

14.04

Упругие свойства растворов гуанидин гидрохлорида различной концентрации в гигагерцовом диапазоне частот

© А.И. Федосеев,¹ И.П. Колударов,^{1,2} А.В. Фронтцек,¹ А.В. Дмитриев,¹ С.Г. Лушников¹

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Ecology and Evolution Unit, Okinawa Institute of Science and Technology,
Onna, Kunigami-gun, Okinawa, 904-0495, Japan
e-mail: sergey.lushnikov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 10 февраля 2020 г.

В окончательной редакции 10 февраля 2020 г.

Принято к публикации 17 февраля 2020 г.

Изучены температурные зависимости скорости гиперзвука $V(T)$ в растворах с различной концентрацией гуанидин гидрохлорида (GdnHCl) с помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния света в диапазонах температур от 263 до 353 К. Было показано, что для низких концентраций GdnHCl температурная зависимость скорости звука имеет выраженный максимум. Увеличение концентрации GdnHCl в растворе сопровождается смещением максимума в область низких температур и увеличением абсолютных значений скорости звука, что означает уменьшение адиабатической сжимаемости на всем диапазоне исследуемых температур. Построена температурная зависимость адиабатической сжимаемости при малых концентрациях GdnHCl. Определен вклад релаксационных процессов в температурное поведение затухания гиперзвука в растворах GdnHCl. Показано, что их поведение является термоактивированным и описывается законом Аррениуса. Рассчитаны значения энергии активации релаксационных процессов. Обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе наблюдаемых явлений.

Ключевые слова: мандельштам-бриллюэновское рассеяние света, гуанидин гидрохлорид, скорость гиперзвука, адиабатическая сжимаемость, время релаксации, энергия активации.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49688.48-20

Введение

Для изучения стабильности белков, а также механизмов и кинетики фолдинга и анфолдинга, как правило, исследуется денатурация белков под воздействием различных факторов (температура, давление, химические денатуранты). При химической денатурации к самым распространенным денатурантам белков можно отнести гуанидин гидрохлорид (GdnHCl) — один из производных гуанидина. Широкое использование гуанидина связано с тем, что он является важным сырьем при органическом и неорганическом синтезе для получения многочисленных производных (например, N-замещенный гуанидин), которые в последнее время привлекают внимание как неионные основания, органокатализаторы и N-доноры для ионов металлов [1–4]. Однако несмотря на широкое использование данного вещества, его физические свойства и свойства его водных растворов сравнительно мало изучены. Лишь недавно гуанидин был получен в кристаллическом виде, и его структура была детально изучена с помощью рентгеноструктурного анализа [5].

Гуанидин $(\text{NH}_2)_2\text{C}(=\text{NH})$ представляет собой соединение, содержащее ядро CH_3 , с которым ковалентно связаны две аминогруппы (NH_2) и одна иминогруппа. В водном растворе гуанидин протонирован и существует в виде катиона (Gdm^+) $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$. Молекула имеет жесткую планарную структуру. При исследовании рас-

творов с разными концентрациями GdnHCl были определены осмотические коэффициенты растворов [6]. Было установлено, что повышение концентрации GdnHCl в растворе приводит к увеличению его вязкости и плотности [7]. Изменения свойств раствора при добавлении не только GdnHCl, но и любых других солей, может происходить за счет их влияния на структуру воды. По типу влияния на структуру воды различные катионы и анионы разделяют на хаотропы, которые нарушают структуру воды, и космотропы, которые вызывают упорядочение структуры воды [8–10]. Несмотря на то, что ион Gdm^+ слабо гидратирован и не имеет водной оболочки [11], он может оказывать значительное влияние на свойства воды как хаотропный агент из-за способности формировать водородные связи с молекулами воды [10–13], возможности электростатических взаимодействий с другими ионами и белками [12,13] или гидрофобных взаимодействий между ионами Gdm^+ [13]. Таким образом, особенность влияния молекул GdnHCl на свойства раствора может быть связана с его планарным строением. Группы N–H способны образовывать упорядоченные водородные связи в плоскости молекулы, которые слабо взаимодействуют с водой. Это может приводить к образованию комплексов, содержащих несколько ионов Gdm^+ [13].

