

УДК 53.047

СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА ПО ДАННЫМ ЭКСПЕРИМЕНТА И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОГО РАСЧЕТА

Е.П. Конькова

Вычислен спектр поглощения восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида в неэмпирическом приближении. Спектры сегментов кофермента вычислены с помощью полуэмпирического метода. Сравнение результатов, полученных в полуэмпирическом и неэмпирическом приближениях, показало, что упрощение (деление на сегменты) не вносит существенной ошибки. Сравнение экспериментальных и расчетных данных показало их хорошее согласие. Деление сложных органических молекул на сегменты полезно с точки зрения уменьшения времени вычисления.

Ключевые слова: аденин, никотинамид, НАДН, спектр поглощения, неэмпирические и полуэмпирические методы.

Введение

Все окислительно-восстановительные реакции в организме протекают с участием восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). Окисленная форма (НАД) поглощает излучение на длине волны 260 нм. При восстановлении до НАДН появляется дополнительный максимум поглощения на длине волны 340 нм [1]. Концентрация кофермента является важным физиологическим показателем. Определение концентрации проводится методами флуоресцентной спектроскопии [2]. Данный кофермент при нормальных условиях представляет собой твердое, растворимое в воде вещество. Поскольку флуорофором является только восстановленная форма, возникает необходимость путем квантово-химических расчетов исследовать спектр поглощения именно восстановленной формы. Однако автору не удалось обнаружить в литературе описания модели структурной формулы НАДН. С учетом вышесказанного, целью настоящей работы являлось построение простой модели структурной формулы НАДН, чей электронный спектр удовлетворительно воспроизводит основные особенности поглощения НАДН, а именно, наличие поглощения в областях 260 и 340 нм.

Квантово-химический расчет электронных спектров поглощения модели НАДН и его субъединиц

Часто используемым в спектроскопии приемом является представление крупной молекулярной системы совокупностью структурных единиц, для каждой из которых решение электронной задачи получают стандартными методами [3]. Данный прием позволяет выделить субъединицы, в значительной степени определяющие спектральные свойства крупной молекулярной системы.

На рис. 1 представлены структурные формулы НАД, аденина и никотинамида, НАДН, субъединицы-аденина и субъединицы-никотинамида. Видно, что расчетная модель субъединицы-аденина, ответственная за поглощение НАДН в области 260 нм, совпадает со структурной формулой реального вещества аденина, а расчетная модель субъединицы-никотинамида, моделирующая поглощение НАДН в области 340 нм, отличается от структурной формулы реального вещества никотинамида. Для органических молекул, имеющих как аденин и никотинамид сопряженные двойные связи, характерно поглощение в области 260 нм. Построение расчетной модели субъединицы-никотинамида, т.е. моделирование поглощения НАДН в области 340 нм, заключалось в разрыве сопряженной углеродной связи с атомом азота N молекулы реального вещества никотинамида при одновременном насыщении свободных валентностей атомами водорода H.

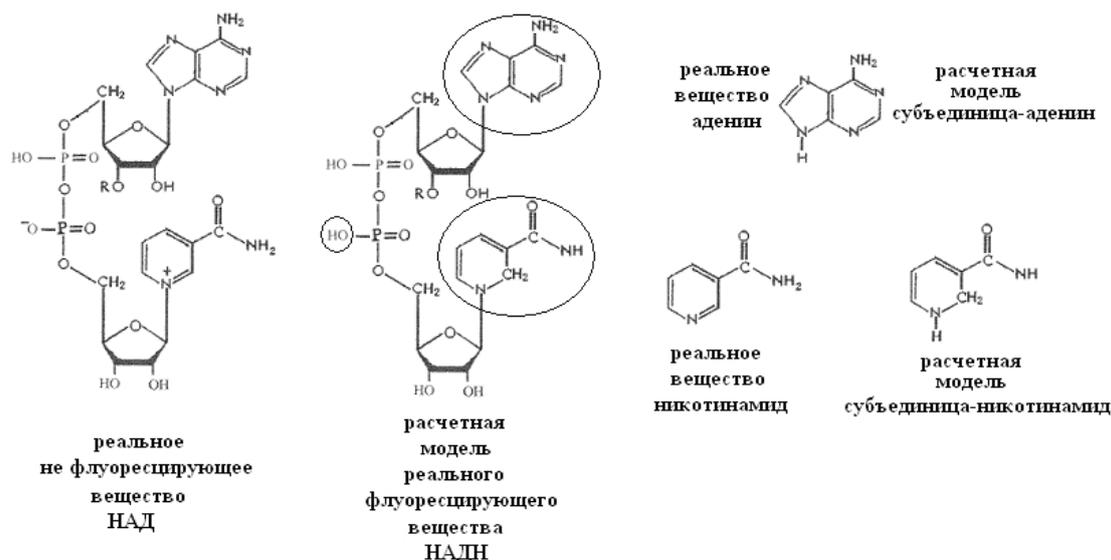


Рис. 1. Структурные формулы НАД, аденина, никотинамида, НАДН, субъединицы-аденина и субъединицы-никотинамида

