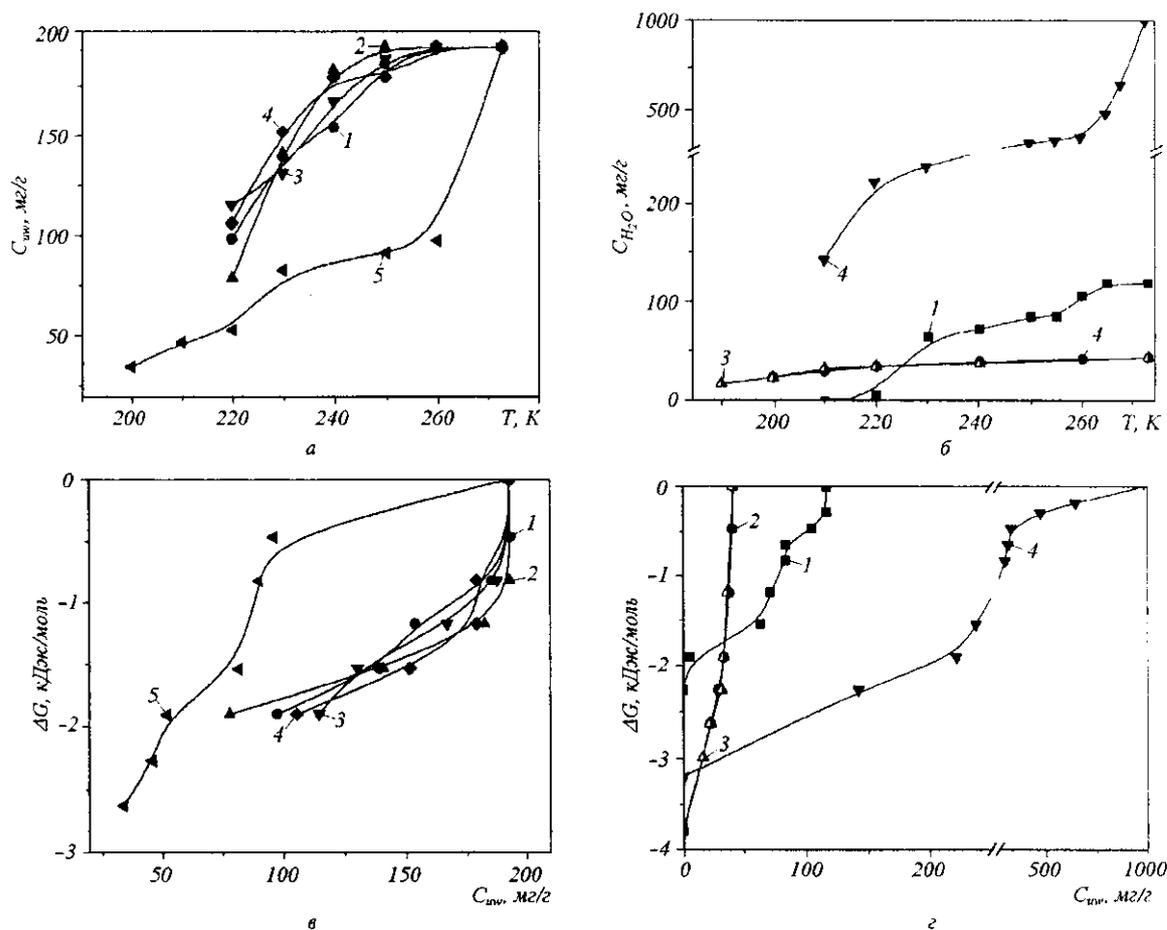


Рис. 3. Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды и зависимости свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды в системе САЧ/вода/хлороформ (а, в: 1 — 0 % CDCl_3 ; 2 — 12 % CDCl_3 ; 3 — 27 % CDCl_3 ; 4 — 46 % CDCl_3 ; 5 — 80 % CDCl_3) и (САЧ—ВДК)/вода/хлороформ (б, г: 1 — 117,67 мг/г в CDCl_3 ; 2 — 41,9 мг/г в CDCl_3 ; 3 — 41,9 мг/г в воздухе; 4 — в воде) ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 193$ мг/г) при содержании CDCl_3 0—80 % масс

