



УДК 543.424 : 577.164.111

© 1990 г.

С. А. Маскевич, Г. В. Соколов, Л. Н. Кивач,
С. Г. Подтынченко, Н. Д. Стрелькаль, П. В. Ходорченко**

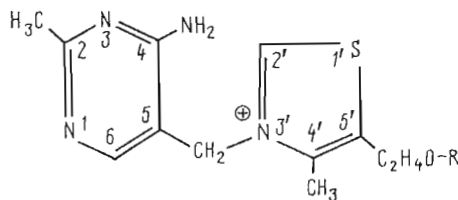
СПЕКТРЫ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ И СТРУКТУРА АДсорБИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ СЕРЕБРА ТИАМИНА, ТИАМИНДИФОСФАТА И ПИРУВАТА

*Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно;
* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Исследованы спектры гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) тиамина, тиаминдифосфата (TDP), аналогов их пиримидинового и тиазольного компонентов и пирувата, адсорбированных на гидрозолях и электродах из серебра при различных потенциалах. Анализ полученных результатов позволил установить, что тиамин адсорбируется на гидрозолях через гетероатом азота и NH_2 -группу пиримидинового компонента, а на электродах, кроме того, через гетероатом S тиазольного компонента. Важную роль в связывании тиаминдифосфата с поверхностью играют гетероатомы N и S тиазольного компонента, а также дифосфатная группа. Геометрия адсорбции тиаминдифосфата существенно зависит от потенциала поверхности. Молекулы пирувата связываются с поверхностью главным образом посредством карбоксильной группы. Обнаружено индуцированное поверхностью специфическое взаимодействие между тиаминдифосфатом и пируватом, причем структура этого комплекса чувствительна к изменению потенциала поверхности.

В настоящее время для изучения биомолекул широко используется метод ГКР света. Применение спектроскопии ГКР позволяет получать информацию о структуре изучаемых молекул, механизмах взаимодействия их с поверхностью металла, а также исследовать зависимость геометрии адсорбции от потенциала поверхности [1].

В данной работе методом ГКР исследованы адсорбированные на поверхности электродов и гидрозолей серебра тиамин, тиаминдифосфат (TDP), аналоги их пиримидинового (2-метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидин) и тиазольного (4-метил-5-гидроксиэтилтиазол)компонентов и пируват. Изучен механизм комплексообразования TDP с пируватом.



$\text{R} = \text{H}$, тиамин $\text{R} = \text{P}_2\text{O}_6\text{H}_3$, TDP

Известно, что TDP — кофермент более десятка ферментативных реакций [2], играющих ключевую роль в обмене веществ. Во многих из них субстратом или кофактором является пируват. Для реакций с участием TDP и пирувата характерно то, что хлорферментный комплекс образуется путем связывания субстрата с входящим в состав активного центра коферментом [3, 4]. Согласно работе [5], центром связывания пирувата является атом углерода в 2'-положении тиазольного цикла TDP. Еще один важный

Сокращения: ГКР — гигантское комбинационное рассеяние, КР — комбинационное рассеяние, TDP — тиаминдифосфат.

аспект взаимодействия пирувата и TDP был обнаружен в работе [6], в которой показано, что пируват влияет на связывание кофермента с ферментом. Однако вопросы механизма взаимодействия TDP с белками и пируватом, а также структуры кофермент-структурного комплекса остаются невыясненными. Трудности связаны с тем, что при физиологических значениях pH не наблюдается неферментативного комплексообразования пирувата с TDP. Его удается регистрировать в щелочной среде и в спиртовых растворах при низких температурах [7, 8].

В связи с этим представляют интерес исследования структуры производных тиамин и пирувата, адсорбированных на поверхности серебра в зависимости от ее потенциала.

Известно [1], что усиление сигнала комбинационного рассеяния органических молекул при их адсорбции на металлическую поверхность можно рассматривать как результат проявления электромагнитного (дальнодействующего) и «молекулярного» (короткодействующего) механизмов. Под «молекулярными механизмами усиления» понимают эффекты, изменяющие матричный элемент КР адсорбированной молекулы за счет перекрытия волновых функций электронных состояний молекулы и металла. Усиление КР в этом случае происходит вследствие образования нового резонансного перехода, связанного с переносом заряда с металла на молекулу [1].

Для интерпретации экспериментальных данных принципиально важно знать относительный вклад этих механизмов. Для оценки вкладов дальнодействующих и короткодействующих механизмов в усиление сигнала КР исследованных соединений был изучен спектр возбуждения адсорбированных на серебряных электродах молекул аналога пиримидинового компонента тиамин. При анализе его спектров ГКР, полученных при различных длинах волн возбуждения в области 450—650 нм (рис. 1), обращает на себя внимание изменение относительных интенсивностей полос, связанных с колебаниями ароматического кольца. Особенно характерно это проявляется для дублета $782/765 \text{ см}^{-1}$. В исследованном интервале длин волн возбуждения интенсивность полосы 782 см^{-1} изменяется незначительно, а зависимость интенсивности полосы 765 см^{-1} имеет выраженный резонансный характер (рис. 1). Полученные результаты позволяют сделать вывод о существовании двух различных механизмов усиления ГКР [9]. Резонансный рост интенсивности спектра возбуждения ГКР в красную область (для полосы 765 см^{-1}) характерен для реализации «молекулярного» механизма усиления, связанного с резонансным КР комплекса молекула—металл [9]. Вклад этого механизма в усиление сигнала КР исследованного производного пиримидина является основным при возбуждении в зелено-красной области спектра. Кроме «молекулярного» механизма заметный вклад в усиление КР вносят электромагнитные механизмы. Об этом свидетельствует слабая зависимость интенсивности ряда полос от длины волны возбуждения в видимой области спектра [10].

