На правах рукописи

МИНЬКОВ Василий Сергеевич

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ЛАБИЛЬНОСТИ ЦИСТЕИНА В РАЗНОМ КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ОКРУЖЕНИИ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С ОТКЛИКОМ СТРУКТУРЫ НА ВНЕШНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

02.00.21 – химия твердого тела

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирском государственном университете»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Болдырева Елена Владимировна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор Асланов Леонид Александрович, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова", г. Москва

кандидат химических наук Анчаров Алексей Игоревич, Учреждение Российской академии наук "Институт химии твердого тела и механохимии" СО РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук "Международный томографический центр" СО РАН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится **«13» апреля 2011** г. в 10^{00} часов на заседании диссертационного совета Д 003.044.01 в Институте химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН по адресу: 630128, г. Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химии твердого тела и механохимии СО РАН.

Автореферат разослан **«11» марта 2011** г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.х.н. Т.П. Шахтшнейдер

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из актуальных направлений исследований химии твердого тела является поиск корреляций "структура - свойства". В частности, в случае молекулярных кристаллов большое значение уделяется исследованию взаимосвязи между строением отдельных молекул и кристаллической структурой ("crystal engineering"). Не меньшее значение имеет и изучение факторов, определяющих устойчивость кристаллических структур к внешним воздействиям, прежде всего, к изменению температуры и давления.

Кристаллы аминокислот, их солей, гидратов и производных привлекают особое внимание. С одной стороны, многие из них обладают важными физическими свойствами, являясь перспективными в качестве нелинейно-оптических или пьезоэлектрических материалов. С другой стороны, аминокислоты являются строительными блоками пептидов и белков. Они находят применение как биологически активные вещества. При производстве препаратов на их основе актуальны те же проблемы, что и при производстве любых фармацевтических препаратов: управление полиморфизмом, продление жизни метастабильных форм, исследование устойчивости при механическом воздействии или при изменении температуры. Наконец, очень актуальным направлением является использование кристаллов аминокислот в качестве биомиметиков. Исследование структуры аминокислот в кристаллах, растворах и в газовой фазе дает ценные сведения о возможных конформациях и взаимодействиях, реализующихся в более сложных для исследования биологических системах. В силу вышеизложенного, изучение кристаллических аминокислот сегодня ведется так активно, что только за последние несколько лет был опубликован ряд обзоров, посвященных этим объектам, не считая уже десятков статей, излагающих оригинальные результаты.

Цистеин, NH_2-$CH(CH_2$-$SH)$-CO_2H, занимает среди аминокислот особое место. Обладая подвижным боковым фрагментом -CH_2-SH, способным изменять свою ориентацию и образовывать лабильные водородные связи S-H...O и S-H...S, цистеин играет важную роль в формировании вторичной структуры белков, в частности цинк-пальцевых и железо-серных белков. В последнее время активно ведутся работы по изучению конформаций цистеина в газовой фазе, растворах, инертных матрицах. Из-за того, что различия в энергиях между разными конформерами очень малы, крайне затруднительно исследование свойств молекул с определенной конформацией. Теоретически рассчитанные модели зачастую не подтверждаются на практике. Исследование конформаций в кристаллах дает ряд преимуществ: становится возможным прямое исследование структуры, изменение кристаллического окружения позволяет влиять на конформации, варьирование температуры и давления дает информацию о

динамике кристаллической структуры в целом, и отдельных молекулярных групп.

Актуальность не только направления работы в целом, но и выбора конкретных объектов исследования, подтверждается, в частности, появлением уже по ходу выполнения данной работы, начатой всего несколько лет назад, публикаций других авторов в ведущих журналах, ссылающихся на наши исследования и продолжающих их. Публикация по сравнению полиморфных модификаций DL-цистеина, образующихся при низких температурах и высоких давлениях, была отнесена редколлегией журнала CrystEngComm к категории Hot Articles 2010 года.

Работа выполнялась в соответствии с планами научно-исследовательской работы кафедры химии твердого тела ФЕН и НОЦ "Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии" НГУ и была поддержана грантами РФФИ (06-03-00573-БНТС, 08-03-00143, 09-03-00451, 10-03-00252), государственными контрактами (02.740.11.5102, 16.740.11.0166 и П2529), интеграционными проектами СО РАН (13 и 109), проектами Президиума РАН № 21.44 и ОФХНМ РАН №5.6.4, а также программой BRHE (CRDF совместно с Минобрнаукой РФ) и программами "Фундаментальные науки медицине" и "Ведущие научные школы РАН".

Целью данной работы являлось изучение конформационной гибкости и межмолекулярных взаимодействий цистеина в кристаллах самого цистеина, его солей и производных во взаимосвязи с кристаллическими структурами и их устойчивостью к изменениям температуры и давления.

В рамках данной работы были поставлены следующие **задачи:**

– получение цистеин-содержащих кристаллов: L- и DL-цистеина, N-ацетил-L-цистеина, оксалатов L- и DL-цистеина, анализ их структуры, в частности, анализ влияния кристаллического окружения на конформацию молекул и водородные связи;

– изучение влияния изменений температуры и давления на конформацию и водородные связи в цистеин-содержащих кристаллах;

– сравнение устойчивости к протеканию фазовых переходов при варьировании температуры и давления различных цистеин-содержащих кристаллических структур.

Научная новизна. Впервые получены и исследованы новые кристаллические фазы на основе цистеина: низкотемпературные модификации и фазы высокого давления L- и DL-цистеина, две формы оксалата L-цистеина (1:1), оксалат DL-цистеина (1:1).

При сопоставлении результатов рентгеновской дифракции и колебательной спектроскопии проведен сравнительный анализ конформаций молекул и образуемых боковым фрагментом цистеина водородных связей в различном кристаллическом окружении: в моноклинной и ромбической полиморфных модификациях L-цистеина,

DL-цистеине, N-ацетил-L-цистеине и в солях на основе цистеина и щавелевой кислоты.

Изучены изменения конформаций молекул и образуемых боковым фрагментом цистеина водородных связей в данных молекулярных кристаллах при понижении температуры и повышении давления.