суспензии САЧ в CDCl_3 наблюдается только сигнал 2. Концентрация связанной воды, ответственной за этот сигнал, составляет 80 мг/г (рис. 3, а). Поскольку молекулы хлороформа способны сольватировать гидрофобные группы молекул САЧ, то, по-видимому, в гидрофобных полостях молекул САЧ присутствуют как молекулы воды, так и хлороформа. Учитывая большое количество слабоассоциированной воды, можно ожидать, что вода и хлороформ внутри гидрофобных областей белковой глобулы способны образовывать концентрированный раствор воды в хлороформе. То есть свойства воды, участвующей в гидрофобной гидратации, сильно отличаются от свойств объемной воды, структурированной сеткой водородных связей.

В таблице представлены характеристики слоев связанной воды (концентрация, свободная энергия

Гиббса, величина межфазной энергии) и концентрация хлороформа для всех изученных систем. Как видно, в гидратированном альбумине с добавлением CDCl_3 величина межфазной энергии слабо зависит от концентрации CDCl_3 до образования сплошной среды хлороформа, затем скачком уменьшается за счет превращения части сильносвязанной воды в слабосвязанную. Если же альбумин адсорбирован на поверхности кремнезема, межфазные энергии на воздухе и в среде хлороформа совпадают. В среде хлороформа слабосвязанная вода не регистрируется даже в том случае, когда $C_{\text{H}_2\text{O}}$ увеличивается вдвое.

На рис. 4 приведены распределения по радиусам пор ($\text{PSD}_{\text{нв}}$) концентрации незамерзающей воды (внутренних полостей, заполненных незамерзающей водой) для гидратированного САЧ в присут-

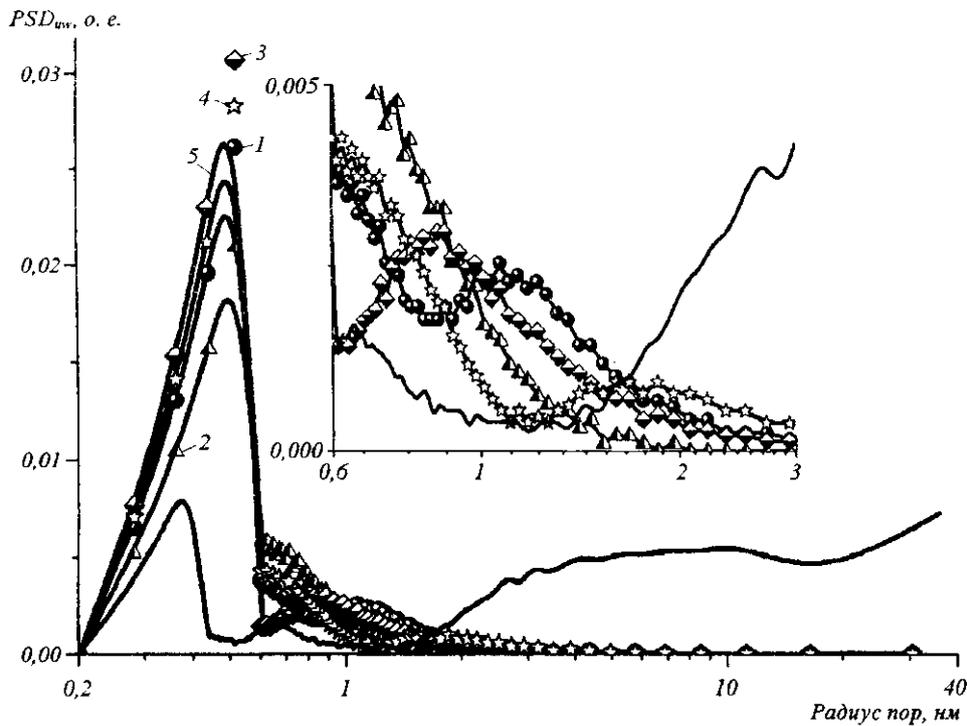


Рис. 4. Зависимость распределения по размерам полостей, заполненных незамерзающей водой, от содержания хлороформа в гидратированных порошках САЧ и его суспензиях: 1 — 0 % масс CDCl_3 ; 2 — 12 % CDCl_3 ; 3 — 36 % CDCl_3 ; 4 — 72 % CDCl_3 ; 5 — 80 % CDCl_3