Исследования механизмов денатурации белков под воздействием GdnHCl показали, что GdnHCl может денатурировать белки не только путем прямого вза-

Значения показателя преломления (n), энергии активации E_a и пробного времени релаксации (τ_0) в растворах GdnHCl различной концентрации

[GdnHCl], M	n	E_a , kJ/mol	τ_0 , ps	E_a , kJ/mol	τ_0 , ps
1	1.35074	13.07	10.21	12.99	9.28
2	1.36719	6.22	7.57	18.92	11.7
3	1.38364	9.74	8.9	3.527	6.36
4	1.40009	11.61	9.37		
5	1.41654	6.11	7.36		
6	1.43299	9.37	8.2		

имодействия с белковой молекулой [14–16], но и посредством изменения свойств воды как растворителя [17,18]. В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния GdnHCl на упругие свойства раствора на гиперзвуковых частотах. С помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния света мы исследовали поведение скорости и затухания гиперзвука в растворах GdnHCl разных концентраций в широком температурном диапазоне.

1. Материалы и методы

Для приготовления образцов использовали гуанидин гидрохлорид, фирмы Sigma; натрия ацетат тригидрат и уксусная кислота — фирмы Нева-Реактив (СПб, Россия); азит натрия — фирмы Fluka. Все реактивы использовались без предварительной очистки. Для приготовления растворов использовалась дистиллированная вода.

Изучение денатурации белков под воздействием различных денатурирующих агентов проводится на базе растворов, которые приготавливаются с использованием тех или иных буферов. Поэтому нас интересовали свойства растворов GdnHCl в буфере, приготовленном на основе 0.1 М натрий ацетатного буфера с pH = 4.6. Для того чтобы избежать бактериального заражения, в буфер добавлялся натрия азид с конечной концентрацией 0.02% w/v. В экспериментах исследовались мандельштам-бриллюэновские рассеяния света в растворах GdnHCl с концентрациями 1, 2, 3, 4, 5 и 6 М.

В качестве источника света использовался аргоновый лазер с длиной волны $\lambda = 488$ nm. Луч лазера с помощью системы поворотных зеркал и оптических линз направлялся и фокусировался в исследуемом образце в 180° геометрии рассеяния. Рассеянный в образце свет собирался системой оптических линз и направлялся в 3-х проходной пьезосканируемый интерферометр Фабри–Перо, после чего сигнал регистрировался ФЭУ. Подстройка прибора осуществлялась с помощью блока контроля и управления DAS-1. Закрытая кварцевая кювета с раствором помещалась в оптическую печь с системой автоматического контроля температуры, что позволяло менять температуру образца в диапазоне от 263 до 353 К с точностью $\pm 1^\circ$.

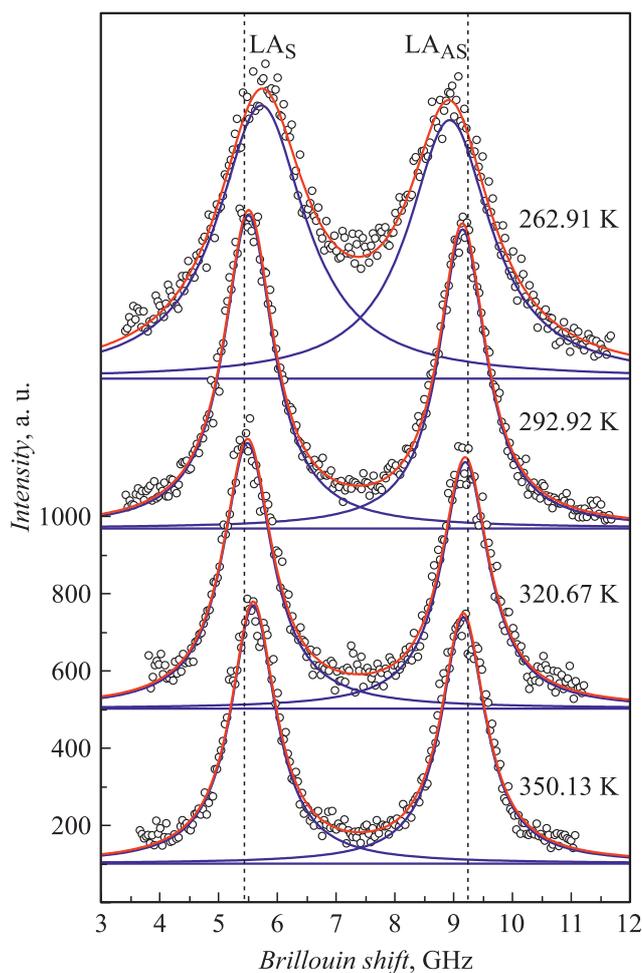


Рис. 1. Экспериментальные спектры бриллюэновского рассеяния света в растворе 3 М GdnHCl при различных температурах. Сплошными линиями показаны результаты обработки спектров.