Детально исследованы структурные изменения при изменении температуры для двух полиморфных модификаций L-цистеина и DL-цистеина. Обнаружены различия во влиянии температуры на динамику боковых фрагментов и изменения систем водородных связей в моноклинной и ромбической модификациях L-цистеина. Обнаружены низкотемпературный фазовый переход в DL-цистеине и влияние на него скорости изменения температуры, размера частиц и способа их получения.

Впервые обнаружены вызываемые давлением фазовые переходы в моноклинной полиморфной модификации L-цистеина и DL-цистеине. Показано, что относительно небольшое повышение давления (0,1 ГПа) и понижение температуры приводят к образованию одной и той же фазы DL-цистеин-II, в то время как при более высоком давлении образуются новые фазы, которые не наблюдаются при понижении температуры.

Обнаружено, что механическое диспергирование моноклинной формы L-цистеина вызывает переход ее в ромбическую модификацию. В то же время, гидростатическое давление не вызывает переходов между двумя полиморфными модификациями L-цистеина, но приводит к серии фазовых переходов в другие, ранее не известные формы, различные для каждой исходной формы.

Показана возможность повысить устойчивость структур кристаллических форм цистеина к изменениям температуры и давления за счет повышения жесткости молекул путем: 1) ацилирования аминогруппы (химическое модифицирование молекулы), 2) сокристаллизации со щавелевой кислотой (образование солей).

Практическая значимость. Исследование влияния температуры и давления на молекулярные кристаллы органических соединений важно для прогнозирования поведения лекарственных препаратов, материалов и устройств на основе молекулярных кристаллов в условиях переменных температур, высоких давлений и при других механических воздействиях. Такие эксперименты предоставляют новые данные для совершенствования теоретических моделей, используемых для предсказания кристаллических структур и конформаций биомолекул в различных условиях.

Обнаруженные в работе эффекты стабилизации частиц DL-цистеина-I в отношении низкотемпературного фазового перехода и частиц DL-цистеина-II в отношении высокотемпературного фазового перехода за счет их диспергирования имеют большое значение для решения проблемы сохранения метастабильных форм молекулярных кристаллов вообще и

цистеина, в частности. То же справедливо для обнаруженного эффекта стабилизации кристаллических структур солей и производных цистеина по сравнению с индивидуальным цистеином в отношении изменения температуры и давления.

Обнаружение возможности получения дисперсной формы DL-цистеина-II методом сублимационной сушки замороженных водных растворов DL-цистеина открывает практический путь получения дисперсных форм DL-цистеина-II, недоступных иными методами.

На защиту выносятся:

– Данные о кристаллических структурах низкотемпературной фазы и фазы высокого давления DL-цистеина, ромбической и моноклинной форм оксалата L-цистеина в соотношении 1:1, оксалата DL-цистеина (1:1);

– Данные об изменении КР спектров и картин рентгеновской дифракции для цистеина, его солей и производных при понижении температуры (5-300 K) и повышении давления (от атмосферного до 5-9 ГПа), а также заключение о соответствующих изменениях молекулярной конформации и водородных связей;

– Заключение о незначительных структурных изменениях в моноклинной модификации L-цистеина и протекании фазовых переходов в ромбической модификации L-цистеина и в DL-цистеине при варьировании температуры, сделанное на основании данных КР спектроскопии и рентгеновской дифракции;

– Заключение о фазовых переходах в моноклинной и ромбической модификациях L-цистеина и DL-цистеине при повышении давления, сделанное на основании данных КР спектроскопии и рентгеновской дифракции;

– Заключение о стабилизации по отношению к фазовым переходам при понижении температуры и повышении давления кристаллических структур оксалатов DL-цистеина (1:1 и 1:2) и N-ацетил-L-цистеина;

– Данные о наличии значительного гистерезиса и существовании размерного эффекта для низкотемпературного фазового перехода в DL-цистеине;

– Данные о влиянии способа получения дисперсных частиц на возможность протекания фазового перехода между полиморфными модификациями DL-цистеин-I и DL-цистеин-II при изменении температуры;

– Данные о возможности получения высоко дисперсной фазы DL-цистеина-II методом сублимационной сушки замороженных водных растворов;

– Данные о процессах фазообразования при нагревании замороженных водных растворов DL-цистеина в вакууме, полученные методом рентгеновской дифракции.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на всероссийских и международных конференциях, среди которых VI Национальная конференция по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов (Москва, 2007), XXI Congress of the International Union of Crystallographers (Япония, 2008), VI International Conference on Mechanochemistry and Mechanical Alloying (Индия, 2008), International School of Crystallography (Италия, 2009), International Conference Indaba-6 on Structure and Properties (ЮАР, 2009), 11th International Conference on Pharmacy and Applied Physical Chemistry (Австрия, 2010), International School of Crystallization (Испания, 2010), XV Симпозиум по межмолекулярным взаимодействиям и конформациям молекул (Петрозаводск, 2010), 26th European Crystallographic Meeting (Германия, 2010).

Личный вклад соискателя. Автор участвовал в постановке задач, решаемых в рамках диссертационной работы, лично готовил все образцы для экспериментов, в том числе – монокристаллы, проводил основные эксперименты, обрабатывал результаты, принимал участие в интерпретации полученных данных и подготовке статей к публикации. КР эксперименты при низких температурах для L- и DL-цистеина выполнены совместно с д.х.н. Б.А. Колесовым. КР эксперименты по исследованию L-цистеина и DL-цистеина при высоких давлениях были выполнены совместно с к.ф.-м.н. С.В. Горяйновым. В экспериментах по изучению низкотемпературного фазового перехода в DL-цистеине методом порошковой рентгеновской дифракции принимал участие Н.А. Туманов, совместно с ним проводилась расшифровка кристаллической структуры низкотемпературной фазы DL-цистеина-II. Данные ИК спектроскопии были получены совместно с к.х.н. Ю.А. Чесаловым. Данные монокристальной рентгеновской дифракции при переменных температурах для структуры оксалата DL-цистеина (1:2) и часть дифракционных данных для ромбической модификации L-цистеина получены к.х.н. Т.Н. Дребущак. Данные ДСК получены к.х.н. В.А. Дребущаком. Данные сканирующей электронной микроскопии получены к.х.н. Н.А. Рудиной и к.б.н. А.А. Огиенко. Метод получения монокристаллов DL-цистеина был разработан совместно с С.Н. Бизяевым. Получение дисперсных образцов DL-цистеина методом криогенной сублимационной сушки и исследование дифракционной картины в ходе кристаллизации DL-цистеина из замороженных стекол при нагревании в вакууме методом рентгеновской дифракции *in situ* проводилось совместно с к.х.н. А.Г. Огиенко.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 9 статьях в рецензируемых журналах, и представлены в виде 17 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, заключения и списка литературы. Работа изложена на ___ страницах машинописного текста, содержит ___ рисунков и ___ таблиц. Список цитируемой литературы включает ___ наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цели и задачи работы, отражены научная новизна, практическая значимость диссертации, защищаемые положения, апробация работы, личный вклад соискателя.