В основе современной квантовой химии лежит уравнение Шредингера для стационарных состояний [4]. Его обычно решают в адиабатическом приближении, т.е. в предположении, что ядерную и электронную волновые функции можно разделить и решать уравнения для движения ядер и электронов раздельно. В этом приближении уравнение Шредингера для электронной волновой функции записывается следующим образом:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi, \quad (1)$$

где \hat{H} – гамильтониан системы, т.е. сумма операторов кинетической и потенциальной энергии; $\Psi = \Psi(x_1, x_2, \dots, x_n)$ – волновая функция для системы из n частиц, которая зависит от их расположения в пространстве и спинов; E – полная электронная энергия. Однако точно решить это уравнение удается лишь в случае одноэлектронных систем. По этой причине в квантовохимических расчетах используются приближенные методы. Среди них наиболее широкое распространение получил метод Хартри–Фока, или метод самосогласованного поля. В этом методе полагается, что каждый электрон движется в поле атомных ядер, положение которых фиксировано в пространстве, и в эффективном (усредненном) поле других электронов. Многоэлектронную волновую функцию ищут в виде антисимметризованного произведения спин-орбиталей, т.е. одноэлектронных молекулярных орбиталей (МО), умноженных на спиновые волновые функции соответствующего электрона.

В приближении Хартри–Фока уравнение Шредингера переходит в систему интегрально-дифференциальных уравнений для движения каждого отдельного электрона. МО обычно ищут в виде линейных комбинаций атомных орбиталей (ЛКАО). Таким образом, совокупность атомных орбиталей (АО) является физически наглядным базисом для построения молекулярной волновой функции. На практике обычно пользуются как полуэмпирическими, так и неэмпирическими методами. Они различаются методикой вычисления матричных элементов, описывающих взаимодействие электронов между собой и электронов и атомных ядер. В полуэмпирических методах для этой цели используются приближенные эмпирические формулы и известные из эксперимента параметры атомов. В неэмпирических методах проводится непосредственный аналитический расчет матричных элементов. Подробное описание теории МО ЛКАО можно найти, например, в [5].

Экспериментальное исследование пропускания водных растворов аденина и никотинамида

Приготовление растворов аденина и никотинамида осуществлялось путем последовательного разбавления.

Коэффициенты пропускания растворов были получены с использованием двухканального автоматизированного спектрального комплекса на базе монохроматора МДР-23 (ДАСК МДР-23). Источником излучения данного спектрального комплекса является дейтериевая лампа ДДС-30, излучающая в ультрафиолетовой области спектра 200–350 нм, а приемником – фотоэлектронный умножитель (ФЭУ-100) со спектральным диапазоном измерений 200–800 нм. Шаг перестройки длины волны составлял 0,1 нм, а точность перестройки – 0,05 нм.

Процедура измерения пропускания заключалась в следующем. В отсек для исследуемых образцов поочередно устанавливались кювета с дистиллированной водой и кюветы с растворами исследуемых

веществ. Снималась зависимость показаний фотоприемника от длины волны. Затем на основании полученных данных рассчитывался коэффициент пропускания. Сигнал измерялся 30 раз за 1 с. Коэффициент пропускания был найден как отношение коэффициента пропускания кюветы с раствором исследуемого вещества к коэффициенту пропускания кюветы с растворителем. Перед каждым измерением проводилась калибровка прибора.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлен электронный спектр поглощения модели НАДН, рассчитанный в неэмпирическом приближении. Видно характерное для кофермента НАДН поглощение в областях 260 и 340 нм, что свидетельствует о допустимости используемой модели.

