

ФИЗИКА

В. Г. Манусаджян, Г. С. Саркисян, Н. П. Бажулина и Я. М. Варшавский

Применение метода инфракрасной спектроскопии к изучению коротких пептидов и их производных

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР Н. М. Кочаряном 3/1 1964)

В настоящее время большое внимание уделяется решению вопроса о молекулярном строении коротких пептидов, тесно связанного с проблемой структуры белка. Важное значение в связи с этим приобретают различные методы изучения структурных характеристик коротких пептидов и, в частности, физические методы выяснения порядка чередования аминокислотных остатков в молекулах этих соединений.

Инфракрасная спектроскопия дает ценные сведения о внутримолекулярных и межмолекулярных связях, однако имеющийся в литературе экспериментальный материал по ИК-спектрам коротких пептидов крайне ограничен (1-7).

Вопрос о возможности определения первичной структуры коротких пептидов по их ИК-спектрам в литературе вообще не рассматривался. В связи с этим в Институте радиационной и физико-химической биологии АН СССР, совместно с Сектором радиобиологии АМН СССР и Физико-технической лабораторией АН Армянской ССР, была проведена серия работ по исследованию молекулярной структуры некоторых ди- и трипептидов и их производных методом ИК-спектроскопии. Результаты этих работ будут изложены в нескольких сообщениях\*.

Общая цель, которую мы ставили перед собой, сводилась к рассмотрению следующих трех вопросов:

- 1) Получение и интерпретация отдельных полос поглощения на ИК-спектрах коротких пептидов и их производных.
- 2) Выяснение вопроса об участии водородных связей в образовании кристаллической структуры исследуемых соединений.
- 3) Выяснение возможности определения первичной структуры коротких пептидов по их ИК-спектрам.

В этой работе рассмотрены ИК-спектры коротких пептидов.

\* Выражаем благодарность Ю. Н. Чиргадзе за полезные советы и замечания.

Изучены ИК-спектры следующих ди- и трипептидов: глицил-глицина, глицил-*D*, *L*-аланина, глицил-*D*, *L*-серина, глицил-*D*, *L*-фенилаланина, глицил-*L*-тирозина, глицил-*L*-пролина, глицил-*D*, *L*-лейцина, *L*-лейцил-глицина, *D*, *L*-аланил-глицил-глицина и глицил-*L*-лейцил-*D*, *L*-валина. В качестве спектра сравнения был снят ИК-спектр сывороточного альбумина человека. Использовались препараты (Х. Ч.), полученные из Англии (фирма Л. Лайт), Венгрии (фирма Реонал) и ГДР, которые использовались без дополнительной очистки. Дейтерирование глицил-глицина и альбумина проводилось нами по методике Линдестром-Ланг (8)\*.

Для съемки спектров использовались мелкокристаллические порошки исследуемых веществ, диспергированные в вазелиновом масле и помещенные в виде тонкого слоя между пластинками из бромистого калия (1–2 мг вещества на  $\text{см}^2$ ). Спектры регистрировали при помощи двухлучевого прибора UR–10 (ГДР) в области  $1800\text{--}400\text{ см}^{-1}$  с точностью не хуже  $\pm 4,5\text{ см}^{-1}$ , а в областях  $2800\text{--}3100\text{ см}^{-1}$  и выше  $3100\text{ см}^{-1}$  не хуже  $\pm 7,6$  и  $\pm 12,2\text{ см}^{-1}$  соответственно. Для каждого из образцов спектры снимали по два раза, а для отдельных образцов по три-четыре раза.

Фотографии полученных ИК-спектров приведены на фиг. 1–2. Положения отдельных полос поглощения приведены в табл. 1.

Основные полосы поглощения в ИК-спектрах коротких пептидов обязаны своим происхождением колебаниям концевых  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$  и пептидных  $\text{—CONH—}$ ,  $\text{—CON—}$  группировок.

В область  $3600\text{--}3000\text{ см}^{-1}$  попадают валентные колебания  $\nu_{\text{as, s}}\text{ NH}_3^+$ ,  $\text{NH}$ -групп и кристаллогидратной воды  $\nu\text{OH}$ . Колебания  $\nu\text{NH}$  свободной группы появляются при частотах выше, чем  $3400\text{ см}^{-1}$ .