Первая глава представляет собой литературный обзор, посвященный описанию исследований аминокислот вообще и в кристаллическом состоянии, в частности. Описаны общие принципы построения кристаллических структур аминокислот, обсуждается роль водородных связей между амино- и карбоксильными группами, а также природы бокового фрагмента в формировании структуры. Особое внимание уделено обзору работ, направленных на изучение слабых водородных связей, образованных сульфгидрильной группой в инертных матрицах, растворах, биомолекулах (белки, пептиды) и кристаллах. Отмечается высокая информативность колебательной спектроскопии для исследования контактов сульфгидрильной группы в растворе и в биополимерах; рассматривается возможность использования этого метода как дополнения к дифракционным исследованиям при изучении водородных связей сульфгидрильной группы в кристаллах. Проведен анализ современного состояния исследования кристаллических аминокислот при низких температурах и высоких давлениях. На основании анализа литературных источников обоснованы выбор цели исследования, постановка задач работы, выбор объектов и методов исследования.

Вторая глава посвящена описанию методик экспериментов. В ней описываются исходные реактивы, использованные для получения кристаллических образцов L- и DL-цистеина и его производных, методики синтеза и кристаллизации. Дается описание инструментальных методов исследования (монокристальная и порошковая дифракция, в том числе, с использованием синхротронного излучения; ИК и КР спектроскопия; ДСК; электронная микроскопия), использованных приборов и программного обеспечения для сбора, первичной обработки и последующего анализа полученных данных. В частности, подробно описаны методы реализации дифракционных и спектроскопических экспериментов при варьировании температуры и давления *in situ*.

В третьей главе описаны результаты исследования конформационной лабильности цистеина в различном кристаллическом окружении при нормальных условиях. Проанализированы конформации аминокислоты и межмолекулярные водородные связи в кристаллических структурах,

известных до начала данной работы (моноклинной и ромбической полиморфных модификаций L-цистеина, DL-цистеина, N-ацетил-L-цистеина, оксалата DL-цистеина (1:2), манделата и тартрата L-цистеина) и в новых структурах, полученных в ходе выполнения работы (ромбическая и моноклинная формы оксалата L-цистеина (1:1), оксалат DL-цистеина (1:1)). Результаты сопоставлены с конформациями, наблюдаемыми для цистеина в растворах, а также рассчитанными теоретически для изолированных молекул цистеина. Обсуждается взаимосвязь кристаллических структур L- и DL-цистеина, его солей, а также N-ацетил-L-цистеина с конформацией молекул и типом образуемых водородных связей. Заключения о конформации цистеиновых фрагментов и об их взаимодействии с кристаллическим окружением в структуре, в частности, о водородных связях, образуемых сульфгидрильной группой, сделаны на основании сопоставления результатов дифракционных экспериментов и данных о колебательных спектрах.

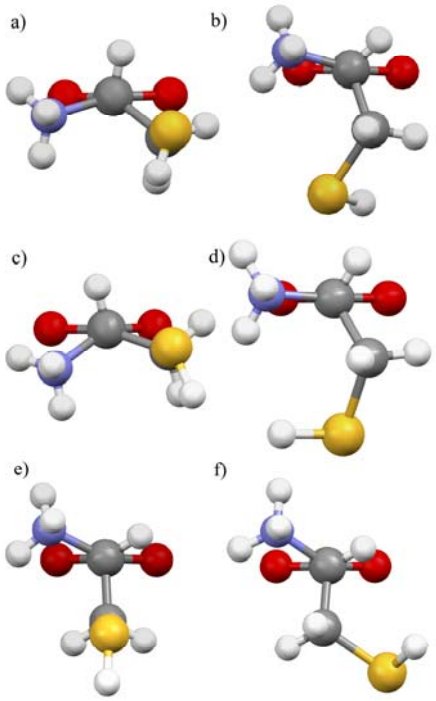

Рис. 1. Конформация L-цистеина в разном кристаллическом окружении: (a) оксалат L-цистеина ($P2_12_12_1$), (b) L-цистеин ($P2_12_12_1$), (c) оксалат DL-цистеина (1:2) (P-1), (d) и (f) две молекулы в независимой части L-цистеина ($P2_1$) (e) DL-цистеин-I ($P2_1/a$).

Примеры конформаций L-цистеина, реализуемых в разных кристаллических структурах, приведены на Рис. 1. По принятой терминологии, ориентация бокового фрагмента аминокислоты соответствует ***gauche+*** конформации, если торсионный угол N-C-C-S составляет ~ +60°, либо ***gauche-*** конформации, если торсионный угол N-C-C-S составляет ~ -60°. В моноклинной и ромбической модификациях L-цистеина цвиттер-ион находится в ***gauche+*** конформации. Конформация одной из двух молекул независимой части моноклинной модификации L-цистеина описывается ***gauche+*** конформацией, а другой – ***trans*** конформацией с торсионным углом N-C-C-S

около 180°. В результате образования солей L-цистеина с щавелевой, миндальной и винной кислотами за счет вращения бокового фрагмента происходит обращение конформации ***gauche+***, в конформацию ***gauche-***. Полученная новая моноклинная структура оксалата L-цистеина (1:1) (пр. гр. C2), характеризуемая конформацией цистеина ***gauche+***, возможно, является кристаллогидратом и является нестабильной – при хранении в комнатных условиях происходит разрушение кристалла. В DL-цистеине при нормальных условиях и в оксалате DL-цистеина (1:2) аминокислота находится в ***gauche-*** конформации. При образовании оксалата DL-цистеина (1:1) происходит смена конформации на ***gauche+***. Ацилирование L-цистеина с образованием N-ацетил-L-цистеина не изменяет ориентацию бокового фрагмента и тип конформации по сравнению с L-цистеином.