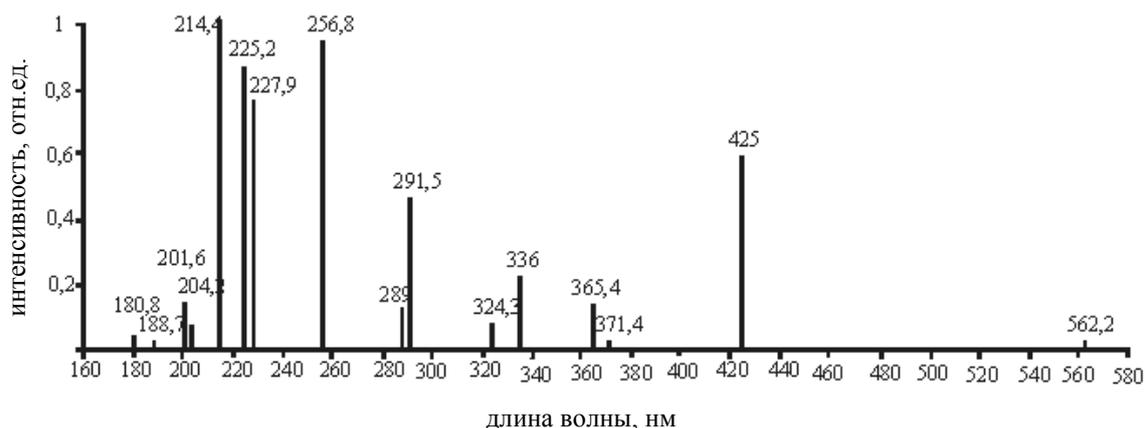


Рис. 2. Электронный спектр поглощения расчетной модели НАДН

На рис. 3, 4 представлены зависимости коэффициентов пропускания от длины волны растворов реальных веществ аденина и никотинамида и их электронные спектры поглощения, рассчитанные в полужэмпирическом приближении в вакууме. Видно, что экспериментальные и расчетные данные находятся в хорошем согласии, хотя экспериментальные данные представлены для раствора, а расчетные для изолированных молекул. Из рис. 3, 4 видно, что для реальных веществ аденина и никотинамида характерно наличие поглощения в области 260 нм и отсутствие поглощения в области 340 нм.

На рис. 5 представлены электронные спектры поглощения субъединицы-никотинамида в вакууме и в присутствии 23 молекул воды, рассчитанные в полужэмпирическом приближении. Видно, что присутствует поглощение в области 340 нм и отсутствует поглощение в области 260 нм. Таким образом, появление поглощения НАДН в области 340 нм можно связать с изменениями в районе сопряженной углеродной связи с атомом азота никотинамида.

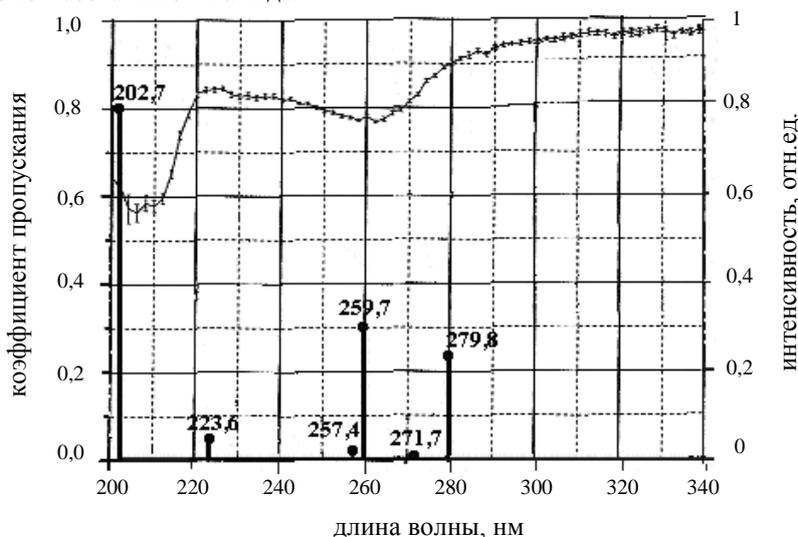


Рис. 3. Зависимость коэффициента пропускания от длины волны раствора аденина ($4,5 \cdot 10^{-6} \%$) и электронный спектр поглощения аденина (вакуум)