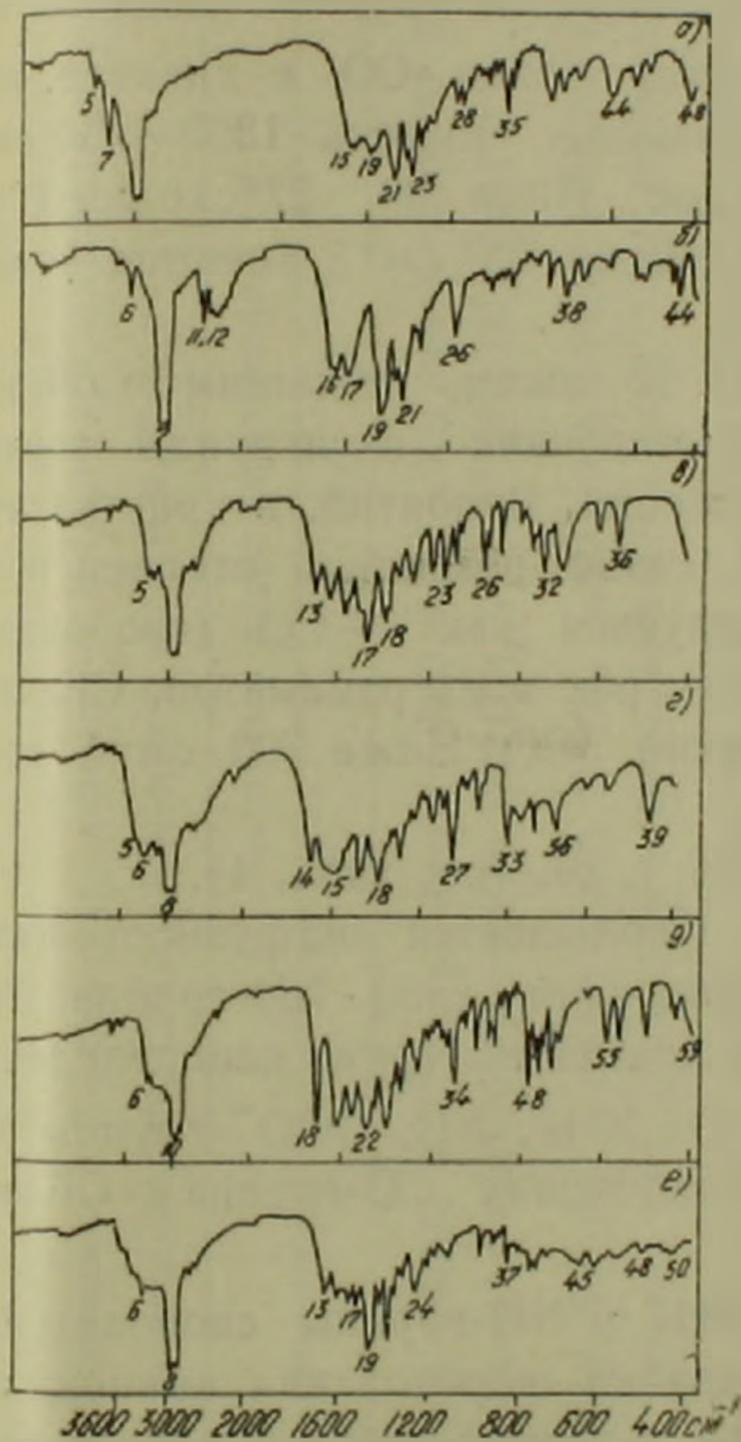
Связанная  $\text{NH}$ -группа дает несколько полос в области  $3400\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ . В диапазоне  $2100\text{--}2000\text{ см}^{-1}$  лежат полосы  $\text{NH}_3^+$ -колебаний. В диапазоне  $1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$  находятся частоты колебаний пептид I ( $\nu\text{CO}$ —свободная и связанная),  $\delta\text{NH}_3^+$  и  $\delta\text{OH}(\text{H}_2\text{O})$ . В области  $1600\text{--}1500\text{ см}^{-1}$  лежат колебания пептид II ( $\delta\text{NH}$ ,  $\nu\text{C—N}$ ) и  $\nu_{\text{as}}\text{COO}$ —(свободной и связанной). Область  $1350\text{--}700\text{ см}^{-1}$  включает в себя деформационные колебания концевых и пептидных групп, а также некоторые скелетные колебания. Эта область особенно интересна в связи с проблемой чередования аминокислотных остатков. Соотношение между числами  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CONH}(\text{CON})$  и  $\text{COO}^-$ -групп для дипептидов составляет 1:1:1, а для трипептидов — 1:2:1. Вазелиновое масло поглощает в области  $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ ,  $1500\text{--}1350\text{ см}^{-1}$  и  $\sim 750\text{ см}^{-1}$ .

