

## Исследование комплексообразования в системе медь(II)—L-гистидин—D-орнитин методом спектроскопии ЭПР

Н. П. Крюкова, С. Н. Болотин, В. Т. Панюшкин\*

Кубанский государственный университет,  
Российская Федерация, 350040 Краснодар, ул. Ставропольская, 149.  
Факс: (861 2) 69 9517. E-mail: NMR\_ESR@chem.kubsu.ru

Методом спектроскопии ЭПР изучено равновесие в системе медь(II)—L-гистидин—D-орнитин в водном растворе в интервале pH 2—11. При анализе формы линии в спектрах растворов при различных pH и соотношениях концентраций металл : лиганд обнаружено, что наряду с бинарными образуются разнолигандные комплексы состава  $\text{Cu}(\text{OrnH})(\text{HisH}_2)^{4+}$ ,  $\text{Cu}(\text{OrnH}_2)(\text{HisH})^{3+}$  и  $\text{Cu}(\text{Orn})(\text{His})$ . Определены константы устойчивости,  $g$ -факторы, константы СТВ и релаксационные параметры, а также сделаны предположения о структуре комплексов.

**Ключевые слова:** медь(II), D-орнитин, L-гистидин, разнолигандные комплексы, спектроскопия ЭПР, анализ полной формы линии в спектрах ЭПР.

Соединения биометаллов с аминокислотами являются моделями комплексов металлов с белками в организмах человека и животных. Большинство процессов, протекающих в организме, включает в себя взаимодействие ионов металла с несколькими лигандами. Известно<sup>1</sup>, что при транспортировке металлов большую роль играют смешаннолигандные комплексы с участием двух аминокислот.

Исследование процессов разнолигандного комплексообразования в растворе методом ЭПР затрудняется тем, что зачастую сигналы комплексов различного состава сильно перекрываются друг с другом, поскольку параметры спектров (ширина линии и положение сигналов) слабо чувствительны к изменению координационного окружения.

Методами полярографии<sup>2</sup>, УФ- и КД-спектроскопии<sup>3</sup>, а также потенциометрии<sup>4</sup> изучены разнолигандные комплексы меди(II) с аминокислотами и определены их константы устойчивости. Использование метода ЭПР позволяет наряду с параметрами, определяющими термодинамическую устойчивость комплексных частиц, выявлять их структурные характеристики.

В предыдущих работах<sup>5–9</sup> для нахождения параметров образующихся комплексов мы применяли программу компьютерного моделирования спектров ЭПР жидких растворов бинарных систем, содержащих  $\text{Cu}^{\text{II}}$  и органический лиганд при различных pH и концентрационных соотношениях металл : лиганд. При обработке экспериментальных данных достигнута хорошая сходимость теоретических и экспериментальных спектров, определены относительные концентрации и константы устойчивости комплексов, образующихся в растворе.

Цель данной работы — разработка алгоритма расчета характеристик комплексных соединений в ра-

створе методом ЭПР при наличии равновесий разного типа без ограничения количества и состава частиц для исследования разнолигандных комплексов в системе, содержащей медь(II) и две аминокислоты (L-гистидин и D-орнитин).

### Экспериментальная часть

Использовали  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , полученный растворением навески металлической меди («ч.д.а.») в  $\text{HNO}_3$  («ч.д.а.»), гидрхлориды D-орнитина и L-гистидина (оба «ч.д.а.»). Растворы аминокислот готовили весовым методом. Для поддержания постоянной ионной силы применяли 1 M раствор  $\text{KNO}_3$  («х.ч.»), pH измеряли иономером ЭВ-74, откалиброванным по двум буферным растворам.

Спектры ЭПР растворов записывали на спектрометре «Radiopan SE/X 2543» со встроенным ЯМР-магнитометром JTM (точность определения магнитной индукции  $2 \cdot 10^{-5}$  Тл). Точное значение частоты находили по спектру дифенилпикрилгидразила. Ввод экспериментальных спектров в память компьютера осуществляли с помощью специально разработанного интерфейса, подключенного к спектрометру.