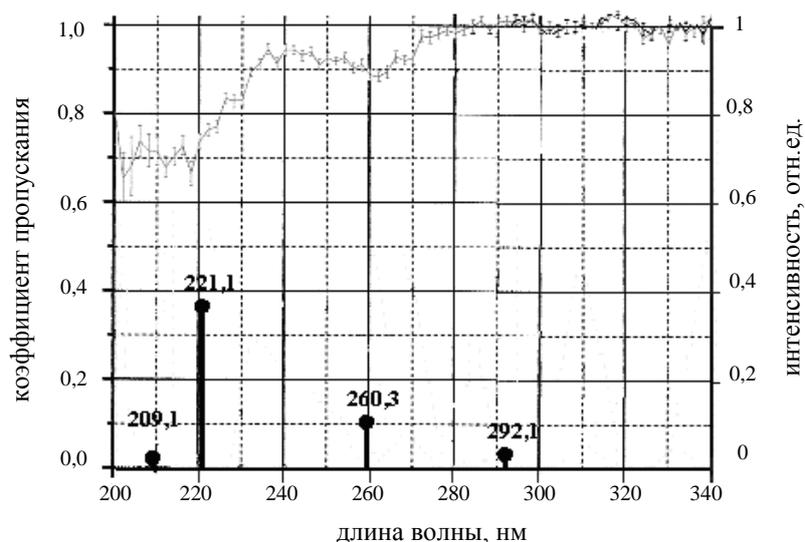


Рис. 4. Зависимость коэффициента пропускания от длины волны раствора никотинамида (0,0003%) и электронный спектр поглощения никотинамида (вакуум)

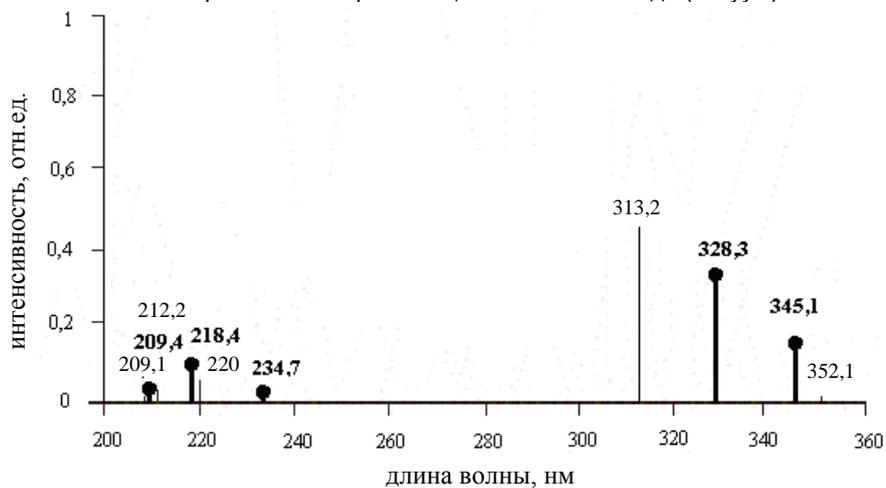


Рис. 5. Электронный спектр поглощения субъединицы-никотинамида в вакууме (тонкая линия) и в присутствии 23 молекул воды (жирная линия)

Заключение

В работе построена простая расчетная модель структурной формулы восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида. Показано, что электронный спектр модели удовлетворительно воспроизводит основные особенности поглощения реального вещества никотинамидадениндинуклеотида, а именно, наличие поглощения в областях 260 и 340 нм, что является прямым подтверждением допустимости предложенной модели. Кроме того, в работе выявлена связь между появлением поглощения кофермента в области 340 нм и понижением порядка углеродной связи с атомом азота никотинамида.

Литература

1. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1998. – 384 с.
2. Гираев К.М., Ашурбеков Н.А., Меджидов Р.Т. Стационарная спектроскопия биотканей *in vivo*: флуоресцентные исследования некоторых патологических состояний // Оптика и спектроскопия. – 2003. – Т. 95. – № 5. – С. 874–879.
3. Никитин О.Ю., Новосадов Б.К. Теория пофрагментного расчета электронной структуры основного состояния многоатомных молекул. I. Метод промежуточного фрагмента // Журнал структурной химии. – 1995. – Т. 36. – № 3. – С. 387–394.
4. Бурштейн К.Я., Шорыгин П.П. Квантовохимические расчеты в органической химии и молекулярной спектроскопии. – М.: Наука, 1989. – 98 с.
5. Грибов Л.А., Баранов В.И., Новосадов Б.К. Методы расчета электронно-колебательных спектров многоатомных молекул. – М.: Наука, 1984. – 325 с.

Конькова Елена Петровна – Волгоградский государственный университет, ассистент, konelepet@mail.ru