

УДК 54.03

М.П. Евстигнеев, профессор, д-р физ.-мат. наук*Севастопольский национальный технический университет.**ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053**E-mail: max_evstigneev@mail.ru***ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КАЛИБРОВОЧНЫХ СИГНАЛОВ TSP И HDO ДЛЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНОГО ЯМР**

Рассмотрен вопрос о замене стандартного калибровочного соединения ТМА для исследования комплексообразования биомолекул методом ЯМР. Показано, что соединение TSP может служить альтернативой ТМА, без перекрытия области сигналов метильных протонов и протонов сахаров ДНК. Получены аппроксимирующие выражения для корректировки температурной зависимости сигналов TSP и HDO.

Ключевые слова: калибровочный сигнал, ЯМР спектроскопия, TSP, HDO

Введение

В практике ЯМР исследований химические сдвиги исследуемых ядер обычно принято измерять по отношению к химическому сдвигу некоторого эталонного вещества, добавляемого непосредственно в раствор с изучаемым соединением. Данная процедура называется калибровкой спектра. Необходимость в использовании эталонного сигнала обусловлена двумя причинами. Во-первых, резонансная частота любого ЯМР спектрометра, включая современные модели, всегда нестабильна. Уровень нестабильности частоты в типичном диапазоне ЯМР частот – сотни мегагерц – составляет порядок сверхтонкого расщепления спектров ЯМР, т.е. может достигать 0.1 Гц, что может негативно сказаться на результатах анализа скалярного спин-спинового взаимодействия. Во-вторых, в соответствии со стандартным определением:

$$\omega_{\text{рез}} = \gamma_{\text{я}} \cdot B_0$$

резонансная частота $\omega_{\text{рез}}$ прямо пропорционально зависит от величины индукции магнитного поля прибора B_0 через гиромагнитное отношение $\gamma_{\text{я}}$ для исследуемого типа ядер. Это означает, что на разных приборах результаты измерения химических сдвигов одного и того же соединения будут различны, что очень неудобно при проведении сравнительного анализа.

В качестве эталонных соединений, применяемых в биомолекулярном ЯМР, наибольшее распространение в настоящее время нашли бромид тетраметиламмония (ТМА), триметилсилилпропионат (TSP), триметилсилапропан-сульфокислота (DSS) и некоторые другие. Кроме этого качественный анализ спектров также часто проводится с использованием остаточного сигнала воды HDO, обычно расположенного в области 4.7-4.8 ppm протонного спектра.

Основные требования, предъявляемые к калибровочному соединению:

1. Химическая инертность, т.е. не взаимодействие с исследуемым веществом
2. Отсутствие тонкой структуры калибровочного пика
3. Калибровочный пик должен по возможности не перекрывать область исследуемых сигналов
4. Пик калибровочного вещества не должен изменять своего положения при варьировании концентрации исследуемого вещества, pH и температуры раствора.

Ранее было показано, что ТМА удовлетворяет требованиям 1,2,4 для условий растворителя, близких к физиологическим [1], что позволило провести серию исследований методом ЯМР комплексообразования ароматических лекарственных препаратов с олигонуклеотидами ДНК (см. обзор [2]). Вместе с тем, ТМА имеет один недостаток, заключающийся в том, что калибровочный пик, обычно устанавливаемый на уровне 3.178 ppm относительно DSS, частично перекрывает область метильных протонов и протонов сахаров ДНК. Кроме этого ТМА в водной среде претерпевает незначительную трансформацию в минорный компонент, дающий слабый сигнал в области 1-3 ppm. В большинстве случаев эти недостатки являются малозначимыми при измерении параметров комплексообразования, однако сильный сигнал от ТМА может негативно влиять на двумерные спектры, ухудшая их качество.

Целью настоящей работы является поиск калибровочного соединения для использования в одно- и двумерных ЯМР экспериментах, аналогичного по свойствам ТМА, но не перекрывающего область протонов исследуемого вещества.