Таким образом, полученные результаты показывают, что анализ спектра ГКР исследуемых молекул при возбуждении 514,5 нм следует вести с учетом того, что интенсивность полос зависит от наличия комплекса молекула—металл и его свойств.

Рассмотрим приведенные на рис. 2 спектры ГКР тиамин, аналогов его пиримидинового и тиазольного компонентов и TDP, адсорбированных на гидрозолях серебра. Частоты полос спектров и их отнесение представлены в табл. 1. Наиболее интенсивна в спектре ГКР тиамин полоса 767 см^{-1} полностью симметричных дыхательных колебаний пиримидинового кольца. Эта полоса самая интенсивная также и в спектрах 4-аминопроизводного пиримидина и TDP. В спектрах ГКР незамещенного пиримидина полоса данного колебания имеет частоту 1020 см^{-1} [11]. Деформационным колебаниям пиримидинового цикла, вероятно, принадлежат полосы 611, 1277, 1377 см^{-1} , которые интенсивны в спектрах ГКР тиамин и аналогов его пиримидинового компонента. Эти полосы наблюдаются также в колебательных спектрах других производных пиримидина [12—14]. Полосу 1136 см^{-1} спектра тиамин, по-видимому, можно отнести к валентному

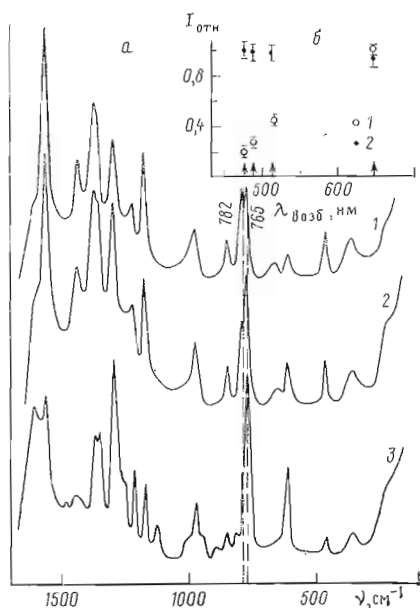


Рис. 1

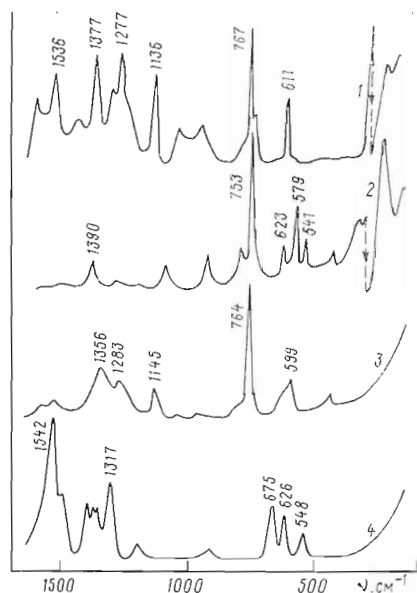


Рис. 2

Рис. 1. Спектры ГКР (а) адсорбированного на поверхности серебряного электрода 2-метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидина при потенциале нулевого заряда серебра при длине волны возбуждения 476,5 (1), 488,0 (2), 514,5 нм (3) и зависимость в этих спектрах интенсивности линий 765 (1) и 782 см^{-1} (2) от длины волны возбуждения (б)

Рис. 2. Спектры ГКР тиамина (1), TDP (2), 2-метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидина (3) в боргидридном и 4-метил-5-гидроксиэтилтиазола (4) в цитратном гидрозоле серебра. Концентрация 10^{-4} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 514,5 нм

колебанию кольцо — аминогруппа ($\text{C}-\text{NH}_2$). Это колебание активно в спектре ГКР 2-метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидина (рис. 2, $\Delta\nu = 1145 \text{ см}^{-1}$) и проявляется в области 1120—1200 см^{-1} в спектрах КР и ГКР цитозина [12] и анилина [15].

Спектры ГКР тиамина и 4-метил-5-гидроксиэтилтиазола (рис. 2) свидетельствуют о том, что колебания тиазольного компонента в спектрах тиамина проявляются слабо (рис. 2). Лишь средней интенсивности полоса 1536 см^{-1} спектра тиамина может быть отнесена к колебаниям $\text{C}=\text{C}$ -связи тиазольного цикла. Это самая интенсивная полоса в спектре ГКР производного тиазола (рис. 2, 4) и колебательных спектрах других пятичленных гетероциклов [16]. Примечательно, что в полученном спектре ГКР тиамина практически не проявляются характерные для серосодержащих гетероциклов полосы колебаний $\text{C}-\text{S}$ -связи в области 600—700 см^{-1} [14, 16]. Следовательно, при адсорбции на поверхности мицелл серебра усиливаются главным образом колебания пиримидинового компонента. Это указывает на то, что молекулы тиамина адсорбируются на поверхности коллоидных частиц серебра посредством пиримидинового компонента. При этом важную роль в адсорбции играет аминогруппа. Тиазольный компонент тиамина, вероятно, удален от поверхности, и поэтому его колебания не усиливаются.