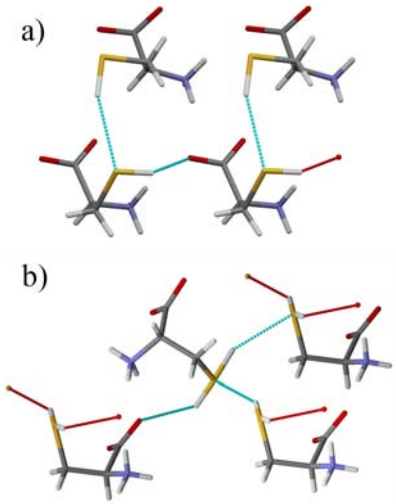

Рис. 2. Разупорядочение сульфгидрильной группы в моноклинном (a) и ромбическом (b) L-цистеине.

Водородные связи, образованные сульфгидрильной группой цистеина, также различны в разных структурах. В рацемическом DL-цистеине реализуются S-H…S водородные связи. В ромбическом L-цистеине при комнатной температуре сульфгидрильная группа разупорядочена и может участвовать в образовании двух типов водородных связей: S-H…O и S-H…S. В моноклинном L-цистеине эта группа также разупорядочена, однако в этом случае один тип молекул из двух в независимой части образует исключительно S-H…O водородные связи, другой – только S-H…S (Рис. 2). В результате ацилирования, в N-ацетил-L-цистеине аминогруппа образует единственную водородную связь N-H…S, которая раньше не наблюдалась в других цистеин-содержащих структурах. Сульфгидрильная группа находится в упорядоченном состоянии и образует исключительно S-H…O водородные связи. В оксалате DL-цистеина (1:2) и в ромбическом оксалате L-цистеина (1:1) реализуются S-H…O водородные связи, тогда как в двух других оксалатах сульфгидрильная группа не образует направленных водородных связей.

Кристаллические структуры DL-цистеина и его оксалатов, а также моноклинная модификация L-цистеина и его оксалат являются слоистыми: с прочными N-H…O водородными связями внутри слоя и слабыми

взаимодействиями между слоями. Для ромбической модификации L-цистеина и его оксалата (1:1), а также для N-ацетил-L-цистеина характерны каркасные структуры.

В четвертой главе приводятся результаты исследования влияния температуры на кристаллическую структуру и динамику молекулярных групп в кристаллах L-цистеина, DL-цистеина, N-ацетил-L-цистеина и оксалатов цистеина.

В ромбической модификации L-цистеина понижение температуры вызывает упорядочение ориентации сульфгидрильной группы и изменения в межмолекулярных водородных связях, затрагивающих эту группу. Преобладающими при низкой температуре становятся водородные связи S-H…S. Изменение ориентации -SH группы при понижении температуры было детально проанализировано на основании данных КР спектроскопии с использованием поляризованного излучения и ориентированных монокристаллов. Так, при комнатной температуре в области колебаний -SH группы наблюдались широкая полоса при ~2560 см$^{-1}$ и ее плечо при ~2540 см$^{-1}$ (Рис. 3), которые относятся к водородным связям S-H…O и S-H…S, соответственно. Соотношение интегральной интенсивности для этих полос составляет ~1:1, что согласуется с монокристальными рентгеноструктурными данными (одинаковая заселенность двух позиций протона -SH группы) и свидетельствует о равновероятном образовании двух контактов. Охлаждение образца приводит к вырождению колебаний при ~2560 см$^{-1}$, и уже с 80 K основной вклад начинает вносить полоса, отвечающая колебаниям -SH группы, участвующей в образовании S-H…S водородной связи. При 3 K в КР спектре доминирует только одна полоса при ~ 2513 см$^{-1}$. Структурные изменения в ромбическом L-цистеине проявляются также в ИК спектрах и в дифракционных данных.

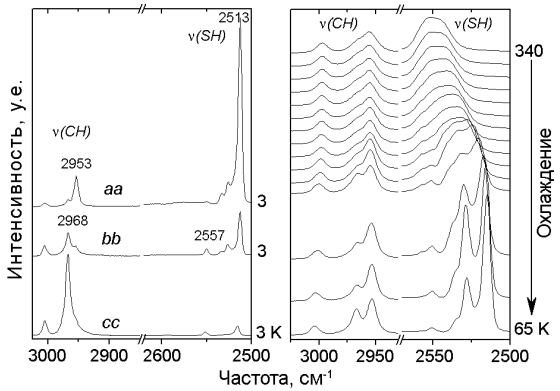

Рис. 3. Поляризованные КР спектры ромбического L-цистеина при охлаждении.

Влияние охлаждения на моноклинную модификацию L-цистеина значительно отличалось от влияния на ромбическую форму. По данным ДСК, фазовых переходов не наблюдалось. Методом рентгеновской дифракции не было выявлено прерывистой зависимости в изменении

параметров и объема элементарной ячейки, которые могли бы свидетельствовать о структурном фазовом переходе, однако наблюдался явный излом на кривых V(T), a(T), b(T), c(T) вблизи 240-250 K. Аномалии в этом же температурном интервале наблюдали также методом неупругого рассеяния нейтронов.

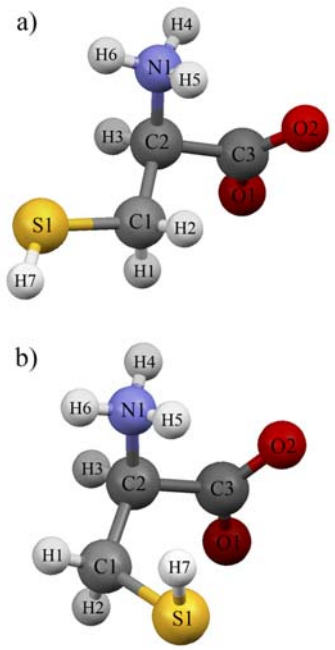

Рис. 4. Конформация цвиттер-иона в DL-цистеине-I (a) и DL-цистеине-II (b).