Зарегистрированы спектры ЭПР растворов, содержащих медь(II) ( $C_{\text{Cu}} = 0.05$  моль  $\cdot$  л<sup>-1</sup>) и аминокислоты в соотношениях  $C_{\text{Cu}} : C_{\text{His}} : C_{\text{Orn}} = 1 : 1 : 1, 1 : 1 : 2, 1 : 2 : 2, 1 : 1 : 4$ , при pH от 2 до 11.

Практически все спектры исследуемых растворов состояли из суммы спектров отдельных частиц. В этом случае наиболее надежным методом определения спектральных характеристик является сравнение теоретических спектров с экспериментальными путем их компьютерного моделирования. При интерпретации спектров использовали разработанный нами программный комплекс<sup>10</sup>. Он позволяет автоматически определять параметры ЭПР и константы устойчивости комплексов из спектра, представляющего собой суперпозицию нескольких комплексных форм.

Основными частями программы являются: блок расчета мольных долей компонентов системы, который использует

стандартную процедуру решения системы уравнений материального баланса<sup>11</sup>; блок расчета формы линии спектра ЭПР; блок оптимизации искомых параметров методами сканирования и координатного спуска.

Экспериментальный спектр ЭПР обычно описывают как свертку гауссовой и лоренцевой форм линий. Для построения теоретического спектра использовали метод суперпозиции кривых Лоренца, дающий удовлетворительное соответствие во всех случаях. Неоднородное уширение экспериментального сигнала учитывали введением неразрешенной СТС, что, на наш взгляд, является более корректным. Влияние анизотропии СТВ неспаренного электрона с ядром металла на ширину линии определяли согласно теории Вильсона—Кивельсона<sup>12,13</sup>:

$$\Delta H_i = \alpha + \beta m_i + \gamma m_i^2,$$

где  $m_i$  — значение проекции ядерного спина,  $\Delta H_i$  — ширина соответствующей компоненты СТС.

Релаксационные параметры ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ),  $g$ -фактор частиц, константы СТВ и константы устойчивости комплексов рассчитывали путем их оптимизации до достижения минимума функции  $F$

$$F = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i^{\text{exp}} - Y_i^{\text{theor}})^2. \quad (1)$$

где  $N$  — число экспериментальных точек,  $Y_i$  — интенсивность соответствующего сигнала в спектре ЭПР.

Одновременное нахождение большого числа независимых параметров представляет собой сложную вычислительную задачу, поэтому ее решали в несколько этапов. Для увеличения точности определяемых значений параметров одновременно обрабатывали до четырех спектров, зарегистрированных при различных рН и соотношениях компонентов.

На первом этапе проводили оптимизацию четырех экспериментальных спектров, записанных при одинаковом соотношении  $C_{\text{Cu}} : C_{\text{His}} : C_{\text{Orn}}$  и близких значениях рН. При этом определяли параметры соединений (не более трех), преобладающих в равновесной системе. Сначала в качестве процедуры оптимизации использовали метод сканирования, позволяющий избежать попадания в локальный минимум функции, описываемой уравнением (1).

На следующем этапе для уточнения полученных значений обрабатывали спектры при различных значениях рН и составов растворов, когда в последних могло присутствовать большее число частиц. Данная процедура расчетов не накладывает никаких ограничений на количество форм комплексов, параметры которых могут определяться одновременно.

Процесс минимизации прекращали, когда дальнейшее варьирование параметров практически не приводило к уменьшению функции  $F$  и достигалось визуальное совпадение теоретического и экспериментального спектров. Используя значения конечных шагов варьирования параметров при окончании оптимизации, рассчитывали ошибки их определения.

Достоверность результатов обеспечивалась большим числом экспериментальных точек (для системы со смешаннолигандным комплексообразованием обрабатывали 80 спектров, содержащих 800—1000 точек) и низким значением  $F = 0.003-0.005$  (спектры нормировали на единицу). На рисунке 1 представлены экспериментальный и расчетный спектры одного из исследованных растворов.