Как видно из рис. 2, спектр ГКР TDP заметно отличается от спектра тиамина. Из полос, принадлежащих к колебаниям пиримидинового компонента, активны в спектре 753 и 579 см^{-1} . Другие полосы колебаний этого компонента малоинтенсивны или вообще не наблюдаются. В то же время в спектре TDP проявляются полосы 541 и 623 см^{-1} колебаний тиазольного компонента. Полоса 541 см^{-1} принадлежит, вероятно, к деформационным колебаниям тиазольного цикла, которые проявляются в этой области частот в спектрах КР пятичленных гетероциклов [16]. Полоса 623 см^{-1} может быть отнесена к валентным $\text{C}-\text{S}$ -колебаниям, так как лежит в области, характерной для этих колебаний [14, 16, 17]

Частоты линий спектров ГКР тиамин, TDP и аналогов их пиримидинового (Р) и тиазольного (Т) компонентов, адсорбированных на гидрозолях серебра ($\lambda_{\text{возб}} 514,5 \text{ нм}$) *

Тиамин	TDP	2-Метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидин	4-Метил-5-гидроксиэтилтиазол	Тип колебания **
222	232	206		Молекула — металл
	541		548	Т (деф.)
611	579	599		Р (деф.)
	623		627	Т (С-S)
			675	Т (С-S)
743				Р (деф.)
767	753	764		Р (дых.)
949	930		940	Т (деф.)
1048	1096			CH ₂ -мостик
1136		1145		С-NH ₂
			1210	Т (С-N)
1277		1283		Р (деф.)
1316			1317	Т (?)
		1356		Р (деф.)
1377	1390			Р (деф.)
			1404	CH ₂ (деф.)
1440				CH ₂ (деф.)
			1510	Т (С=C)
1536				Р (С=C)
		1542	1542	Т (С=C)
1606		1595		Р (С=C)

* Для всех соединений использованы боргидридные гидрозоли, для тиазольного аналога — цитратный.

** деф.— деформационное, дых.— дыхательное.

и активна в колебательных спектрах производных тиазола [18]. Из полученных результатов можно сделать вывод, что TDP имеет иную, чем тиамин, геометрию адсорбции: молекулы TDP связываются с поверхностью как пиримидиновым, так и тиазольным циклами. Учитывая, что полоса колебания C—NH₂ в спектре ГКР TDP не наблюдается, наиболее вероятным центром связывания с поверхностью в пиримидиновом кольце является гетероатом азота. В тиазольном компоненте за связывание отвечает атом серы, так как усиливаются колебания с участием этого гетероатома.

Полученные результаты не дают какой-либо информации о роли дифосфатной группы в связывании молекул TDP с поверхностью коллоидных частиц серебра. В то же время различия в геометрии адсорбции TDP и тиамин, безусловно, связаны с дифосфатной группой. Сравнение частот колебаний пиримидинового кольца, активных в спектрах ГКР TDP и тиамин, показывает, что при введении дифосфатной группы они значительно понижаются (767 → 753, 611 → 579 см⁻¹). Это указывает на наличие взаимодействия между дифосфатной группой и пиримидиновым кольцом. По-видимому, дифосфатная группа образует водородную связь с одним из атомов азота пиримидинового кольца. Взаимное расположение пиримидинового и тиазольного компонентов в молекуле TDP, по данным рентгеноструктурного анализа [19], не противоречит такому выводу, так как угол между плоскостями этих циклов составляет ~110°.

На рис. 3 представлены спектры КР водного раствора и ГКР адсорбированного на боргидридном и цитратном гидрозолях серебра пирувата. Сравнение спектров КР и ГКР показывает, что при адсорбции пирувата на поверхности зольных мицелл усиливаются симметричные валентные колебания группы COO⁻ (~1400 см⁻¹) и валентные колебания связи p¹—C² (~840 см⁻¹). Подобный вид спектров ГКР характерен для неароматических молекул, имеющих карбоксильную группу [1]. Спектры ГКР пирувата, адсорбированного на цитратных и боргидридных золях (рис. 3),