Кристаллы DL-цистеина являются первым примером рацемического кристалла аминокислоты, для которого обнаружен фазовый переход при охлаждении. Вблизи 206 K происходит фазовый переход первого рода с разрушением монокристалла и скачкообразными изменениями параметров элементарной ячейки и КР спектра во всем диапазоне. При этом образующаяся низкотемпературная фаза, DL-цистеин-II, сохраняет пространственную группу ($P2_1/a$). Используя затравку низкотемпературной фазы и проводя процесс кристаллизации вблизи 0°C, удалось получить монокристалл низкотемпературной фазы и расшифровать его кристаллическую структуру. Было выяснено, что в ходе фазового перехода боковой фрагмент аминокислоты проворачивается вдоль связи C1-C2 почти на 120°, в результате чего происходит обращение его конформации с ***gauche-*** на ***gauche+*** (Рис. 4). Также происходит смена типа водородной связи с S-H…S на S-H…O, что подтверждается изменениями в КР спектрах: при 300 K присутствует полоса около 2568 см$^{-1}$, отвечающая колебаниям -SH группы участвующей в образовании S-H…S водородной связи, а при 200 K – около 2547 см$^{-1}$, что соответствует S-H…O водородной связи. Несмотря на общее уменьшение объема элементарной ячейки, после фазового перехода, все водородные связи N-H…O в DL-цистеине-II удлиняются.

Фазовый переход является обратимым с очень большим гистерезисом. На температуру фазового перехода влияет скорость охлаждения / нагревания и размер частиц. На Рис. 5 приведены кривые ДСК, полученные при охлаждении образцов, представляющих собой различные по размеру частицы. Более крупные кристаллы претерпевали фазовый

переход в диапазоне температур 210-240 K (кривые a и b), тогда как для растертого вручную в ступке образца (кривая c) эффектов на кривой ДСК не наблюдалось. Методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что размер частиц в измельченном образце составлял ~ 1 μм. Предельный размер частиц, которые получались из крупных кристаллов после многократных фазовых переходов в циклах охлаждение / нагревание, составлял 10-20 μм. Таким образом, уменьшение размера частиц всего на один порядок позволило сохранить метастабильную фазу DL-цистеина в широком интервале температур. Исследование изменений кристаллической структуры измельченного образца при охлаждении до 3 K показало наличие аномалии вблизи 175 K, сопровождающейся скачкообразным изменением параметров элементарной ячейки и объема. Тем не менее, дифрактограммы и КР спектры для образца при температурах ниже 175 K не соответствовали фазе DL-цистеин-II, образующейся из крупных кристаллов. При этом относительное уменьшение объема элементарной ячейки составляло 1,52(2)%, что примерно вдвое меньше по сравнению с изменением объема при фазовом переходе DL-цистеин-I → DL-цистеин-II. На основании полученных дифрактограмм можно предположить либо образование двух новых фаз (DL-цистеин-II и неизвестная фаза) при охлаждении растертого образца, либо образование новой низкотемпературной фазы (DL-цистеин-I)'. Порошковая дифрактограмма имеет несколько общих рефлексов с дифрактограммой фазы DL-цистеин-II, но не совпадает с ней. Согласно данным КР спектроскопии, при 10 K в кристаллической структуре присутствуют одновременно несколько молекул с различными конформациями, сульфгидрильные группы которых вовлечены в образование различных водородных связей. Структурные изменения, тем не менее, оказываются недостаточно велики, чтобы быть зафиксированными методом ДСК.

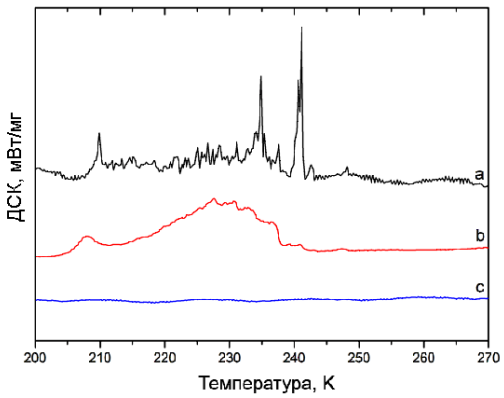

Рис. 5. Кривые ДСК при охлаждении разных образцов DL-цистеина: (a) крупные кристаллы 0,4-0,1 мм, (b) товарный реактив 0,3-0,01 мм и (c) измельченный в ступке образец ~ 1 μм.

Была сопоставлена также устойчивость DL-цистеина в отношении низкотемперного фазового перехода, если дисперсные частицы были приготовлены разными способами - растиранием в ступке (рассмотренный выше образец) или методом лиофильной сушки водных растворов DL-цистеина. Как показали дифракционные и КР спектроскопические исследования, лиофильная сушка давала исключительно фазу DL-цистеин-II. Такой образец мог сохраняться в метастабильном состоянии при нагревании до 363 K, после чего переходил в DL-цистеин-I. Мелкие частицы DL-цистеина-I, полученные нагреванием мелких частиц DL-цистеина-II, затем полностью переходили назад в фазу DL-цистеина-II при охлаждении до 183 K (Рис. 6).

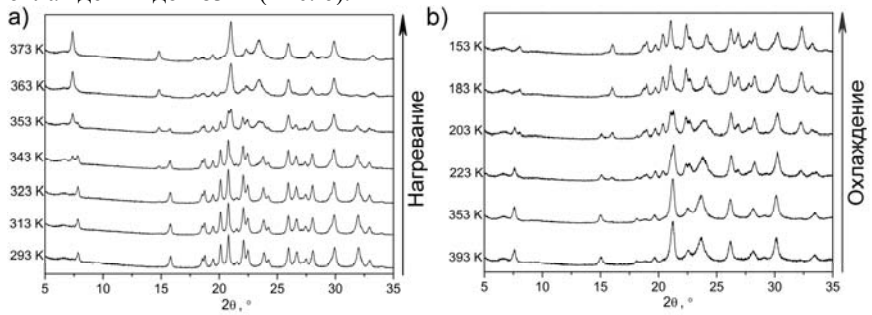

Рис. 6. Порошковые дифрактограммы от образца, полученного методом лиофильной сушки при нагревании (a) и при последующем охлаждении (b).