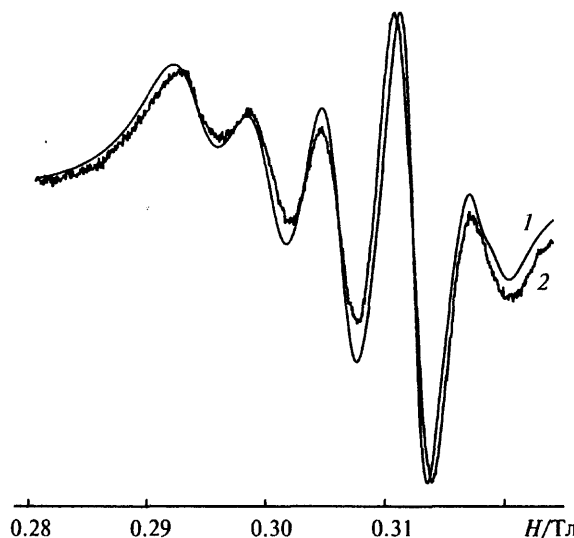


Рис. 1. Теоретический (1) и экспериментальный (2) спектры ЭПР раствора с соотношением  $C_{\text{Cu}} : C_{\text{His}} : C_{\text{Orn}} = 1 : 2 : 2$  при рН 2.81.

### Обсуждение полученных результатов

Первоначально были определены параметры бинарных комплексов меди(II) с D-орнитином и L-гистидином, представленные в табл. 1. Найденные значения констант устойчивости сопоставимы с величинами, полученными другими методами (см. лит.<sup>14,15</sup>). В дальнейшем эти результаты использовали при обработке спектров ЭПР комплексов, содержащих медь(II) и обе названные выше аминокислоты.

Обработка данных для нескольких серий растворов, содержащих медь(II) и аминокислоты в различных соотношениях, показала, что наилучшая сходимость достигается при учете наличия в системе трех разнолигандных комплексов, параметры которых

Таблица 1. Константы устойчивости ( $K$ ) и значения структурных ( $g$ ,  $A$ ) и релаксационных ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) параметров исследуемых комплексных соединений в 1 M растворе  $\text{KNO}_3$  при 25 °C

Комплекс	lgK	g	A	$\alpha$ - $\beta$	
				мТл	
Cu(H <sub>2</sub> His)	13.9(2)	2.1579(2)	5.01(2)	3.6	1.1
Cu(H <sub>2</sub> His) <sub>2</sub>	20.0(4)	2.1339(2)	5.53(3)	2.9	0.8
CuHis	10.7(2)	2.1201(2)	6.19(3)	3.0	1.3
Cu(HHis)(His)	10.6(2)	2.1166(2)	7.60(2)	3.2	1.1
Cu(His) <sub>2</sub>	17.1(1)	2.1191(1)	8.22(1)	3.5	1.0
Cu(H <sub>2</sub> Orn)	10.4(2)	2.1474(2)	6.01(2)	5.2	0.7
Cu(H <sub>2</sub> Orn) <sub>2</sub>	20.4(2)	2.1263(2)	5.55(2)	3.0	0.8
Cu(HOrn)	7.6(2)	2.1333(2)	5.83(3)	3.9	1.4
Cu(HOrn) <sub>2</sub>	14.4(1)	2.1286(1)	7.19(2)	3.7	2.6
Cu(H <sub>2</sub> Orn)(HOrn)	17.5(2)	2.1160(2)	6.22(2)	2.9	1.7

Примечание. В скобках приведена погрешность в определении последних цифр. Здесь и в табл. 2 заряды комплексов не указаны.  $K = ([\text{Cu}_p\text{L}_q\text{H}_r]) / ([\text{Cu}]^p[\text{L}]^q[\text{H}]^r)$  (L — His или Orn).

**Таблица 2.** Константы устойчивости ( $K$ ) и значения структурных ( $g$ ,  $A$ ) и релаксационных ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) параметров системы медь(II)—L-гистидин—D-орнитин в 1 M растворе  $\text{KNO}_3$  при 25 °C