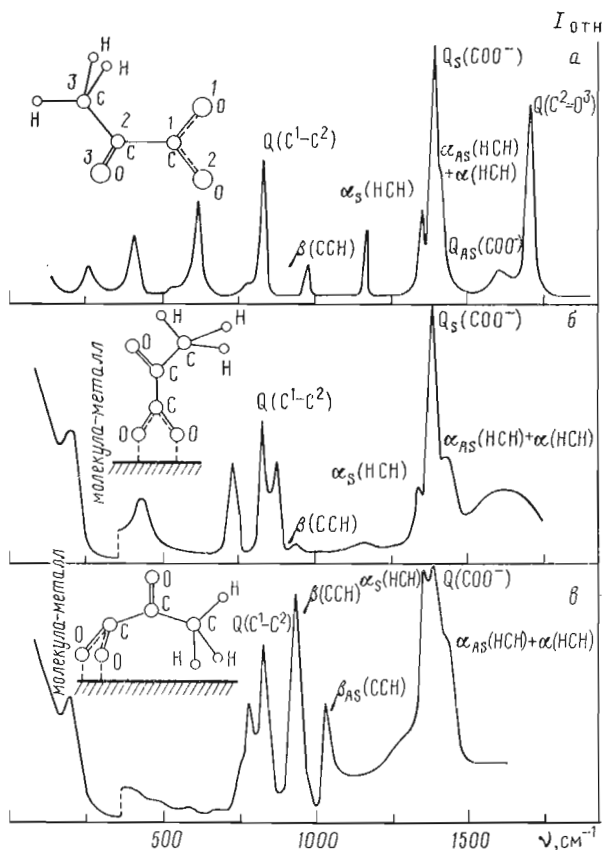


Рис. 3. Спектры ГР водного (рН 4,5) 1 М раствора пирувата (а) и ГР пирувата в боргидридном (б) и цитратном (в) гидрозольях серебра. Концентрация 10^{-3} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 514,5 нм. Отнесение полос и их обозначение дано по работе [20]

заметно различаются интенсивностью полос метильной группы. Высокая интенсивность полос ($\sim 940, 1030, 1360$ и 1430 см^{-1}) деформационных колебаний этой группы [20] на цитратном золе свидетельствует о взаимодействии с поверхностью металла. Интенсивная полоса валентных колебаний α -карбонильной группы ($\sim 1710 \text{ см}^{-1}$) не проявляется в спектрах ГР. Это свидетельствует о том, что карбонильная группа экспонирована в растворитель и ее колебания не усиливаются поверхностью.

На основании вышеизложенного можно предположить две модели взаимодействия пируват — золя (рис. 3). На боргидридном золе связывание с поверхностью осуществляется посредством карбоксильной группы. На цитратном золе непосредственно с поверхностью серебра взаимодействует карбоксильная и метильная группы. Причиной различий в геометрии адсорбции пирувата может быть более высокий по сравнению с с цитратным потенциал боргидридного золя. Влияние потенциала на структуру исследуемых соединений может быть изучено путем анализа спектров ГР, полученных в электрохимической ячейке.

Рассмотрим спектры ГР тиамин, TDP и аналога их пиридинового компонента, адсорбированных на поверхности серебряных электродов при различных потенциалах. В спектре ГР 4-аминопроизводного пиридина (рис. 4) активны колебания пиридинового кольца и аминогруппы. Наиболее эффективно взаимодействие молекулы с металлом для потенциала нулевого заряда серебряного электрода ($-0,65 \text{ В}$). При повышении потенциала до $-0,1 \text{ В}$ наблюдается равномерное уменьшение интенсивности полос спектра.

В спектре ГР тиамин (рис. 5) по сравнению с 2-метил-4-амино-5-этоксиметилпиридином (рис. 4) появляется группа полос средней и

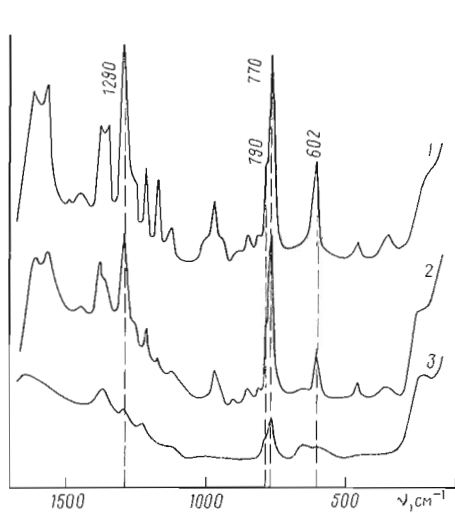


Рис. 4

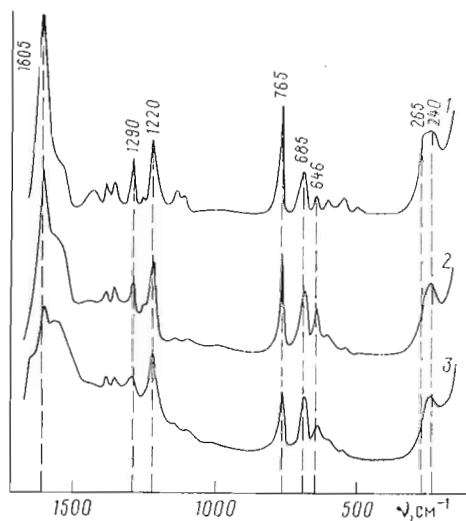


Рис. 5

Рис. 4. Спектры ГКР 2-метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидина, адсорбированного на поверхности серебряного электрода при $-0,65$ (1), $-0,5$ (2) и $-0,3$ В (3). Концентрация 10^{-4} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 514,5 нм

Рис. 5. Спектры ГКР тиамина, адсорбированного на поверхности серебряного электрода при $-0,65$ (1), $-0,5$ (2) и $-0,1$ В (3). Концентрация 10^{-4} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 514,5 нм

высокой интенсивности, связанных с тиазольным кольцом: 1220, 685, 646, 545 см^{-1} . Полоса 1220 см^{-1} отнесена к валентному С—N-колебанию, поскольку наблюдается в колебательных спектрах тиазола и отсутствует в спектрах тиафена [16].