Проведенные исследования показали, что важную роль в протекании фазовых переходов при охлаждении L- и DL-цистеина играет конформационная гибкость молекулы, обусловленная легкостью поворота бокового фрагмента и способностью сульфгидрильной группы легко образовывать и легко разрывать относительно слабые связи с соседними атомами S и O в кристаллической структуре. Мы предположили, что можно повысить устойчивость структуры к протеканию фазовых переходов, если ограничить подвижность бокового фрагмента. Это было подтверждено в экспериментах, описанных в заключительном разделе главы 4. Была продемонстрирована возможность предотвратить протекание низкотемпературных фазовых переходов в цистеин-содержащих кристаллических структурах при охлаждении от комнатной температуры вплоть до 3 K за счет изменения конформационной жесткости молекул путем ацилирования аминогруппы (химическое модифицирование молекулы), либо путем сокристаллизации со щавелевой кислотой (образование солей).

В **пятой главе** сопоставлено влияние давления на две полиморфные модификации L-цистеина - ромбическую и моноклинную, на DL-цистеин,

а также на оксалаты DL-цистеина и на N-ацетил-L-цистеин. В качестве методов исследования были избраны рентгеновская дифракция и очень чувствительная к окружению сульфгидрильной группы КР спектроскопия.

Высокие давления вызывают намного более существенные изменения в кристаллической структуре L- и DL-цистеина, по сравнению с варьированием температуры. Обе полиморфные модификации L-цистеина, как моноклинная, так и ромбическая, претерпевают фазовые переходы. На Рис. 7 приведены КР спектры для двух форм L-цистеина при повышении давления. В случае ромбического L-цистеина фазовые переходы характеризуются существенными изменениями в конформации бокового радикала (с ***gauche+*** на ***gauche-***) и уменьшением разупорядоченности -SH группы с сохранением S-H…O водородных связей. Повышение давления не приводит к существенным изменениям конформации цвиттер-ионов в моноклинной форме L-цистеина, в основном изменения затрагивают водородные связи, образованные сульфгидрильной группой аминокислоты. Все фазовые переходы являются обратимыми. Тем не менее, при сбросе давления в ромбическом L-цистеине появляется новая промежуточная фаза R^{III}, существующая в узком интервале давлений 0,9-2,1 ГПа, которая не образовывалась при повышении давления. Интересным является тот факт, что при повышении давления ни моноклинная, ни ромбическая модификация не переходят друг в друга, и, более того, каждая превращается в "свою" уникальную фазу высокого давления.

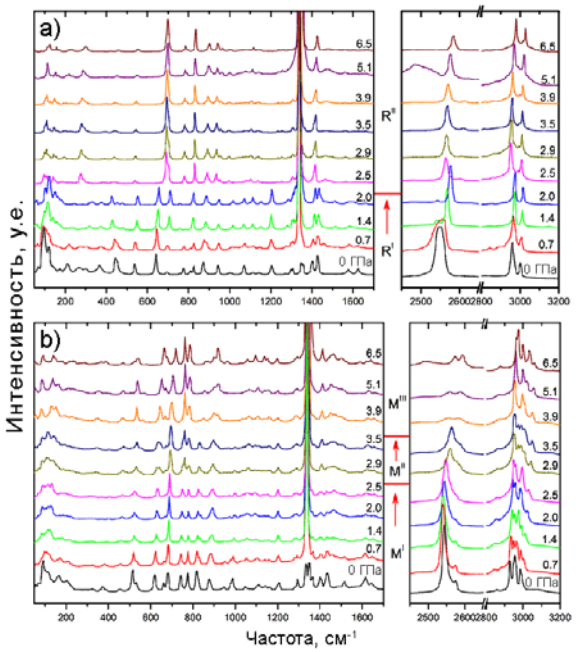

Рис. 7. КР спектры при повышении давления для a) ромбического и b) моноклинного L-цистеина.

DL-цистеин претерпевает целую серию фазовых переходов с повышением давления, давая фазы, которые характеризуются, так же как и

в случае ромбического L-цистеина, значительными изменениями в кристаллической структуре. На Рис. 8 приведены дифрактограммы DL-цистеина при повышении давления. Первая фаза, существующая при малых давлениях (до ~ 1,2 ГПа), совпадает с низкотемпературной фазой DL-цистеина. Все фазовые переходы обратимы и протекают без гистерезиса.

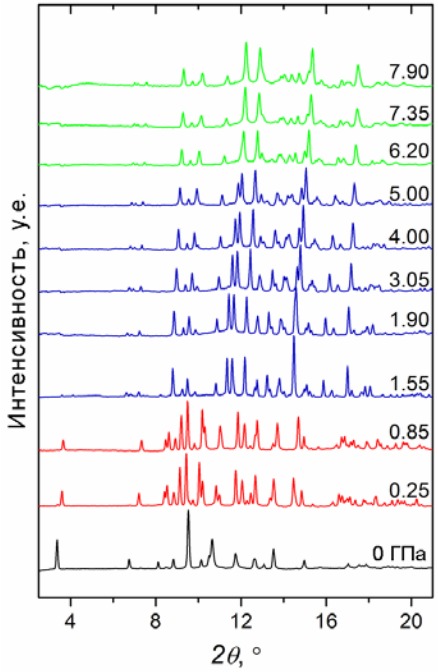

Рис. 8. Порошковые рентгенограммы при повышении давления для DL-цистеина.

Анализ межмолекулярных контактов при помощи расчета поверхностей Хиршфельда показал, что при переходе от структуры DL-цистеина-I к структуре DL-цистеина-II, короткие контакты S…H, обусловленные наличием водородных связей S-H…S, исчезают, но, в то же время, число средних по длине контактов, соответствующих взаимодействию сульфгидрильной группы с C-H группами, увеличивается. В результате изменения ориентации бокового фрагмента аминокислоты в ходе фазового перехода DL-цистеин-I → DL-цистеин-II, проигрыш в энергии при разрыве водородных связей S-H…S компенсируется образованием более прочных связей S-H…O и слабых, но многочисленных контактов C-H…S.