Пример спектра рассеяния для 3 М раствора GdnHCl, а также результат его обработки показаны на рис. 1. Для обработки данных использовались функции Лоренца (мандельштам-бриллюэновский дублет — МБ дублет) и функции Гаусса (рэлеевское рассеяние на несмещенной частоте, на данном рисунке не показаны). В результате обработки экспериментальных спектров мы получали значения сдвига частоты ($\Delta\nu$) и ширины на полувысоте (Γ) компонент МБ дублета. Величина сдвига антистоксовой (LA_{AS}) и стоксовой (LA_S) компонент МБ дублета по отношению к несмещенной линии (рэлеевскому рассеянию) определяют скорость гиперзвуковой упругой волны (V) как

$$V = \frac{\lambda \Delta\nu}{2n \sin(\theta/2)}, \tag{1}$$

где λ — длина волны лазера, n — коэффициент преломления, θ — угол между падающим и рассеянным светом. Показатель преломления для каждого раствора GdnHCl с разной концентрацией определялся с помощью рефрак-

тометра Абе при комнатной температуре (см. таблицу). Данные значения n использовались для расчета скорости гиперзвука в растворах $GdnHCl$ по формуле (1), (зависимостью n от температуры пренебрегали в силу ее малости). Затухание (α) и время релаксации (τ) гиперзвука определяется следующими выражениями:

$$\alpha = \frac{\pi\Gamma}{V}, \quad (2)$$

$$\tau = \frac{1}{2\pi\Gamma}. \quad (3)$$

Каждый эксперимент проводился следующим образом: кювета нагревалась до соответствующей температуры и выдерживалась на каждой температурной точке 10 min, после чего снимался спектр, и кювета с раствором нагревалась до следующей температуры.

На рис. 1 представлена эволюция МБ дублетов для 3 М раствора $GdnHCl$ при различных температурах. При температуре 262 К значение сдвига $\Delta\nu$ составляет 8.8 GHz и, по мере увеличения температуры, оно увеличивается, достигая максимума ~ 9.2 GHz при 320 К. Дальнейшее нагревание раствора приводит к уменьшению $\Delta\nu$ и его значение при 350 К составляет 9.1 GHz. На рис. 1 хорошо видно, что полуширина компонент МБ дублетов также изменяется при увеличении температуры. Подобным образом ведут себя компоненты МБ дублетов в растворах $GdnHCl$ других концентраций при повышении температуры. Для корректного анализа температурного поведения скорости гиперзвука в $GdnHCl$ с различной концентрацией построим зависимости относительного изменения скорости $\delta V = V/V_0$, где V_0 — значение скоростей при $T = 296$ К.

2. Результаты и обсуждения

2.1. Температурные зависимости скорости гиперзвука в растворах $GdnHCl$ различной концентрации

Температурные зависимости относительного изменения скорости гиперзвука растворов с концентрацией от 0 до 6 М $GdnHCl$ представлены на рис. 2. Хорошо видно, что для раствора с низкой концентрацией $GdnHCl$ постепенное повышение температуры до 337 К приводит к монотонному увеличению скорости гиперзвука. Выше $T = 337$ К скорость гиперзвука уменьшается. Таким образом, температурная зависимость относительного изменения скорости гиперзвука в растворе $GdnHCl$ 1 М имеет выраженный максимум в окрестности ~ 337 К. Подобное поведение скорости гиперзвука при изменении температуры наблюдалось ранее как для обычной, так и дейтерированной воды [19], натрий ацетатного буфера [20]. Здесь нужно отметить, что для количественного обсуждения поведения $\delta V(T)$ мы описывали полученные зависимости функцией Лоренца, что позволило определить значение максимума скорости на