Из описанных результатов вытекает, что для молекулы тиамина существуют два возможных сайта, взаимодействующих с положительно заряженной поверхностью серебра:

1) через NH_2 и, возможно, гетероатомы азота пиримидинового компонента; наиболее характерные колебания: 1605, 1290, 1140, 765, 603 и ~ 265 см^{-1} (рис. 5);

2) гетероатомы N и S в тиазольном кольце; наиболее характерные колебания 1220, 685, 646 и 240 см^{-1} (рис. 5). В области положительных потенциалов происходит существенное уменьшение интенсивностей полос колебаний пиримидинового компонента тиамина, что указывает на десорбцию соответствующих групп атомов. В то же время интенсивность ГКР от тиазольного компонента молекулы остается практически неизменной.

В спектрах ГКР адсорбированного на поверхности электродов TDP (рис. 6, табл. 2) в отличие от тиамина (рис. 5) при потенциале нулевого заряда серебра появляется интенсивная полоса 1632 см^{-1} , которую можно отнести к колебаниям связи С=N в тиазольном кольце, а также происходит перераспределение интенсивности в дублете 680 и 665 см^{-1} и сдвиг частот полос 1220 \rightarrow 1210, 646 \rightarrow 618 см^{-1} . Кроме того, наблюдается заметное уменьшение интенсивности полосы 1140 см^{-1} , колебания С— NH_2 и скелетных колебаний пиримидинового кольца 1290 и 603 см^{-1} . Эти различия спектров ГКР TDP и тиамина связаны, вероятно, с тем, что в присутствии двух фосфатных групп изменяется распределение электронной плотности в тиазольном цикле и существенную роль в адсорбции начинает играть его атом азота.

Наличие двух отрицательно заряженных фосфатных групп сдвигает оптимум адсорбции TDP по сравнению с тиаминном в сторону более положительных потенциалов ($\kappa -0,45 \div -0,5$ В, рис. 6). При потенциалах $-0,2 \div -0,1$ В происходит резкое уменьшение интенсивности всех полос в спектре, что указывает на удаление от поверхности металла пиримидинового и тиазольного циклов. При этих потенциалах молекулы TDP, вероятно, адсорбируются на поверхности только посредством наиболее

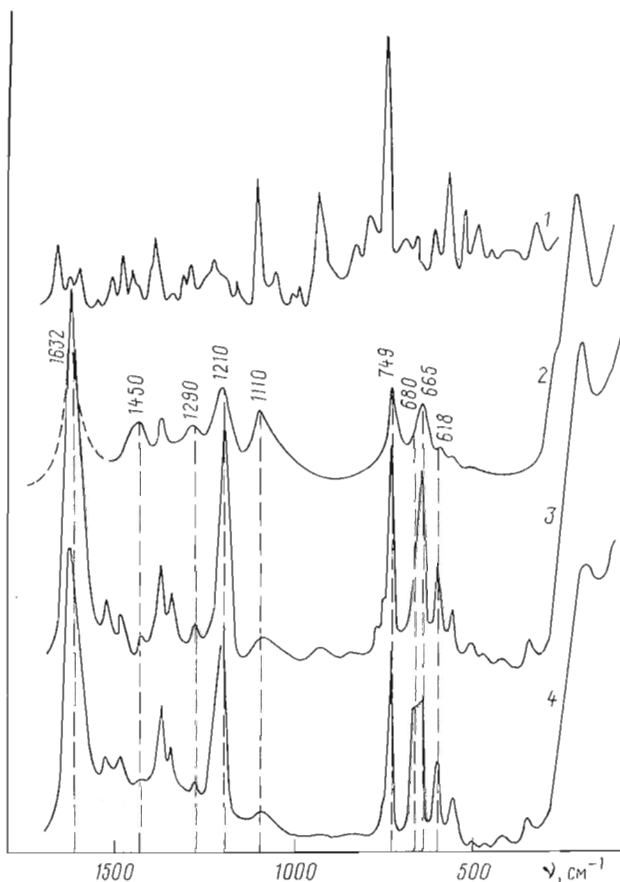


Рис. 6. Спектр КР водного (рН 7,0) 0,1 М раствора ТДР (1) и спектры ГКР ТДР, адсорбированного на поверхности серебряного электрода при $-0,65$ (2), $-0,5$ (3) и $-0,3$ В (4). Концентрация 10^{-4} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 514,5 нм

отрицательно заряженной дифосфатной группы. Одновременно с этим при изменении потенциала от $-0,65$ до $-0,1$ В происходит изменение относительной интенсивности ряда полос (рис. 7, табл. 2). Увеличивается относительная интенсивность полосы 680 см^{-1} и уменьшается относительная интенсивность полос 1632 , 1210 и особенно 1110 и 1450 см^{-1} . Две последние полосы, вероятно, связаны с колебаниями метиленового мостика, так как они не наблюдались в спектрах КР и ГКР аналогов пиримидинового и тиазольного компонентов тиамина. Происходящие при повышении потенциала электрода изменения спектра ГКР ТДР указывают на то, что атом серы, как и в случае с тиамином, начинает играть существенную роль при адсорбции на положительно заряженную поверхность ($\varphi > -0,5$ В).