Ниже несколько более подробно рассмотрены пики в изученных спектрах, пробная интерпретация которых приведена в табл. 1.

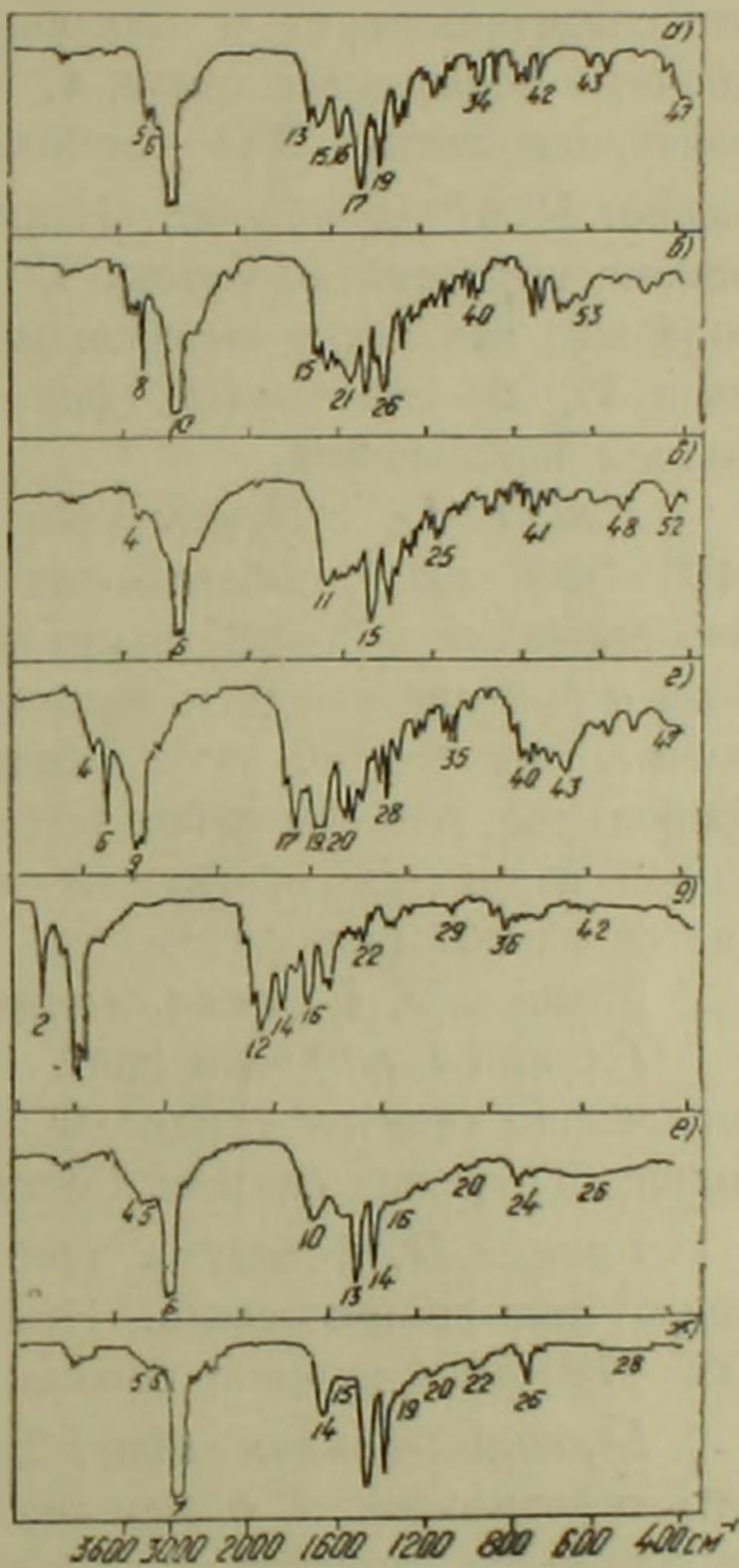
---

\* Выражаем благодарность Л. В. Абатурову за предоставление дейтерированных препаратов глицил-глицина и альбумина.

Глицил-глицин (Н), (D) (фиг. 1, а). Интенсивность пиков 5 и 6 (Н), а также пиков 7, 8, в связи с изотопным обменом, сильно уменьшается при дейтерировании, и их интерпретация не вызывает сомнения. Пики 10—13 (Н) наблюдаются во всех спектрах, и они характерны для ОН...О-колебаний связанной молекулы воды. В спектре дейтеропроизводного дипептида (фиг. 1, б) пики 10, 11 отнесены к  $\nu_{as}, \nu_s ND$ -колебаниям. Интерпретация пиков 15—20(Н) затруднительна,



Фиг. 1.



Фиг. 2.

т. к. сюда попадают  $\delta NH_3^+$ ,  $\delta NH$ ,  $\delta OH$ ,  $\nu_{as} COO^-$  и  $\nu CO$ -колебания. Пик 18 в спектре (Н) соответствует пик 17 в спектре (D); поэтому его следует отнести к  $\nu_{as} COO^-$ -колебаниям. Пик  $1670 \text{ см}^{-1}$  (15(Н), 16(D)) можно отнести к колебаниям  $\nu CO$  (пептид I). Молекулы глицил-глицина плотно упакованы, т. к. все валентные частоты, позволяющие судить об участии функциональных групп в образовании водородных связей, смещены в низкочастотную область.

Из трех пиков 24—26 (Н) только пик 25 остается в спектре (D) (пик 22). В этой области обычно поглощаются  $\nu_s COO^-$  и  $\delta_s NH_3^+$ -группы. Область  $1350-700 \text{ см}^{-1}$  после дейтерирования значительно меняется, из чего следует, что вклад колебаний NH-группы в этот