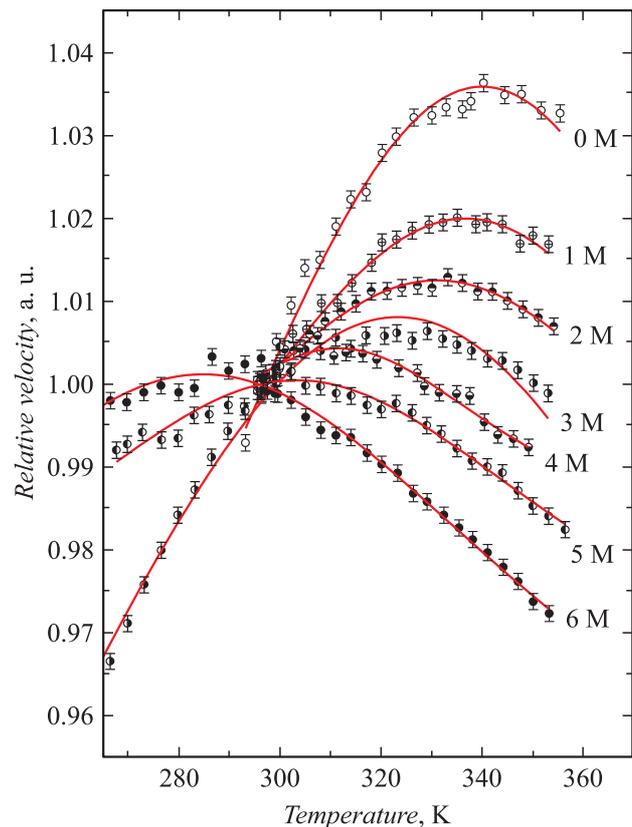


Рис. 2. Температурная зависимость скорости гиперзвука для растворов с разными концентрациями $GdnHCl$. На рисунке показаны значения скорости гиперзвука относительно значений при 296 К.

ее температурной зависимости. Результаты подгонки указаны на рис. 2 сплошными линиями. Хорошо видно из рис. 2, что повышение концентрации $GdnHCl$ в буфере до 6 М приводит к тому, что максимум на температурной зависимости $\delta V(T)$ смещается в область низких температур. Из рис. 2 также видно, что смещение кривой $\delta V(T)$ (и соответственно максимума скорости) пропорционально количеству добавляемого $GdnHCl$, и на основании этого можно предположить, что вода является идеальным растворителем для данного вещества [21]. Так же ведут себя температурные зависимости адиабатической скорости звука в растворе вода—глюкоза при увеличении концентрации глюкозы [22].

Рассмотрим теперь, как изменяется абсолютное значение скорости гиперзвука в зависимости от концентрации $GdnHCl$ (рис. 3). Концентрационная зависимость скорости гиперзвука может рассматриваться с учетом следующего уравнения:

$$\frac{dV}{dc} = -\frac{V}{2} \left(\frac{1}{\rho} \frac{d\rho}{dc} + \frac{1}{k_s} \frac{dk_s}{dc} \right), \quad (4)$$

где V — скорость гиперзвука, c — концентрация раствора, ρ — плотность и k_s — сжимаемость раствора $GdnHCl$. Вклады $(d\rho/dc)$ и (dk_s/dc) имеют противополо-

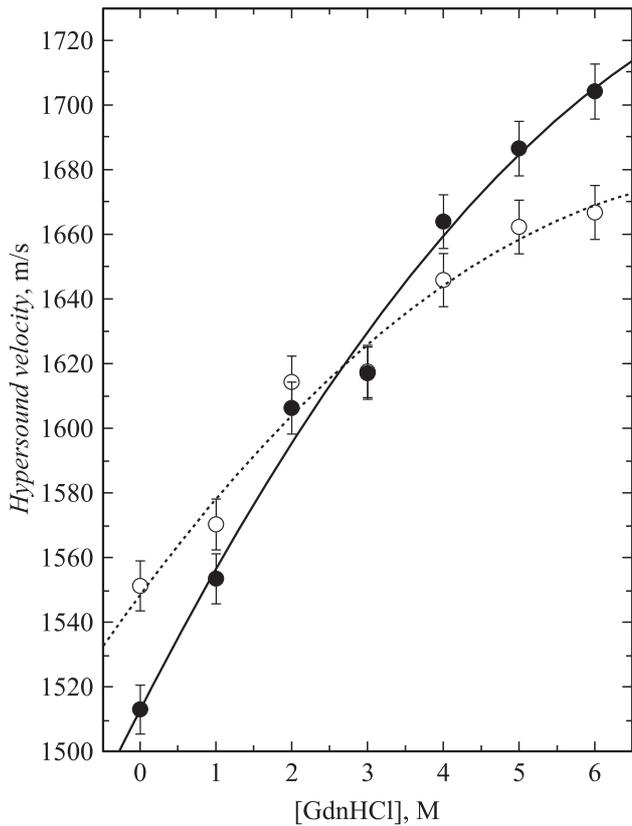


Рис. 3. Зависимость скорости гиперзвука от концентрации GdnHCl в растворе при 302 К (черные кружки) и 348 К (белые кружки).