Таким образом, с помощью спектров ГКР обнаруживаются две области потенциалов электрода, при которых имеют место изменения структуры комплекса ТДР — металл. При потенциалах электрода, больших $-0,4 \div -0,5$ В, изменения в адсорбционном слое обусловлены непосредственным взаимодействием с поверхностью атома серы тиазольного цикла. При $\varphi > -0,2$ В связывание молекул ТДР с поверхностью металла так же, как и с белком, обеспечивается дифосфатной группой.

Данные по спектрам ГКР смеси ТДР с пируватом (рис. 7, 8, табл. 2) показывают, что пируват существенно влияет на адсорбцию ТДР на поверхности серебра. Отметим, что спектры ГКР пирувата в наших экспериментальных условиях не наблюдались. При потенциале электрода $-0,5$ В пируват способствует увеличению интенсивности спектра и приводит к высокочастотному сдвигу полос, связанных с колебаниями тиа-

Частоты и относительные интенсивности (в скобках) линий спектров КР (водных растворов) и ГКР (адсорбированных на Ag-электродах при различных потенциалах) TDP и его комплекса с пируватом (1 : 13) ($\lambda_{\text{возб}} 514,5 \text{ нм}$) *

Водный раствор	TDP				TDP+пируват			Тип колебаний
	-0,65 В	-0,5 В	-0,3 В	-0,1 В	-0,5 В	-0,3 В	-0,1 В	
	232	220	218	220	230	220	210	Молекула - металл
582	575 (10)	579 (18)	579 (24)	579 (20)	580 (19)	576 (16)	580 (16)	Г (деф.)
628	620 (10)	618 (36)	618 (40)	618	622 (28)	625 (44)	625 (75)	Т (деф.)
672	665 (70)	662 (80)	665 (70)					Т (C-S)
700	680 (30)	680 (30)	680 (60)	680 (70)	685 (85)	679 (117)	676 (135)	Г (C-S)
755	749 (100)	749 (100)	749 (100)	749 (100)	755 (100)	756 (100)	756 (100)	Г (дых.)
1111	1112 (75)	1110 (12)	1110 (15)		1120 (9)	1120 (10)	1120 (10)	Метиленовый мостик
1235	1210 (100)	1208 (108)	1211 (90)	1217 (50)	1218 (115)	1220 (150)	1218 (120)	Т (C-N)
1302	1290 (12)	1290 (10)	1290 (7)		1286 (10)	1290 (12)	1290 (10)	Г (деф.)
1350		1352 (25)	1355 (25)		1356 (25)	1356 (25)	1355 (25)	Г (деф.)
1393	1380 (33)	1378 (33)	1379 (45)	1375 (35)	1379 (30)	1380 (33)	1378 (37)	Г (деф.)
					1402 (16)	1401 (10)		CH ₃ (деф.)
1460	1450 (40)	1430 (10)	1430 (5)					CH ₂ (деф.)
1516		1490 (16)	1490 (16)		1490 (10)	1495 (14)	1495 (15)	Т (C=C)
1553		1532 (16)	1532 (16)		1540 (25)	1545 (30)	1540 (25)	Р (C=C)
1603		1590 (40)			1590 (59)	1598 (70)	1595 (40)	Р (C=C)
1633	1632 (200)	1630 (180)	1632 (140)	1633 (140)	1640 (150)	1650 (173)	1651 (175)	Т (C=N)
1665								

* Обозначения см. табл. 1.

зольного кольца и полносимметричным дыхательным колебанием пиримидинового кольца. Наибольший сдвиг претерпевают полосы C-N (1210 → 1218 см⁻¹), метиленового мостика (1110 → 1120 см⁻¹) и C=N (1630 → 1640 см⁻¹). Заметно увеличивается относительная интенсивность полосы 685 см⁻¹.

Повышение потенциала электрода от -0,5 до -0,1 В приводит к значительному росту интенсивности всех полос спектра (рис. 7, 8). Кроме того, увеличивается относительная интенсивность полос 622, 685 и 1640 см⁻¹ (табл. 2), полоса 685 см⁻¹ (C-S) претерпевает низкочастотный, а полосы валентных колебаний двойных связей (особенно C=N) высокочастотный сдвиги.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в адсорбированном слое помимо молекул TDP имеются молекулы пирувата, причем положительно заряженная поверхность индуцирует взаимодействие между ними. Увеличение интенсивности всего спектра, а также относительной интенсивности полос тиазольного компонента по отношению к пиримидиновому при повышении потенциала электрода указывает, по-видимому, на появление в результате взаимодействия TDP и пирувата избыточного отрицательного заряда в районе тиазольного кольца. Таким образом, поскольку пируват не влияет на спектры ГКР отдельно взятого пирими-