диапазон частот наиболее значителен. Эта область наиболее характерна для коротких пептидов. Деформационные колебания NH-группы наиболее чувствительны к дальнедействующим молекулярным полям из-за легкости протона и высокой лабильности водорода, связанного с азотом пептидной группы. Область  $700-400\text{ см}^{-1}$  почти не изменяется при дейтерировании.

*Глицил-D, L-аланин* (фиг. 1, в). Пики 5—7 лежат ниже  $3300\text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о способности групп  $\text{NH}_3^+$  и NH образовывать прочные водородные связи, т. к. пики 13 и 14 интерпретируются как колебания пептид  $\text{CO}$ —свободной и связанной группы. Сюда же попадают  $\delta\text{NH}_3^+$ -колебания. Наличие двух пиков  $\nu\text{CO}$  в спектре, возможно, обусловлено смесью D и L-аланина. Область  $1350-700\text{ см}^{-1}$  содержит ряд четко выраженных полос. Пики 26, 27 сходны с пиками 35, 36—гли-гли-(H) (фиг. 1, а). Ниже  $700\text{ см}^{-1}$  имеются четыре полосы поглощения.

*Глицил-D, L-серина* (фиг. 1, г). К пикам, лежащим в области  $3400-3200\text{ см}^{-1}$ , добавляются  $\nu\text{OH}$ -колебания оксигруппы серина. Это приводит к диффузности поглощения. Вероятно, в кристаллической структуре имеются водородные связи различной степени прочности. Пик  $\sim 1700\text{ см}^{-1}$  интерпретируется как  $\nu-\text{CO}$  (свободная). Любопытно, что он проявляется в спектрах всех рацематов. Сильный пик 27 находится в области колебаний  $\nu\text{CO}$ . Ниже  $700\text{ см}^{-1}$  появляется пик 39 ( $450\text{ см}^{-1}$ ).