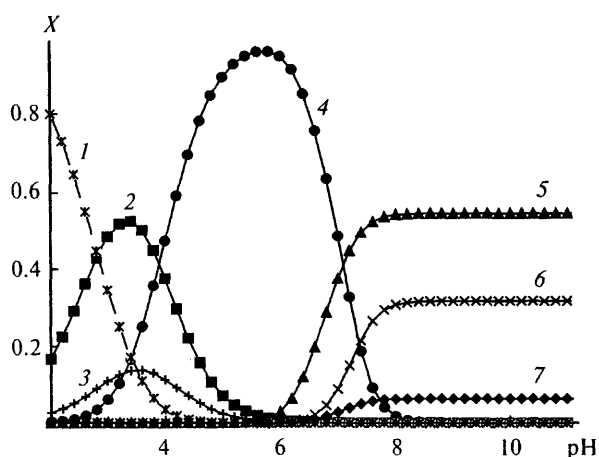
Комплекс	$\lg K^*$	$g$	$A$	$\alpha$ — $\beta$	
				мТл	
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{H}_2\text{His})$	37.4(1)	2.1560(2)	6.02(2)	3.5	0.8
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{HHis})$	33.9(1)	2.1141(2)	5.02(2)	2.0	0.7
$\text{Cu}(\text{Orn})(\text{His})$	16.3(1)	2.1197(1)	7.26(1)	4.1	1.1

\*  $K = ([\text{Cu}_p\text{His}_q\text{Orn}_s\text{H}_r]) / ([\text{Cu}]^p[\text{His}]^q[\text{Orn}]^s[\text{H}]^r)$ .

представлены в табл. 2. Кривые распределения комплексов для серии с соотношением  $C_{\text{Cu}} : C_{\text{His}} : C_{\text{Orn}} = 1 : 2 : 4$  представлены на рис. 2.

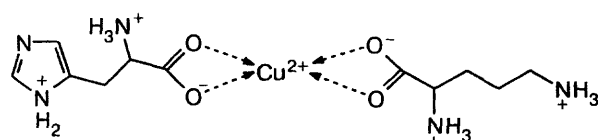
Из-за различий кислотно-основных свойств лигандов реализуется тот или иной тип координации в зависимости от величины pH. В области pH 1.5—3.5 присутствует комплекс, в котором оба лиганда координированы через карбоксильную группу. Такому типу координации соответствуют параметры гамилтониана, приведенные в табл. 2, что согласуется с нашими и литературными<sup>16</sup> данными для бинарных комплексов.

При pH 2—5 образуется комплекс  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{HHis})]^{3+}$ , имеющий anomalно низкое значение константы СТС. В соответствии с данными, представленными ранее<sup>17,18</sup>, это может свидетельствовать об искажении плоскоквадратной конфигурации координационного узла. На наш взгляд, это происходит вследствие участия в координации карбоксильной группы и атома N имидазольного кольца гистидина с образованием семичленного хелатного цикла. Согласно литературным источникам<sup>19</sup>, такие бинарные комплексы не наблюдаются в водных растворах, но по данным ИК-спектроскопии<sup>20</sup> существуют в твердой фазе.

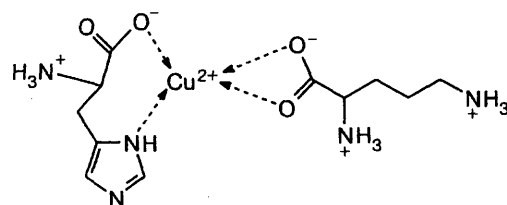


**Рис. 2.** Зависимость мольных долей ( $X$ ) комплексных соединений от pH в растворе с соотношением концентраций  $C_{\text{Cu}} : C_{\text{Orn}} : C_{\text{His}} = 1 : 4 : 2$ : 1 —  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{H}_2\text{His})$ , 2 —  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{HHis})$ , 3 —  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{HOrn})$ , 4 —  $\text{Cu}(\text{HOrn})_2$ , 5 —  $\text{Cu}(\text{His})_2$ , 6 —  $\text{Cu}(\text{Orn})_2$ , 7 —  $\text{Cu}(\text{Orn})(\text{His})$ .

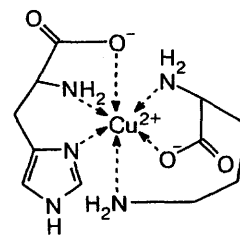
В щелочной области присутствует комплекс  $\text{Cu}(\text{Orn})(\text{His})$ , в котором параметры спин-гамилтониана соответствуют нахождению в экваториальной плоскости трех атомов азота<sup>19</sup> и, по-видимому, осуществляется дополнительное связывание в аксиальной плоскости через карбоксильную группу гистидина и  $\omega$ -аминогруппу орнитина. При pH > 11 спектры не претерпевают никаких изменений. Это свидетельствует о том, что координированная в аксиальном положении молекула  $\text{H}_2\text{O}$  не подвергается депротонированию и таким образом косвенно подтверждается занятость аксиальных положений третьей донорной группой лиганда. Ниже представлены предполагаемые структуры разнолигандных комплексов меди(II) с L-гистидином и D-орнитином.