ложные знаки. Как показано ранее, плотность раствора GdnHCl линейно увеличивается с концентрацией [7]. Второй член, определяющий поведение сжимаемости, имеет отрицательный знак и является преобладающим. На рис. 3 видно, что скорость гиперзвука увеличивается с концентрацией GdnHCl, что соответствует увеличению жесткости системы и уменьшению ее сжимаемости. При повышении температуры эта зависимость приобретает более пологую форму. Следовательно, нагревание приводит к тому, что раствор становится менее структурированным, что можно объяснить увеличением тепловых флуктуаций.

2.2. Адиабатическая сжимаемость растворов GdnHCl с различной концентрацией

Скорость гиперзвука V в растворах GdnHCl связана с адиабатической сжимаемостью k_s термодинамическим отношением

$$k_s = \frac{1}{\rho V^2}, \tag{5}$$

где ρ — плотность жидкости. Так как для приготовления всех растворов использовалась дистиллированная вода, а ее плотность при нагревании изменяется незначительно (а именно, ρ уменьшается от 1.0000 до 0.99406 g/cm³

при нагревании от 4 до 35°C [23]), то можно утверждать, что скорость звука в растворах главным образом определяется адиабатической сжимаемостью. Следовательно, максимум в температурных зависимостях относительных изменений скоростей, представленных на рис. 4, соответствует температуре, при которой адиабатическая сжимаемость раствора минимальна. Определим эту температуру, как температуру минимума адиабатической сжимаемости. На рис. 4 показано изменение температуры минимума адиабатической сжимаемости в зависимости от содержания GdnHCl в растворе, а также значения адиабатической сжимаемости k_s при T_m для каждой концентрации GdnHCl. Хорошо видно, что T_m смещается в низкотемпературную область при повышении концентрации GdnHCl. В то же время абсолютное значение сжимаемости уменьшается при повышении концентрации GdnHCl во всем исследуемом температурном интервале (рис. 3 и 4). Можно предположить, что такое изменение механических свойств при добавлении GdnHCl связано, с одной стороны, с изменением структурированности сетки водородных связей воды, а также способностью Gdm⁺ к формированию комплексов [13]. Возможность формирования в водном растворе комплексов, состоящих из нескольких ионов Gdm⁺, была показана как с помощью компьютерного моделирования при учете данных рассеяния нейтронов [13], так и с помощью

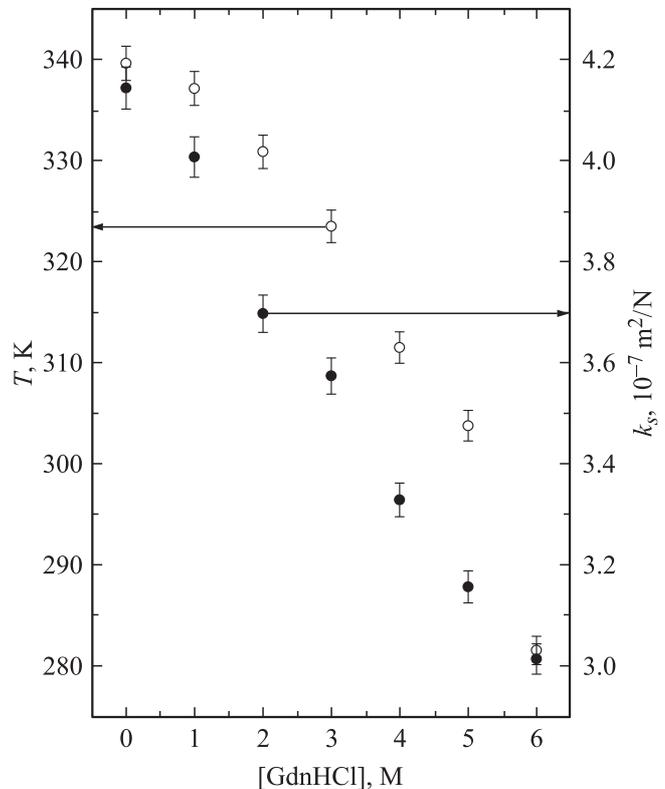


Рис. 4. Значения скорости гиперзвука в точке минимума адиабатической сжимаемости и температуры, при которой наблюдался данный минимум для растворов с разными концентрациями GdnHCl.