*Глицил-D, L-фенилаланин* (фиг. 1, д), (см. табл. 1).

*Глицил-L-тирозин* (фиг. 1, е). Наблюдается диффузность пиков аналогично спектру глицил-D, L-серина (фиг. 1, г). NH-группа свободна; CO-группа связана. Состояние концевых групп неопределенно.

*Глицил-D, L-лейцил* (фиг. 2, а).  $\text{NH}_3^+$ , NH,  $\text{COO}^-$ -группы образуют водородную связь. Имеется свободная CO-группа. Область  $1350-700\text{ см}^{-1}$  хорошо проявлена.

*L-лейцил-глицин* (фиг. 2, б).  $\text{NH}_3^+$  и NH-группы свободны. Судить о возможности определения порядка чередования аминокислот на основании спектров лейцил-глицина и глицил-лейцина нельзя из-за оптической неравноценности образцов.

*Глицил-L-пролин* (фиг. 2, в). Выше  $3000\text{ см}^{-1}$  лежат колебания только  $\nu\text{NH}_3^+$ -группы. Спектр глицин-пролина значительно отличается от спектра пролил-глицина (2, а). То же самое следует ожидать от всех дипептидов, содержащих пролин.

*D, L-аланин-глицил-глицин* (фиг. 2, г), (см. табл. 1).

*Глицил-L-лейцил-D, L-валин* (фиг. 2, д). Область  $1350-700\text{ см}^{-1}$  проявлена недостаточно хорошо. Возможно это происходит из-за различий в характере деформационных колебаний двух пептидных групп, расположенных между неодинаковыми аминокислотными остатками.

Для того чтобы исследовать характер возможных усложнений спектра в области  $1350-700\text{ см}^{-1}$ , в которой расположены деформа-

Основные полосы поглощения в ИК-спектрах дипептидов  $\text{HN}_3^+\text{CH}(\text{R}_1)\text{CONHCH}(\text{R}_2)\text{COO}^-$   
и трипептидов:  $\text{HN}_3^+\text{CH}(\text{R}_1)\text{CONHCH}(\text{R}_2)\text{CONH}(\text{R}_3)\text{COO}^-$