$\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{H}_2\text{His})$



$\text{Cu}(\text{H}_2\text{Orn})(\text{HHis})$



$\text{Cu}(\text{Orn})(\text{His})$

Таким образом, нами показана принципиальная возможность исследования сложных равновесий обработкой полной формы линии большого количества слабозапрещенных спектров ЭПР жидких растворов.

#### Список литературы

1. К. Б. Яцимирский, *Проблемы бионеорганической химии*, Знание, Москва, 1976, 64 с.
2. A. M. T. Sanz, P. J. C Rodriguez, and M. F. J. Garcia, *Chem. Commun.*, 1992, 57, 1405.
3. O. Yamauchi and A. Odani, *Inorg. Chim. Acta*, 1985, 100, 165.
4. M. M. Shoukry, E. M. Khairy, and R. G. Khalil, *Trans. Met. Chem.*, 1997, 22, 465.

- кс  
о-  
й  
у-  
ь-  
и-  
ы  
ь-  
о-  
т-  
я  
й  
о-  
и)
5. С. Н. Болотин, В. Т. Панюшкин, А. В. Вашук, *Журн. структур. химии*, 1997, **38**, 385 [*Russ. J. Struct. Chem.*, 1997, **38** (Engl. Transl.)].
6. В. Т. Панюшкин, В. Д. Буикликий, С. Н. Болотин, *Применение метода матрицы спиновой плотности в спектроскопии ЯМР и ЭПР*, Просвещение-Юг, Краснодар, 1999, 115 с.
7. С. Н. Болотин, В. Т. Панюшкин, *Журн. общ. химии*, 1998, **68**, 1034 [*Russ. J. Gen. Chem.*, 1998, **68** (Engl. Transl.)].
8. А. И. Шестакин, Н. Н. Буков, С. Н. Болотин, В. Т. Панюшкин, *Журн. общ. химии*, 2001, **71**, 1438 [*Russ. J. Gen. Chem.*, 2001, **71** (Engl. Transl.)].
9. S. N. Bolotin, V. A. Abramenko, and I. A. Nikolaenko, *J. Mol. Liq.*, 2001, **91**, 219.
10. И. А. Николаенко, В. Т. Панюшкин, С. Н. Болотин, *Программный комплекс расчета параметров спектров ЭПР комплексных соединений  $Cu^{II}$  с различными органическими лигандами*, Кубанский государственный университет, Краснодар (Россия), 2002.
11. М. И. Булатов, *Расчеты равновесий в аналитической химии*, Химия, Ленинград, 1984, 185 с.
12. D. Kivelson and G. Collins, in *Paramagnetic Resonance. Vol. 2*, Academic Press, New York, 1962, 496.
13. R. Wilson and D. Kivelson, *J. Chem. Phys.*, 1966, **44**, 154.
14. I. Sovago, T. Kiss, and A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1978, 964.
15. T. P. A. Kruck and B. Sarkar, *Can. J. Chem.*, 1973, **51**, 3549.
16. D. B. McPhail and B. A. Goodman, *J. Chem. Res. S.*, 1985, **9**, 276.
17. В. А. Коган, В. В. Зеленцов, Г. М. Ларин, В. М. Луков, *Комплексы переходных металлов с гидразонами*, Наука, Москва, 1990, 112 с.
18. Г. М. Ларин, В. А. Колосов, Н. К. Викулова, Г. В. Панова, *Журн. неорган. химии*, 1974, **19**, 1873 [*J. Inorg. Chem. USSR*, 1974, **19** (Engl. Transl.)].
19. T. Szabo-Planka, A. Rockenbauer, L. Korecz, and D. Nagy, *Polyhedron*, 2000, **19**, 1123.
20. R. H. Carlson and T. L. Brown, *Inorg. Chem.*, 1966, **5**, 268.

Поступила в редакцию 13 сентября 2002;  
после доработки — 28 ноября 2002