ствии CDCl_3 . В исходном САЧ на зависимости $\text{PSD}_{\text{ow}}(r)$ регистрируются два максимума. Один отвечает радиусу пор $r = 0,35$ нм, а второй — $r = 1$ нм. С ростом концентрации хлороформа первый из этих максимумов увеличивается и несколько сдвигается в область больших значений r . В среде хлороформа происходит скачкообразное изменение формы кривой распределения. Интенсивность максимума при $r = 0,35$ нм уменьшается в несколько раз и появляются новые максимумы при $r = 0,8$ и 8 нм. Вероятно, в том случае, когда гидратированный альбумин находится в исходном состоянии или при относительно небольших добавках хлороформа, основная часть воды сосредоточена в микрополостях с радиусом $r = 0,35$ нм, сформированных гидрофильными участками белковой молекулы, с которыми молекулы воды могут образовывать прочные водородные связи. Под влиянием хлороформа размер этих полостей несколько увеличивается. Очевидно, это вызвано конформационными изменениями белковой молекулы, стабилизирующими рост объема гидрофобных областей, в которых вода находится в слабоассоциированном состоянии, что проявляется в спектрах ^1H ЯМР в виде сигнала 2.

В случае, когда хлороформ образует непрерывную фазу, происходит такое изменение конформа-

ции молекул белка, при котором вода удаляется из узких гидрофильных областей во вновь образовавшиеся полости большего размера, но с меньшим количеством гидрофильных центров. Такая вода становится слабосвязанной (в данном случае с САЧ), поскольку уменьшается ее взаимодействие с границей раздела фаз, но остается сильноассоциированной, так как формирует сетку водородных связей с другими молекулами воды. Часть воды остается в гидрофобных областях с радиусом $r = 0,35$ нм и, следовательно, остается сильносвязанной (испытывает сильное возмущающее действие со стороны поверхности), но слабоассоциированной (имеет химический сдвиг $\delta_H = 1,4$ м. д.). Это особое состояние воды стабилизируется средой слабополярного дейтерохлороформа. Вероятно, необходимым условием для перехода воды в слабоассоциированное состояние является наличие на поверхности или в окружающем пространстве достаточного числа гидрофобных участков, взаимодействующих с молекулами воды только по дисперсионному механизму, и пространственных ограничений, препятствующих формированию трехмерной сетки водородных связей. Адсорбция САЧ на поверхности кремнезема резко уменьшает конформационную лабильность молекул САЧ и, как следствие, объем внутренних полостей, в которых возможна гидро-

Характеристики слоев связанной воды (концентрация (C_{H_2O}), свободная энергия Гиббса (ΔG^S) и величина межфазной энергии (γ_S)) в гидратированном и адсорбированном на поверхности кремнезема (ВДК) альбумине (САЧ)

Образец	СССД ₁₃ , % масс	ΔG^S , кДж/моль	C_{H_2O} , мг/г	$C_{H_2O}^W$, мг/г	γ_S , Дж/г
Гидратированный порошок САЧ	0	-2,7	193	0	19,6
	12	-2,25	193	0	19
	27	-3,2	193	0	22
	46	-2,7	193	0	21
	80	-3,5	193	90	13
САЧ/ВДК	0	-2,25	42	0	6
	80	-3,7	42	0	7
	80	-3,7	118	0	8
	0	-3,25	5000	500	45

фобная гидратация белковой молекулы в слабополярной среде.

Выводы. Гидратированный САЧ содержит только сильноассоциированную воду с химическим сдвигом $\delta_H = 5$ м. д., адсорбированную по механизму гидрофильной гидратации. В присутствии слабополярных молекул хлороформа в спектрах 1H ЯМР воды, адсорбированной альбумином, отдельно наблюдаются сигналы воды, адсорбированной по механизмам гидрофобной и гидрофильной гидратации. Концентрация слабоассоциированной воды ($\delta_H = 1,3$ м. д.) на порядок выше предельной концентрации растворенной воды в хлороформе при $T = 190$ К. Она возрастает с ростом концентрации хлороформа.