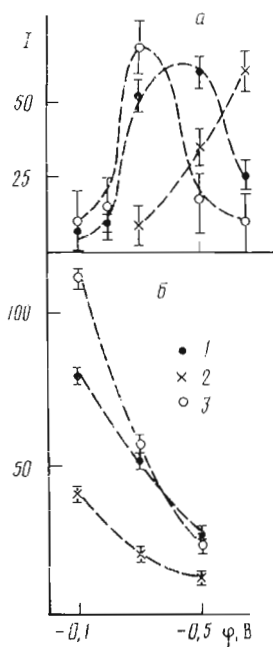


Рис. 7

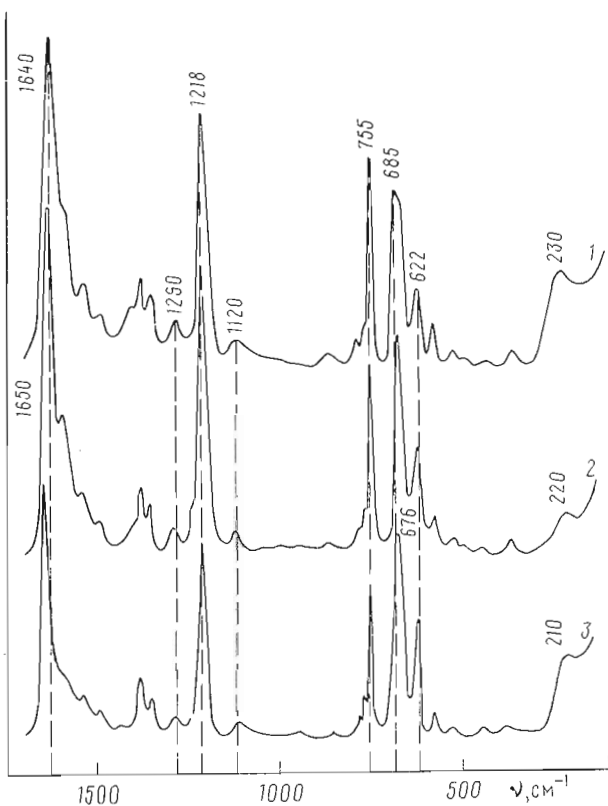


Рис. 8

Рис. 7. Зависимость интенсивности полос 750 (1), 1110 (TDP) или 1120 (TDP + пируват) (2) и 680 см^{-1} (3) спектров ГКР TDP (а) и смеси TDP + пируват в молярном соотношении 1 : 13 (б) от потенциала на электроде

Рис. 8. Спектры ГКР смеси TDP + пируват (1 : 13), адсорбированной на поверхности серебряного электрода при $-0,5$ (1), $-0,3$ (2) и $-0,1$ В (3). Условия см. рис. 6

динового компонента, взаимодействие осуществляется через тиазольное кольцо и является специфическим.

При повышении потенциала электрода от $-0,5$ до $-0,1$ В происходят изменения структуры слоя адсорбированных молекул, обусловленные увеличением числа связанных с пируватом молекул TDP, а также изменением геометрии комплекса TDP — пируват — металл. Значительное увеличение относительной интенсивности полос спектра ГКР, связанных с колебаниями атома серы, при повышении потенциала, указывает на то, что этот атом играет определяющую роль в адсорбции комплекса TDP — пируват, т. е. роль атома серы в связывании молекул TDP с поверхностью заметно увеличивается при положительных потенциалах и в присутствии пирувата. Вероятно, по этой причине при повышении потенциала электрода уменьшается частота колебаний связи С—S (табл. 2). Заметный высокочастотный сдвиг полосы 1640 см^{-1} указывает на то, что при изменении потенциала от $-0,65$ до $-0,1$ В увеличивается силовое поле связи С=N. Это наблюдается только тогда, когда TDP находится в комплексе с пируватом. Поэтому можно предположить, что пируват частично «сбрасывает» электрон в π -систему тиазольного кольца.

Таким образом, адсорбированные на поверхности серебряного электрода TDP и пируват образуют специфический комплекс. Ответственным за связывание с пируватом является тиазольный компонент. Структура комплекса весьма чувствительна к изменению потенциала поверхности. На основании рассмотренных результатов не представляется возможным однозначно определить механизм взаимодействия TDP и пирувата в комплексе и конкретные центры обеих молекул, ответственные за связыва-

ние. Это является предметом дальнейших исследований. В частности, предстоит выяснить роль ионных взаимодействий в ассоциации TDP и пирувата. Эти взаимодействия играют основную роль в комплексообразовании пирувата и TDP в замороженных спиртовых растворах [7]. Сейчас можно лишь предположить, что в связывании с пируватом не участвуют атомы серы и дифосфатная группа, которые непосредственно взаимодействуют с поверхностью металла.

Экспериментальная часть

Спектры ГКР получали на спектрометре Ramanog HG-2S (Jobin Yvon, Франция). Для возбуждения использовали ионный аргон-криптоновый лазер ILM-120 (Karl Zeiss, ГДР). Мощность лазерного излучения на образце во всех измерениях не превышала 30 мВт. В работе использовали электрохимическую ячейку, которую включали в обычную схему потенциостатирования, как описано в работе [1].

Для исследований использовали TDP, тиамин, 4-метил-5-гидроксипиридилэтилтиазол и пируват натрия фирмы Sigma, а также перекристаллизованную соль KCl, NaOH (ос. ч.) и бидистиллированную и деионизованную воду. 2-Метил-4-амино-5-этоксиметилпиримидин был синтезирован в Институте биохимии АН БССР.