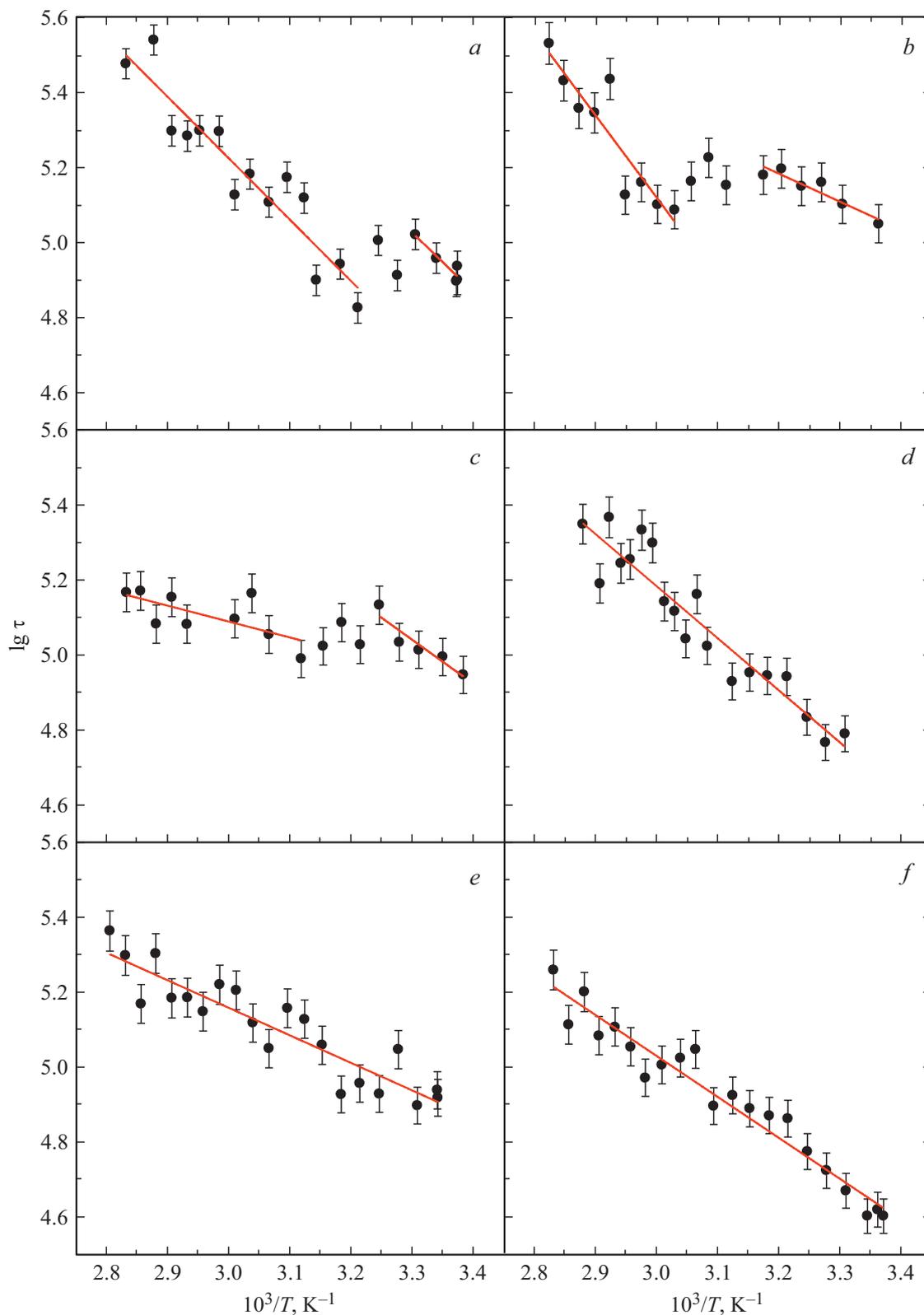


Рис. 5. Температурные зависимости времени релаксации в растворах GdnHCl с разной концентрацией: *a* — 1, *b* — 2, *c* — 3, *d* — 4, *e* — 5, *f* — 6 М. Сплошными линиями представлены результаты обработки данных с помощью уравнения (6).