Методика эксперимента

Спектры ЯМР регистрировались в магнитном поле 14.1 Тл на спектрометре Bruker Avance III, работающем на ^1H резонансной частоте 600.13 МГц в программной среде TopSpin версия 2.0 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) на рабочей станции HP XW3300 в операционной системе Windows XP. Одномерные ^1H ЯМР спектры регистрировались с использованием стандартной импульсной последовательности «zgpg» с длительностью 90°-ного протонного импульса $P1 = 10.48$ мкс и

релаксационной задержкой 2 с. Спад сигнала свободной индукции регистрировался в течении времени 1.704 с в спектральной полосе протонных сигналов, эквивалентной 16.0221 ppm с центром на 4.692 ppm.

Результаты и обсуждение

Среди коммерчески доступных калибровочных соединений для ЯМР, по совокупности физико-химических параметров нами был выбран TSP. Это соединение дает синглет без побочных минорных пиков на уровне 0 ppm (относительно DSS), т.е. достаточно далеко от области метильных сигналов и сигналов протонов сахаров ДНК. Единственный пробел в литературных данных по поводу TSP заключается в отсутствии информации о температурной зависимости калибровочного сигнала в интервале 280-350K, обычно используемом для определения термодинамических параметров комплексообразования биомолекул.

Полагая собственный температурный сдвиг сигнала TMA нулевым, для оценки температурной зависимости сигнала TSP по отношению к TMA, нами были сняты одномерные ЯМР спектры смешанного раствора, содержащего оба исследуемых калибровочных вещества. Результаты представлены на рисунке 1 в виде зависимости химического сдвига калибровочного пика TSP относительно TMA, установленного равным стандартному значению 3.178 ppm.

Из рисунка 1 следует, что в интересующем температурном интервале сигнал TSP претерпевает сдвиг на -0.02 ppm. Такой сдвиг соизмерим с температурным смещением химических сдвигов протонов при исследовании комплексообразования биомолекул и в связи с этим является недопустимым.

Для исключения сдвига калибровочного сигнала кривая на рисунке 1 была подвергнута аппроксимации различными функциями. Наилучшая по соотношению качество аппроксимации и число подгоночных параметров оказалась экспоненциальная функция. Точное выражение для пересчета протонного химического сдвига δ_X^{TSP} , измеренного при калибровке спектра по отношению к TSP, в скорректированное на температурный сдвиг значение δ_X^{corr} имеет вид

$$\delta_X^{corr} = \delta_X^{TSP} - 5.7156 \cdot e^{-0.0198 \cdot T}. \quad (1)$$

Однако для практических целей более удобной версией (1) является слегка «огрубленная» аппроксимация с округленными коэффициентами:

$$\delta_X^{corr} = \delta_X^{TSP} - 6 \cdot e^{-0.02 \cdot T}. \quad (2)$$

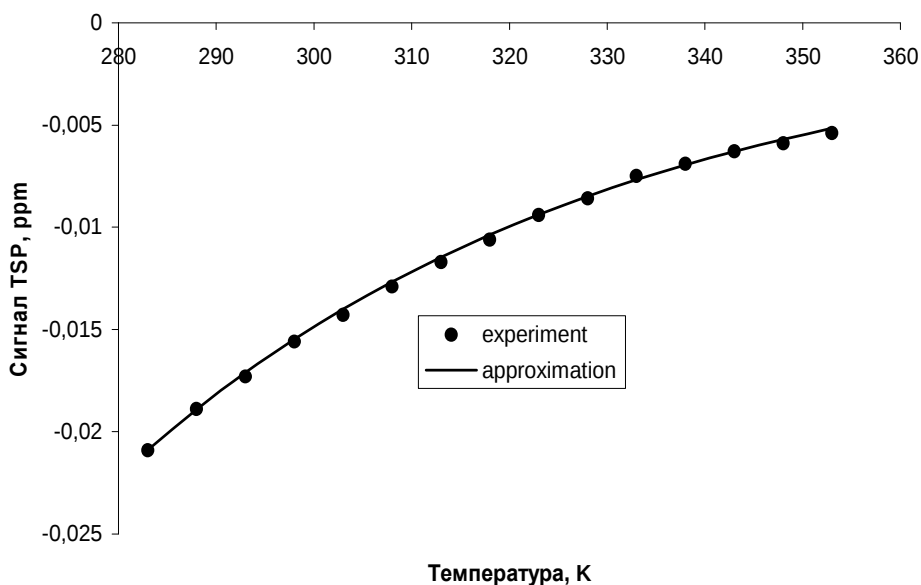


Рисунок 1 – Температурная зависимость химического сдвига калибровочного пика TSP относительно TMA

Выражение (2) дает максимальное отклонение расчетного химического сдвига от экспериментального 0.0003 ppm, что находится в области погрешности повторяемости ЯМР эксперимента.

Поскольку остаточный сигнал воды HDO также часто используется в целях калибровки, аналогичный анализ температурного дрейфа водного пика был проведен по отношению к TMA (рисунок 2). Наилучшая аппроксимация соответствует линейному регрессионному уравнению

$$\delta_{HDO} = 7.859 - 0.0103 \cdot T, \quad (3)$$

позволяющему вычислить скорректированное положение водного пика при любой температуре.

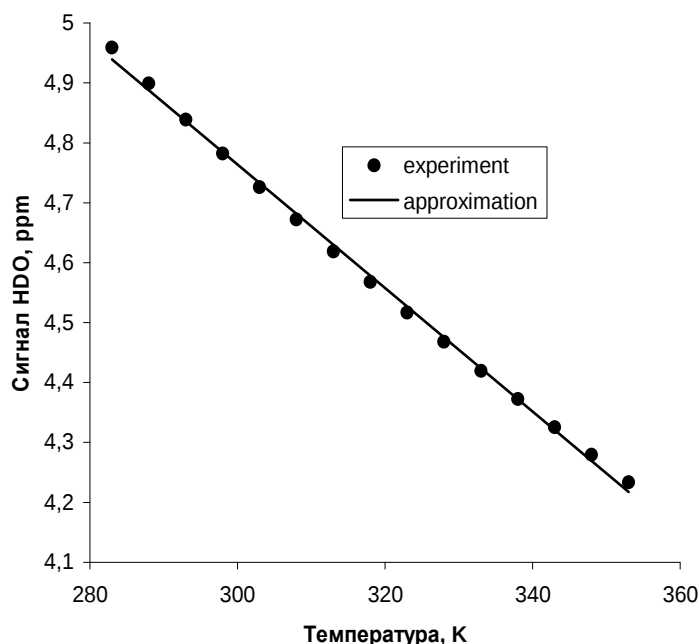


Рисунок 2 – Температурная зависимость химического сдвига пика HDO относительно TMA

Таким образом, результаты настоящей работы предоставляют простые аппроксимирующие соотношения, позволяющие использовать TSP в качестве калибровочного сигнала для ЯМР исследований процессов комплексообразования биомолекул в водной среде в широком интервале температур. В настоящее время выражение (2) используется нами для термодинамического анализа самоассоциации аналогов лекарственных препаратов, проявляющих свое медико-биологическое действие путем образования внешнесвязанных комплексов с ядерной ДНК.

Бibliографический список

1. Cross B.P. Temperature dependence of the chemical shifts of commonly employed proton n.m.r. reference compounds / B.P. Cross, T. Schleich // Org. Magn. Res. — 1977. — V. 10. — P. 82–85.
2. Davies D.B. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // Eur. Biophys. J. — 2001. — V. 30. — P. 354–366.

Поступила в редакцию 06.04.2009 г.