Показано, что под влиянием слабополярной среды хлороформа происходит изменение нативной конформации белковой глобулы, сопровождающееся частичной дегидратацией поверхности и значительным сокращением объемов внутренних полостей, связывающих воду по механизму гидрофильной гидратации.

Адсорбционное закрепление белковых молекул на поверхности кремнезема уменьшает их конформационную подвижность и в связи с этим для системы (САЧ—ВДК)/вода/хлороформ слабоассоциированная форма воды в спектрах 1H ЯМР не регистрируется.

O. V. Nechipor, V. M. Gun'ko, V. M. Barvinchenko, V. V. Turov

The influence of weakly polar solvent chloroform on the state of water adsorbed by serum albumin

Summary

The hydrate shell structure of dry human serum albumin and

albumin adsorbed on a surface of highly disperse silica in a weakly polar solvent (chloroform) or with addition of this solvent was studied by 1H NMR spectroscopy with layer-by-layer freezing out of a liquid phase. The influence of chloroform can result in changes in the ratio of volumes of internal regions of protein globule characterized by different hydration level and filled up with structured water unfrozen at $T < 273$.

Keywords: human serum albumin, highly disperse silica, chloroform, 1H NMR spectroscopy.

O. V. Nechipor, V. M. Gun'ko, V. M. Barvinchenko, V. V. Turov

Вплив хлороформу на стан води, адсорбованої сироватковим альбуміном

Резюме

Методом 1H ЯМР спектроскопії з виморожуванням рідкої фази вивчено будову гідратної оболонки ліофілізованого і сорбованого на поверхні високодисперсного кремнезему сироваткового альбуміну людини, що знаходиться в слабополярному розчиннику (хлороформі) або при його додаванні до гідратованої системи. Показано, що вплив хлороформу може спричинювати зміну об'ємів внутрішніх областей білкової глобули, які характеризуються різною гідрофільністю і заповнені структурованою водою, що не замерзає за температури $T < 273$ К.

Ключові слова: вода, сироватковий альбумін людини, високодисперсний кремнезем, хлороформ, 1H ЯМР спектроскопія.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чагер С. И. Транспортная функция сывороточного альбумина.—Бухарест: Из-во Академии наук СРСР, 1975.—184 с.
2. Principles of Biochemistry / Eds A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox.—Worth, 2004.—p.
3. Liu Y., Xie M.-X., Jiang M., Wang Y.-D. Spectroscopic investigation of the interaction between human serum albumin and three organic acids // Spectrochim. Acta A.—2005.—61.—P. 2245—2251.
4. Norde W., Giacomelli C. E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states // J. Biotechnol.—2000.—79.—P. 259—268.
5. Prat L. R., Pohorille A. Hydrophobic effects and modeling of biophysical aqueous solution interfaces // Chem. Rev.—2002.—102.—P. 2671—2692.