расчетов методом Монте-Карло [24]. Перегруппировка водородных связей в растворе может быть обусловлена особенностями пространственной структуры ионов Gdm^+ , таких как размеры ионов и жесткая планарная структура, и может иметь место даже при условии, что ионы гуанидина слабо гидратированы и не имеют гидратной оболочки [11]. Подобные перегруппировки в структуре раствора, как показывают результаты экспериментов, приводят к реструктурированию раствора, или, иначе говоря, к более компактной упаковке молекул в среде.

2.3. Релаксационные процессы в растворах GdnHCl различной концентрации

Температурное поведение скорости и затухания гиперзвука в растворах GdnHCl анализировалось в рамках модели Дебая [25]. В рамках этой модели мы можем оценить вклад релаксационных процессов в поведение затухания гиперзвука и определить энергию активации (ΔE) и пробное время релаксации (τ_0), которое слабо зависит от температуры. Вклад релаксационных процессов в поведение затухания рассматривался на примере растворов вода–глюкоза [22], водных растворов трегалозы [26] и др. В большинстве случаев время релаксации (τ) следует закону Аррениуса и описывается следующим выражением:

$$\tau = \tau_0 \exp(E_a/k_B T). \quad (6)$$

Мы использовали выражение (6) для анализа вклада релаксационных процессов в температурное поведение затухания в растворах GdnHCl . Результаты представлены в таблице и на рис. 5. Хорошо видно, что при низких концентрациях GdnHCl (рис. 5, *a–c*) существуют два релаксационных процесса. При увеличении концентрации GdnHCl выше 3 М один из релаксационных процессов исчезает, и мы наблюдаем вклад только одного процесса в поведение упругих свойств раствора. Это хорошо согласуется с тем, что максимум скорости гиперзвука на температурной зависимости скорости, хорошо определенный при малых концентрациях GdnHCl , смещается в сторону низких температур при увеличении концентрации GdnHCl (рис. 2). Таким образом, в области высоких концентраций GdnHCl поведение скорости и затухания гиперзвука в растворе в диапазоне температур от 290 до 360 К определяется одним релаксационным процессом, энергия активации которого меняется. Природа релаксационных процессов в растворах GdnHCl требует дальнейших исследований, в том числе и методами молекулярной динамики.

Выводы

Исследования растворов с GdnHCl методом мандельштам-бриллюэновского рассеяния света позволили выявить определенные закономерности температурного

поведения скорости гиперзвука при увеличении концентрации GdnHCl . Было обнаружено, что при малых концентрациях GdnHCl порядка 1–2 М зависимости $V(T)$ имеют форму широкого максимума с экстремумом в окрестности 335 К, который соответствует минимуму адиабатической сжимаемости системы. Повышение концентрации GdnHCl привело к изменению характера наблюдаемых зависимостей: смещению минимума адиабатической сжимаемости в низкотемпературную область и более пологой зависимости $V(T)$ при температурах, выше комнатной, а также увеличению скорости гиперзвука в растворе во всем исследуемом интервале температур. Было показано существование двух релаксационных процессов при низких концентрациях GdnHCl , которые описываются с помощью закона Аррениуса. Определены энергии активации этих релаксационных процессов. Увеличение концентрации GdnHCl в растворе приводит к исчезновению одного из релаксационных процессов. Такие изменения свойств растворов при увеличении концентрации GdnHCl связаны с особенностями структуры ионов Gdm^+ , способных к взаимодействиям как друг с другом, так и с молекулами воды в растворе. Изменения в сетке водородных связей в воде при добавлении GdnHCl приводят к увеличению жесткости системы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] *Raczynska E.D., Cyranski M.K., Gutowski M., Rak J., Gal J.-F., Maria P.-C., Darowska M., Duczmal K.* // J. Phys. Org. Chem. 2003. Vol. 16. N 2. P. 91–106. DOI: 10.1002/poc.578
- [2] *Bailey P.J., Pace S.* // Coord. Chem. Rev. 2001. Vol. 214. N 1. P. 91–141. DOI: 10.1016/S0010-8545(00)00389-1
- [3] *Berlinck R.G.S.* // Nat. Prod. Rep. 1999. Vol. 16. P. 339–365. DOI: 10.1039/A900338J
- [4] *Gopi K., Rathi B., Thirupathi N.* // J. Chem. Sci. 2010. Vol. 122. N 2. P. 157–167. DOI: 10.1007/s12039-010-0017-8
- [5] *Yamada T., Liu X., Englert U., Yamane H., Dronskowski R.* // Chem. Eur. J. 2009. Vol. 15. N 23. P. 5651–5655. DOI: 10.1002/chem.200900508
- [6] *Schrier M.Y., Schrier E.E.* // J. Chem. Engin. Data. 1977. Vol. 22. N 1. P. 73–74. DOI: 10.1021/jc60072a009
- [7] *Kawahara K., Tanford C.* // J. Biol. Chem. 1966. Vol. 241. N 13. P. 3228–3232.
- [8] *Hofmeister F.* // Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1888. Vol. 24. P. 247–260.
- [9] *Moelbert S., Normand B., Rios P.D.L.* // Biophys. Chem. 2004. Vol. 112. N 1. P. 45–57. DOI: 10.1016/j.bpc.2004.06.012
- [10] *Zhang Y., Cremer P.S.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2006. Vol. 10. N 6. P. 658–663. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020
- [11] *Mason P.E., Neilson G.W., Dempsey C.E., Barnes A.C., Cruickshank J.M.* // PNAS. 2003. Vol. 100. N 8. P. 4557–4561. DOI: 10.1073/pnas.0735920100