№№ п/п	Соединения	$\text{R}_{1, 2, 3}$	Максимумы полос поглощения в $\text{см}^{-1}$
1	2	3	4
1a	Гли-гли (H)	—H, —H	3380(6), 3450(5) $\nu\text{NH}_3^+$ (связ.); 3300 (7), 3080 (8) $\nu_{\text{as, s}} \text{NH}$ (связ.), 1700 (18) $\nu_{\text{as, s}} \text{COO}^-$ (?); 1670 пептид I (связ.); 1580 (19) пептид II; 1320 (25) $\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ ; 920 (35) $\delta\text{NH}$ (?).
1б	Гли-гли (D)	.	3450 (4), 3362 (5) $\nu_{\text{as, s}} \text{NH}_3^+$ (связ.); 3300 (6) $\nu_{\text{as}} \text{NH}$ (связ.); 2485, 2440 (10, 11) $\nu_{\text{as}} \text{ND}$ ; 1670 (15) пептид I (связ.); 1600 (17) $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ (связ.); 1518 (22) $\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ ; 1175 (2269) пептид II (?).
1в	Гли-D, L-ала	--H, —CH <sub>3</sub>	3240 (5), 3180 (6) $\nu\text{NH}$ (CONH, $\text{NH}_3^+$ ?); 3080 (7) $\nu_{\text{s}} \text{NH}$ ; ~2000 (11) $\nu\text{NH}_3^+$ ; 1700(13) пептид I 1635(14) пептид I (связ.) $\delta\text{NH}_3^+$ (?); 1565 (15) пептид II, $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ ; 1325 (20) $\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ ; 945, 920 (26, 27) $\delta\text{NH}$ .
1г	Гли-D, L-сер	—H, —CH <sub>2</sub> —OH	2600—3150, $\nu\text{OH}$ , $\nu_{\text{as}} \text{NH}$ , $\nu\text{NH}_3^+$ (связ.); 3100 (7) $\nu_{\text{s}} \text{NH}$ ; 2050 (12) $\nu\text{NH}_3^+$ ; 1690 (14) пептид I (своб.); ~1600 (15) пептид I (?), $\delta\text{NH}_3^+$ (связ.) и $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ (своб. и связ.), пептид II; 1520 (16) $\delta\text{OH}$ (?); 1310 (21) $\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ ; 1145 (27) $\nu\text{C—OH}$ .
1д	Гли-D, L-фен	—H, —C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	3300 (6), $\nu_{\text{as}} \text{NH}$ (связ.); 3260—3000 (7—9), $\nu_{\text{as}} \text{NH}_3^+$ , $\nu_{\text{as}} \text{NH}$ , $\nu=\text{C—H}$ ; 1970 (15), $\nu\text{NH}_3^+$ ; 1700 (18) пептид I (своб.); ~1600 (19, 20), $\nu\text{NH}_3^+$ , $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ ; $\nu\text{C}=\text{C}$ (пл. кол.); 1515 (21) пептид II; 1320 (26) $\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ ; 1090 (34) $\delta=\text{C—H}$ .
1е	Гли-L-тир	—H, —CH <sub>2</sub> — —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	3325 (6) $\nu\text{NH}$ (своб.); 3600—3400 (4, 5) $\nu\text{OH}$ (своб. ?), $\nu\text{NH}_3^+$ (своб.); 1655 (13) пептид I (связ.) 1600 (14, 15) $\delta\text{NH}_3^+$ , $\nu\text{COO}^-$ , $\nu\text{C}=\text{C}$ ; 1555 (16) пептид II; 1270 (24) $\delta\text{OH}$ .
2a	Гли-D, L-лей	—H, —CH <sub>2</sub> CH— —(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3210 (5) $\nu_{\text{as}} \text{NH}$ , $\text{NH}_3^+$ ; 3080 (6) $\nu_{\text{s}} \text{NH}$ ; 1695 (13) пептид I (своб.); 1650 (14) пептид I (связ.), $\delta\text{NH}_3^+$ ; 1575 (15, 16) пептид II, $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ .

1	2	3	4
2б	L-лей-гли	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $-\text{H}$	3540 (6) $\nu_{\text{as}}\text{NH}_3^+$ ; 3450 (7) $\nu_{\text{s}}\text{NH}_3^+$ ; 3350 (8) $\nu_{\text{as}}\text{NH}$ ; 3200 (9) $\nu_{\text{s}}\text{NH}$ ; 2165 (13) $\nu\text{NH}_3^+$ ; 1700 (15) $\nu\text{CO}$ (своб.); 1680–1600 (16, 17, 18) $\delta\text{NH}_3^+$ , $\nu\text{CO}$ (связ.), возм. $\delta\text{OH}$ ; 1600–1500 (19, 20, 21) пептид II, $\nu\text{COO}^-$ ; 1300 (27) $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (?).
2в	Гли-L-про	$-\text{H}$ , $-(\text{CH}_2)_3$	3450 (4) $\nu_{\text{as}}\text{NH}_3^+$ ; 3100 $\nu_{\text{s}}\text{NH}_3^+$ ; 1670 (11) пептид I (связ.); 1625 (12) $\delta\text{NH}_3^+$ ; 1600–1500 $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ , $\delta\text{H}_2\text{O}$ , $\nu\text{CON}$ (пептид II).
2г	D, L-ала-гли-гли	$-\text{CH}_3-\text{H}$ , $-\text{H}$	3475 (4), 3400 (5) $\nu\text{NH}_3^+$ ; 3300 (6), 3100 (8) $\nu\text{NH}$ ; 2065 (13) $\nu\text{NH}_3^+$ ; 1700 (16) $\nu\text{CO}$ (своб.). 1665 (17) пептид I (связ.); 1635 (18) $\delta\text{NH}_3^+$ ; 1600–1500 (19, 20) $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ и пептид II.
2д	Гли-L-лей- -D, L-вал	$-\text{H}$ $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	3300 (2), 3100 (3) $\nu_{\text{as, s}}\text{NH}$ ; $\sim 2100$ (8) $\nu\text{NH}_3^+$ ; 1700 (10) $\nu\text{CO}$ (своб.); 1680–1600 (11, 12) пептид I (связ.), $\delta\text{NH}_3^+$ ; 1600–1500 (14, 15) пептид II, $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
2е	альбумин (H)	все аминокислоты, кроме аланина	3300 (4) $\nu\text{NH}$ ; 1660 (10) пептид I (связ.); $\sim 1550$ (11, 12) пептид II.
2ж	альбумин (D)	.	2500–2400 (10, 11) $\nu\text{ND}$ ; 1660 (14) пептид I (связ.); пептид II—смещается