6. Кайяярйнен А. И. Динамическое поведение белков в водной среде и их функции.—Л.: Наука, 1980.—272 с.
7. Сузи Г. Структура и стабильность биологических макромолекул / Под ред. М. В. Волькенштейна.—М.: Мир, 1973.—584 с.
8. Tiwms J. K. Moisture content in proteins: its effects and measurement // J. Chromatogr. A.—1995.—705.—P. 115—127.
9. Pouliquen D., Gallois Y. Physicochemical properties of structured water in human albumin and gamma-globulin solutions // Biochimie.—2001.—83.—P. 891—898.
10. Robinson G. W., Cho C. H. Role of hydration water in protein unfolding // Biophys. J.—1999.—77.—P. 3311—3318.
11. Vogler E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces // Adv. Coll. and Interface Sci.—1998.—74.—P. 61—117.
12. Schade P., Klein H., Egry I., Adamovic X., Klii D. Hydrophobic volume effects in albumin solutions // J. Coll. and Interface Sci.—2001.—234.—P. 445—447.
13. Гладилин А. К., Левашов А. В. Стабильность ферментов в системах с органическими растворителями // Биохимия.—1998.—63.—С. 408—421.
14. Protein-solvent interaction / Ed. R. B. Gregory.—New York: Dekker, 1995.—191 p.
15. Griebenow K., Klibanov A. M. On protein denaturation in aqueous-organic mixture but not in pure organic solvents // J. Amer. Chem. Soc.—1996.—118.—P. 11695—11700.
16. Сироткин В. А., Соломонов Б. Н., Файзуллин Д. А., Федотов В. Д. Сорбция паров воды и ацетонитрила сывороточным альбумином человека // Журн. физ. химии.—2002.—76.—С. 2255—2262.
17. Sirotkin V. A., Borisover M. D., Solomonov B. N. Heat effects and water adsorption by human serum albumin on its suspension in water-dimethyl sulfoxide mixtures // Thermochim. Acta.—1995.—256.—P. 175—183.
18. Sirotkin V. A., Borisover M. D., Solomonov B. N. Effect of chain length on interactions of aliphatic alcohols with suspended human serum albumin // Biophys. Chem.—1997.—69.—P. 239—248.
19. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии.—М.: Мир, 1980.—582 с.
20. Сироткин В. А., Королев Д. В. Тепловые эффекты дегидратации сывороточного альбумина человека в различных органических растворителях // Журн. физ. химии.—2005.—79, № 2.—С. 352—358.
21. Gun'ko V. M., Zarko V. I., Turov V. V., Leboda R., Chibowski E. Distribution effect of the second phase in disperse silica/X oxides (X = Al₂O₃, TiO₂, GeO₂) on their surface properties // Langmuir.—1999.—15.—P. 5694—5702.
22. Turov V. V., Leboda R. Application of ¹H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbens // Adv. Coll. and Interface Sci.—1999.—79.—P. 173—211.
23. Turov V. V., Leboda R. Chemical shifts of adsorbed molecules and free surface energy of carbon adsorbents by studied of ¹H NMR spectroscopy // Chemistry and physics of carbon / Ed. L. R. Radovic.—New York: Marcel Dekker, 2001.—27.—P. 67—124.
24. Turov V. V., Barvinchenko V. N. Structurally ordered layers of water at the SiO₂/Ice interface and influence of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them // Coll. Surface. B.—1997.—8.—P. 125—132.
25. Gun'ko V. M., Turov V. V. Structure of hydrogen bonds and ¹H NMR spectra of water at the interface of oxides // Langmuir.—1999.—15.—P. 6405—6415.
26. Химия поверхности кремнезема / Под ред. А. А. Чуйко.—К., 2001.—Ч. 1.—736 с.
27. Kondori K., Uoya Y., Ishikawa T. Effects of acetonitrile on adsorption behavior bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite particles // J. Coll. and Interface Sci.—2002.—252.—P. 269—275.
28. Гунько В. М., Туранская С. П., Нечипор О. В., Юхименко Е. В., Туров В. В., Чуйко А. А. Слабо ассоциированная вода в биологических объектах и на межфазной границе кремнезема // Химия, физика и технология поверхности.—К.: Наук. думка, 2006.—Вып. 11—12.—С. 397—430.
29. Манк В. В., Лебовка Н. И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в гетерогенных системах.—Киев: Наук. думка, 1988.—202 с.
30. Pople J. Proton resonance shifts in molecules with hydrogen bonds // Proc. Roy. Soc.—1957.—239.—P. 541—550.
31. O'Reilly D. E. Temperature and pressure dependence of the proton chemical shift in water // J. Chem. Phys.—1974.—61.—P. 1592—1593.
32. Gun'ko V. M., Turov V. V., Skubiszewska-Zieba J., Leboda R., Tsapko M. D., Palijczuk D. Structural characteristics of a carbon adsorbent and influence of organic solvents on interfacial water // Appl. Surf. Sci.—2003.—214.—P. 178—189.
33. Kinney D. R., Chaung I.-S., Maciel G. E. Water and the silica surface as studied by variable temperature high resolution ¹H NMR // J. Amer. Chem. Soc.—1993.—115.—P. 6786—6794.
34. Turov V. V., Mironiuk I. F. Adsorption layers of water on the surface of hydrophilic, hydrophobic and mixed silicas // Coll. and Surf. A.—1998.—134.—P. 257—263.
35. Turov V. V., Gun'ko V. M., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Gorbik S. P., Pakhlov E. M., Leboda R., Shulga O. V., Chuiko A. A. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // J. Coll. Interface Sci.—2005.—283.—P. 329—343.

УДК 541.183

Надійшла до редакції 29.03.06