- [12] O'Brien E.P., Dima R.I., Brooks B., Thirumalai D. // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129. N 23. P. 7346–7353. DOI: 10.1021/ja069232
- [13] Mason P.E., Neilson G.W., Enderby J.E., Saboungi M.-L., Dempsey C.E., MacKerell A.D., John Jr., Brady W. // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126. N 37. P. 11462–11470. DOI: 10.1021/ja040034x
- [14] Hibbard L.S., Tulinsky A. // Biochemistry. 1978. Vol. 17. N 25. P. 5460. DOI: 10.1021/bi00618a021
- [15] Mande S.C., Sobhia M.E. // Protein Eng. 2000. Vol. 13. N 2. P. 133–141. DOI: 10.1093/protein/13.2.133
- [16] Dunbar J., Yennawar H.P., Banerjee S., Luo J., Farber G.K. // Protein. Sci. 1997. Vol. 6. N 8. P. 1727–1733. DOI: 10.1002/pro.5560060813
- [17] Möglich A., Krieger F., Kiefhaber T. // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 345. N 1. P. 153–162. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.10.036
- [18] Bieri O., Wirz J., Helrung B., Drewello M., Kiefhaber T. // PNAS. 1999. Vol. 96. N 17. P. 9597–9601. DOI: 10.1073/pnas.96.17.9597
- [19] Conde O., Teixeira J., Papon P. // J. Chem. Phys. 1982. Vol. 76. N 7. P. 3747–3753. DOI: 10.1063/1.443413
- [20] Svanidze A.V., Lushnikov S.G., Kojima S. // JETP Lett. 2009. Vol. 90. N 1. P. 80–85. DOI: 10.1134/S0021364009130165
- [21] James D.W., Appleby R. // J. Phys. Chem. 1982. Vol. 86. N 14. P. 2788–2793. DOI: 10.1021/j100211a045
- [22] Gallina M.E., Comez L., Perticaroli S., Morresi A., Cesàro A., De Giacomo O., Di Fonzo S., Gessini A., Masciovecchio C., Palmieri L., Paolantoni M., Sassi P., Scarponi F. // Philosoph. Magazin. 2008. Vol. 88. N 33–35. P. 3991–3998. DOI: 10.1080/14786430802481903
- [23] Lide D.R. CRC Handbook of Chem. Phys. 70th ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- [24] Boudon S., Wipff G., Maigret B. // J. Phys. Chem. 1990. Vol. 94. N 15. P. 6056–6061. DOI: 10.1021/j100378a078
- [25] Bencivenga F., Cunsolo A., Krisch M., Monaco G., Orsingher L., Ruocco G., Sette F., Vispa A. // Phys. Rev. Lett. 2007. Vol. 98. N 8–23. P. 085501. DOI: 10.1103/PhysRevLett.98.085501
- [26] Haruki Takayama, Tomohiko Shibata, Yuto Kuroda, Shota Koda, Seiji Kojima // Jpn. J. Appl. Phys. 2014. Vol. 53. N 7S. P. 07KB06. DOI: 10.7567/JJAP.53.07KB06