ционные колебания пептидных групп (область „отпечатков пальцев“), при увеличении числа пептидных групп в молекуле представляло интерес изучить в качестве предельного случая спектр белка. С этой целью был получен спектр сывороточного альбумина человека (фиг. 2).

Из спектра альбумина (H) (фиг. 2, e) легко видеть, что область  $1350-700 \text{ см}^{-1}$  не имеет четко выраженных пиков. Изменения в этой области спектра при дейтерировании альбумина человека (фиг. 2, ж) не приводят к заметным изменениям кривой поглощения из-за диффузности этого участка спектра.

**Выводы.** 1. Получены ИК-спектры восьми (H) и одного (D) дипептидов, двух трипептидов (H), а также (H) и (D) альбумина. Проведена пробная интерпретация некоторых полос поглощения.

2. Рассмотрен вопрос об образовании водородных связей в кристаллических структурах исследованных пептидов. Возможно, что боковые группы аминокислот создают стерические препятствия, затрудняющие участие отдельных функциональных групп в образовании водородных связей.

3. Специфическая область  $1350-700 \text{ см}^{-1}$  в принципе может быть исследована для идентификации коротких пептидов. Однако по мере роста полипептидов цепочки идентификации с использованием ИК-спектров известных соединений в качестве эталонов сравнения становятся все более затруднительными.

ЦНИ физико-техническая лаборатория  
Академии наук Армянской ССР

Վ. Գ. ՄԱՆՈՒՍԱԶՅԱՆ, Գ. Ս. ՍԱՐԴՅՅԱՆ, Ն. Պ. ԲԱԺՈՒԼԻՆԱ ԵՎ Յ. Մ. ՎԱՐՇԱՎՍԿԻ

### Ինֆրակարմիր սպեկտրոսկոպիայի մեթոդի կիրառումը կարճ պեպտիդների և նրանց ածանցյալների ուսումնասիրման համար

Այս աշխատանքում շարադրված են ինֆրակարմիր սպեկտրոսկոպիայի միջոցով կարճ պեպտիդների սկզբնային ուսումնասիրման արդյունքները:

Ուսումնասիրված են դի և տրիպեպտիդների ինֆրակարմիր սպեկտրները:

Ցույց է արված, որ «մատների գրոշմների» յուրահատուկ տիրույթը  $1350-700 \text{ սմ}^{-1}$  հիմնականում կարող է օգտագործվել կարճ պեպտիդների իզոմերիապարզման համար: Սակայն, պոլիպեպտիդի շղթայի աճման հետ մեկտեղ, որպես էտալոն օգտագործվող հայտնի միացությունների իզոմերիապարզման ինֆրակարմիր սպեկտրների միջոցով ավելի դժվարանում է:

### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> Infrared absorption spectra, Index for 1945-1957, № V (1959). <sup>2</sup> Bull. Soc. Chim., France, 10, 1553-56 (1959). <sup>3</sup> J. Chem. Japan Pur. Chem. Soc., 80, 299-301 (1959). <sup>4</sup> J. Chem. Soc. Japan Pur. Chem. Soc., 80, 82-84 (1959). <sup>5</sup> H. Эленбоген, J. Am. Chem. Soc., 78, 363-372 (1956). <sup>6</sup> Гелмут Зан и Норман, La France, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 319, 143-150 (1960). <sup>7</sup> Ю. Н. Чиргадзе, Л. А. Грибов, Н. С. Андреева, Н. Е. Шецкевер, Журнал физической химии, 35, 754-760, (1961). <sup>8</sup> К. Линдестром-Ланг, J. Chem. Soc. Lond. Spec. Publ. № 2, 1 (1955).