Дальнейшее сжатие структуры DL-цистеина приводило к качественно иным структурным искажениям, чем сжатие той же структуры при охлаждении, что было обусловлено, прежде всего, гораздо большей величиной сжатия под давлением (изменение давления с 0,25 ГПа всего только до 0,85 ГПа уже приводит к объемному сжатию в 3,09(1)%, в то время как даже при охлаждении до 3 K относительное изменение объема составляет всего 1,3%). Основные различия касались изменений в водородных связях D-H…A. Анализ изменений в системе водородных связей при повышении давления позволяет предположить, что следующий фазовый переход DL-цистеин-II → DL-цистеин-III при ~1,55 ГПа обусловлен образованием полноценной бифуркационной связи N-H...O в

структуре. Подобный эффект – образование бифуркационной водородной связи – ранее наблюдался при фазовых переходах в кристаллах β-, γ-глицина и L-серина. Таким образом, если при относительно небольших давлениях ~ 0,25 ГПа фазовый переход с образованием фазы DL-цистеина-II обусловлен значительными изменениями в слабых водородных связях с участием сульфгидрильной группы аминокислоты, то при достижении более высоких давлений следующий фазовый переход с образованием фазы DL-цистеина-III проходит по механизму, характерному для большинства других аминокислот – с изменением сетки более сильных водородных связей N-H…O.

Как показали исследования кристаллических фаз цистеина, способность молекул цистеина изменять конформацию за счет поворота бокового фрагмента играет важную роль в протекании фазовых переходов не только при понижении температуры, но и при повышении давления. Изменение кристаллической структуры путем образования солей (например, оксалатов), либо путем химического модифицирования молекулы (например, ацилирования цистеина в N-ацетил-L-цистеине) позволило стабилизировать структуру в отношении повышения давления, подобно тому, как это было ранее реализовано в отношении охлаждения. Как в спектрах КР, так и на порошковых дифрактограммах вплоть до самых высоких давлений, достигнутых в экспериментах (~8 ГПа в КР спектроскопии и ~9,5 ГПа в дифракционных экспериментах), наблюдали непрерывные изменения, соответствующие анизотропному сжатию кристаллических структур.

Выводы

1. Показано, что цистеин в кристаллах обладает высокой конформационной лабильностью. Конформация аминокислоты существенно зависит от кристаллического окружения и внешних условий (низкие температуры, высокие давления).
2. Обнаружено, что при понижении температуры кристаллический DL-цистеин претерпевает фазовый переход первого рода с резким изменением конформации молекул и разрывом части водородных связей; в ромбической модификации L-цистеина происходит растянутый в широком температурном диапазоне фазовый переход, связанный с упорядочением сульфгидрильных боковых фрагментов, но не затрагивающий основной структурный каркас; в моноклинной модификации L-цистеина происходят лишь незначительные структурные изменения, мало затрагивающие конформации молекул.
3. Установлено, что на низкотемпературный фазовый переход в DL-цистеине влияют скорость изменения температуры, размер частиц, а также способ получения дисперсных частиц. Данный результат является перспективным для разработки приемов хранения метастабильных

кристаллических модификаций молекулярных кристаллов в широком интервале температур.

4. Показано, что повышение давления вызывает серию фазовых переходов в DL-цистеине. Относительно небольшое повышение давления (0,1 ГПа) и понижение температуры приводят к образованию одной и той же фазы DL-цистеин-II, в то время как при более высоком давлении образуются новые фазы, не наблюдающиеся при понижении температуры.
5. Обнаружено, что механическое диспергирование моноклинной формы L-цистеина вызывает переход ее в ромбическую модификацию. В то же время, гидростатическое давление не вызывает переходов между двумя полиморфными модификациями L-цистеина, но приводит к серии фазовых переходов в другие, ранее не известные формы, различные для каждой исходной формы.
6. Установлено, что устойчивость структур кристаллических форм цистеина к изменениям температуры и давления может быть повышена за счет повышения жесткости молекул путем: 1) ацилирования аминогруппы (химическое модифицирование молекулы), 2) сокристаллизации со щавелевой кислотой (образование солей).

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Minkov, V.S. L-Cysteinium semioxalate / V.S. Minkov, E.V. Boldyreva // Acta Cryst. C – 2008. – Vol. 64. – P. o344-o348.
2. Pressure-induced phase transitions in crystalline L- and DL-cysteine / V.S. Minkov, A.S. Krylov, E.V. Boldyreva, S.V. Goryainov [et al.] // J. Phys. Chem. B Letters – 2008. – Vol. 112. – P. 8851-8854.
3. Миньков, В.С. Исследование влияния температуры на ИК-спектры кристаллических аминокислот, дипептидов и полиаминокислот. IV L-цистеин и DL-цистеин / В.С. Миньков, Ю.А. Чесалов, Е.В. Болдырева // Журнал структурной химии – 2008. – Т. 49, № 6. – С. 1062-1074.
4. Kolesov, B.A. Phase transitions in the crystals of L- and DL-cysteine on cooling: the role of the hydrogen-bond distortions and the side-chain motions of thiol-groups. 1. L-cysteine / B.A. Kolesov, V.S. Minkov, E.V. Boldyreva, T.N. Drebushchak // J. Phys. Chem. B – 2008. – Vol. 112. – P. 12827-12839.
5. Phase transitions in the crystals of L- and DL-cysteine on cooling: the role of the hydrogen-bond distortions and the side-chain motions. 2. DL-cysteine / V.S. Minkov, N.A. Tumanov, B.A. Kolesov, E.V. Boldyreva [et al.] // J. Phys. Chem. B – 2009. – Vol. 113. – P. 5262-5272.
6. Minkov, V.S. DL-cysteinium semioxalate / V.S. Minkov, E.V. Boldyreva // Acta Cryst. C – 2009. – Vol. 65. – P. o245-o247.
7. Raman study of pressure-induced phase transitions in crystals of orthorhombic and monoclinic polymorphs of L-cysteine: dynamics of the side chain / V.S. Minkov, S.V. Goryainov, E.V. Boldyreva, C.H. Görbitz // J. Raman Spectrosc. – 2010. – Vol. 41. – P. 1748-1758.

8. Observation of subtle dynamic transitions by a combination of neutron scattering, X-ray diffraction and DSC: A case study of the monoclinic L-cysteine / H.N. Bordallo, E.V. Boldyreva, J. Fischer, M.M. Koza [et al.] // Biophys. Chem. – 2010. – Vol. 148. – P. 34-41.