Перед проведением каждого эксперимента рабочий серебряный электрод полировали, обезжиривали кипячением в 2 М NaOH, промывали бидистиллятом, поляризовали в 0,1 М серной кислоте для удаления связанных с поверхностью окислов и после дополнительного промывания бидистиллятом помещали в электрохимическую ячейку. Исследуемые вещества растворяли в 0,1 М водном растворе KCl в концентрации 10^{-4} М, после чего этим раствором заполняли электрохимическую ячейку и проводили окислительно-восстановительный цикл (ОВЦ).

ОВЦ осуществляли путем растворения на серебряном электроде нескольких монослоев серебра положительным (+0,25 В) потенциалом в течение 10—15 с с последующим его осаждением при малом отрицательном потенциале. Это приводило к резкому возрастанию сигнала ГКР исследуемого вещества за счет появления на поверхности металла при таком способе рыхления электрода дополнительных адсорбционных центров [1]. Суммарный заряд, проходящий через ячейку в процессе ОВЦ, составлял ~ 25 Кл/см².

Гидрозоли серебра готовились по методикам, описанным в работе [1]. Размер мицелл боргидридных зольей составлял 12—16 нм, цитратных — 40—50 нм, а их потенциалы —0,2 и —0,6 В соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Набиев И. Р., Ефремов Р. Г.* Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния и ее применение к изучению биологических молекул // *Итоги науки и техники. ВИНТИ, серия «Биоорганическая химия»*. 1989. Т. 15. 132 с.
2. Кокарбоксилаза и другие тиаминфосфаты / Ред. Ю. М. Островский. Минск, 1974. 265 с.
3. *Шелленбергер А.* Структура и функции активных центров ферментов. М., 1974. С. 82—97.
4. *Кочетов Г. А.* Тиаминовые ферменты. М., 1978. 234 с.
5. *Breslow R.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1958. V. 80. № 14. P. 3719—3726.
6. *Khailova L. S., Severin S. E., Hubner G., Neef H., Schellenberger A.* // *FEBS Lett.* 1982. V. 139. № 1. P. 49—53.
7. *Gibson E. P., Turnbull J. H.* // *J. Photochem.* 1978. V. 9. № 2/3. P. 290—292.
8. *Воропич В. Е., Гачко Г. А., Кивач Л. Н., Маскевич С. А., Маскевич Н. А., Островский Ю. А.* // Журн. прикладн. спектроскопии. 1984. Т. 41. № 1. С. 159—162.
9. *Набиев И. Р., Чуманов Г. Д.* // *Биофизика*. 1986. Т. 31. № 2. С. 183—190.
10. *Емельянов В. И., Коротеев Н. И.* // *Успехи физ. наук*. 1981. Т. 135. № 2. С. 345—388.
11. *Muniz-Miranda M., Neto N., Sbrana G.* // *J. Phys. Chem.* 1988. V. 92. № 4. P. 954—959.
12. *Sun J. S., Moskovits M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 16. P. 4711—4719.
13. *Kartha S. B.* // *Spectrochim. acta*. 1982. V. 38A. № 8. P. 859—866.
14. *Кениг Д. Л.* // *Успехи химии*. 1975. Т. 44. № 8. С. 1475—1516.

15. *Shind H., Nishihara C.* // J. Chem. Soc. Faraday Trans, 1. 1988. V. 84. № 2. P. 433—439.
16. *Свердлов Л. М., Ковнер М. А., Крайнов Е. П.* Колебательные спектры многоатомных молекул. М.: Наука, 1970. С. 479—494.
17. *Смит А.* Прикладная ИК-спектроскопия: Пер. с англ. М.: Мир, 1982.
18. *Chouteau J., Davidodics G., Metzger J., Bonzom M.* // Spectrochim. acta. 1966. V. 22. № 3. P. 719—724.
19. *Pletcher J., Sax M.* // Science. 1966. V. 154. № 3. P. 1331—1333.
20. *Гачко Г. А., Кивач Л. Н., Маскевич Ю. Н., Островский Ю. А., Подтынченко С. Г.* // Журн. прикладн. спектроскопии. 1984. Т. 41. № 5. С. 757—763.

Поступила в редакцию
7.II.1990

S. A. MASKEVICH, K. V. SOKOLOV*, L. N. KIVACH, S. G. PODTYNCHENKO,
N. D. STRECKAL, P. V. KHODORCHENKO*

SERS SPECTRA AND STRUCTURE OF THIAMIN, THIAMIN
DIPHOSPHATE AND PYRUVATE ADSORBED ON SILVER SURFACE

Ya. Kupala State University, Grožno:
* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

SERS spectra of thiamin (Th), thiamin diphosphate (ThDP), analogues of their pyrimidine (P) and thiazol (Tz) components, as well as pyruvate (PYR) adsorbed on hydrosoles and silver electrodes at various potentials are investigated. It is shown that Th adsorbs on hydrosoles by means of heteroatoms and NH_2 -group of pyrimidine, whereas on electrodes S-heteroatom also participates. N- and S-heteroatoms of Tz and diphosphate group play an important role in the connection of TDP with the surface. Geometry of the ThDP adsorption depends substantially on the surface potential. PYR molecules are connected with the surface mainly by means of carboxylic group. Specific interaction of ThDP PYR induced by the surface were detected. Structure of ThDP—PYR complex is sensitive to change of the surface potential.