9. Low temperature / high pressure polymorphism in DL-cysteine / V.S. Minkov, N.A. Tumanov, E.V. Boldyreva, R.Q. Cabrera // CrystEngComm – 2010. – Vol. 12. – P. 2551-2560.

10. Миньков, В.С. Сравнительное исследование кристаллических структур L- и DL- аминокислот / В.С. Миньков, Е.В. Болдырева // Материалы XLV Международной научной студенческой конференции, секция «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии», 4 – 8 апреля, 2007, Новосибирск. – С. 13.

11. Исследование L-цистеина в температурном интервале 100-300 K методами монокристальной рентгеновской дифракции и ИК-спектроскопии / В.С. Миньков, Е.В. Болдырева, Т.Н. Дребущак, Ю.А. Чесалов // Тезисы VI Национальной конференции по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов, 12 – 17 ноября, 2007, Москва. – С. 138.

12. Миньков, В.С. Влияние температуры на ИК-спектры кристаллического L- и DL-цистеина / В.С. Миньков, Е.В. Болдырева, Ю.А. Чесалов // Тезисы Российской конференции по физике для студентов, аспирантов и молодых ученых, 19 – 23 ноября, 2007, Владивосток. – С. 76-77.

13. Миньков, В.С. Исследование L-цистеина и DL-цистеина в интервале температур 100-350 K и давлений 0-6,5 ГПа методами монокристальной и порошковой рентгеновской дифракции, КР- и ИК-спеткроскопии. Фазовые переходы // Материалы XLVI Международной научной студенческой конференции, секция «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии», 2 – 6 апреля, 2008, Новосибирск. – С. 23.

14. Туманов, Н.А. Расшифровка структуры новой метастабильной полиморфной модификации DL-цистеина по порошковой и монокристальной рентгеновской дифракции / Н.А. Туманов, В.С. Миньков // Материалы XLVI Международной научной студенческой конференции, секция «Физические методы исследования твердых веществ», 2 – 6 апреля, 2008, Новосибирск. – С. 241.

15. Миньков, В.С. Исследование влияния температуры на водородные связи в кристаллах L-, DL-аланина, L-, DL-серина и L-, DL-цистеина методом ИК-спектроскопии / В.С. Миньков, Е.В. Болдырева, Ю.А. Чесалов // Материалы XVIII Российской конференции для молодых ученых «Проблемы теоретической и экспериментальной химии», 7–11 апреля, 2008, Екатеринбург. – С. 386-387.

16. Raman spectroscopy and X-ray diffraction study of low-temperature phase transitions in L- and DL-cysteine / V.S. Minkov, N.A. Tumanov, B.A. Kolesov, E.V. Boldyreva // Seminar on combined application of Raman spectroscopy and X-ray diffraction in physics, chemistry, biology, materials sciences, June 18 – 19, 2008, ESRF, Grenoble, France, electronic version.

17. Raman spectroscopy study of high-pressure phase transitions in L- and DL-cysteine / V.S. Minkov, A.S. Krylov, E.V. Boldyreva, S.V. Goryainov [et al.] // Seminar on combined application of Raman spectroscopy and X-ray diffraction in physics, chemistry, biology, materials sciences, June 18 – 19, 2008, ESRF, Grenoble, France, electronic version.

18. Structure-property relationships in the crystals of chiral amino acids and their racemic counterparts / V.S. Minkov, E.V. Boldyreva, T.N. Drebushchak, B.A. Kolesov [et al.] // Abstracts of XXI Congress of the International Union of Crystallographers, Osaka, Japan, August 23 – 31, 2008. – P. C34-35.

19. Grinding as a tool of preserving (!) metastable polymorhs / V.S. Minkov, V.A. Drebushchak, Yu.A. Chesalov, E.V. Boldyreva // Abstracts of VI International Conference on Mechanochemistry and Mechanical Alloying, INCOME-2008, Jamshedpur, India, December 1 – 4, 2009. – P. 54.

20. Миньков, В.С. Размерный эффект в DL-цистеине. Измельчение как метод стабилизации метастабильных полиморфных модификаций // Материалы XLVII Международной научной студенческой конференции, секция «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии», 11 – 15 апреля, 2009, Новосибирск. – С. 6.

21. Pressure-induced phase transitions in chiral and racemic crystalline cysteine / V.S. Minkov, A.S. Krylov, E.V. Boldyreva, S.V. Goryainov [et al.] // Lecture notes and poster abstracts of International School of Crystallography, June 4 – 14, Erice, Italy, 2009. – Vol. 2. – P. 663.

22. The smaller are particles, the longer is the storage. Size-effect in DL-cysteine / V.S. Minkov, A.S. Krylov, V.A. Drebushchak, E.V. Boldyreva // Abstracts of International Conference Indaba6 Structure and properties, August 30 – September 4, 2009, Berg-en-Dal, Kruger National Park, South Africa. – P. 140-141.

23. Minkov, V.S. Grinding as a tool of preserving metastable polymorphic modifications. Size effect in DL-cysteine / V.S. Minkov, E.V. Boldyreva, V.A. Drebushchak // Workbook of the 11th International Conference on Pharmacy and Applied Physical Chemistry, PhandTA 11, February 7 – 10, Innsbruck, Austria, 2010. – P. 24.

24. Minkov, V.S. Crystallization and polymorphism of DL-cysteine / V.S. Minkov, E.V. Boldyreva // Abstracts of International School of Crystallization, May 24-28, Granada, Spain, 2010. – P. 104.

25. Полиморфизм в L- и DL-цистеине / В.С. Миньков, Б.А. Колесов, С.В. Горяйнов, Е.В. Болдырева // Материалы XV Симпозиума по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, 14 – 18 июня, Петрозаводск, 2010. – С.63

26. High-pressure/low-temperature polymorphism in chiral and racemic cysteine / V.S. Minkov, B.A. Kolesov, S.V. Goryainov, E.V. Boldyreva / Proceedings of 26th European Crystallographic Meeting (ECM 26), 29 August - 02 September, Darmstadt, 2010. Abstracts (Acta Cryst. (2010). A66). – P. s239.

Подписано в печать 09.03.2011 г.
Формат 60x84 1/16
Заказ №
Офсетная печать. Объем 1,5 п.л.
Тираж 100 экз.
Редакционно-издательский центр НГУ.
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2.