

KHẢO SÁT MỘT SỐ ACID AMIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ ĐAO ĐỘNG VÀ TÍNH TOÁN LƯỢNG TỬ AB INITIO

Trần Quang Hinh, Nguyễn Văn Đến

Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên-Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 25 tháng 8 năm 2003)

TÓM TẮT: Acid amin là những đơn vị cơ bản của protein, việc nhận biết các acid amin có trong các sản phẩm nông nghiệp, thực phẩm,... là việc rất cần thiết trong cuộc sống của con người.

Trước đây và hiện nay, các phương pháp nghiên cứu xác định các hợp chất acid amin, thông dụng là các phương pháp điện di, sắc ký, nhiễu xạ tia X,...

Trong lĩnh vực sinh-hoá nói chung, việc xác định các acid amin với những phương pháp đã và đang sử dụng thì mất nhiều công sức và thời gian. Trong khi với phương pháp vật lý-quang phổ dao động, trên hệ thiết bị FTIR Raman kèm theo phụ kiện ghi phổ phản xạ khuếch tán (DR) thì việc xác định nó rất nhanh, không phá huỷ mẫu và tương đối chính xác. Với tính toán lượng tử Ab Initio thông qua bộ phần mềm Gaussian 98 sẽ giúp cho việc nhận biết các dao động cơ bản trong phổ dao động của acid amin ta khảo sát được nhanh chóng hơn.

I-MỞ ĐẦU:

Trong cuộc sống của con người những hợp chất sinh học như acid amin, protein là những chất mà cơ thể con người rất cần thiết. Acid amin là một đơn vị cơ bản để tạo nên những protein thông qua những liên kết peptide, liên kết S-S, liên kết hydro ... khảo sát acid amin bằng các phương pháp phổ dao động như : quang phổ hồng ngoại (IR), quang phổ phản xạ khuếch tán (Diffuse Reflectance-DR), quang phổ Raman là rất thuận lợi, do việc chuẩn bị mẫu khá đơn giản (nhất là Raman, DR),việc định tính nhanh chóng, chính xác. Với các phương pháp sinh hoá đã và đang sử dụng như điện di, sắc ký,... công việc chuẩn bị mẫu rất phức tạp và tốn kém.

Trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu một số acid amin để làm cơ sở nghiên cứu các polypeptide, protein và những hợp chất sinh học khác nhằm ứng dụng phương pháp vật lý giúp cho các nhà nghiên cứu sinh hoá và công nghệ sinh học đỡ tốn công sức hơn trong qui trình nghiên cứu các hợp chất sinh học liên quan đến các hợp chất này.

II-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU :

Trong bài báo này chúng tôi dùng phương pháp quang phổ phản xạ khuếch tán hồng ngoại biến đổi Fourier (DRIFT)

Hệ số phản xạ khuyết tán R_{∞} của một mẫu đã được làm loãng có bề dày vô hạn (tức là những mẫu mà tăng độ dày không làm thay đổi mẫu đáng kể) quan hệ tuyến tính với nồng độ c của mẫu, được cho bởi phương trình Kubelka- Munk(K-M) :

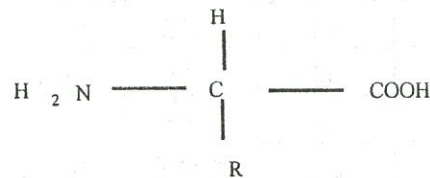
$$F(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})}{2 R_{\infty}} = \frac{2.303ac}{s}$$

Trong đó a là *độ hấp thụ* và s là *hệ số phản xạ*. Do hệ số phản xạ phụ thuộc cả vào kích thước hạt và độ xếp chặt của mẫu nên độ tuyến tính của hàm K-M chỉ được đảm bảo khi kích thước hạt và độ xếp chặt của mẫu kiểm soát được một cách nghiêm ngặt. Nếu điều kiện này được thoả mãn thì phương pháp phản xạ khuếch tán có thể sử dụng cho phân tích định lượng một cách chính xác.

Vì phản xạ khuếch tán là một kỹ thuật rất nhạy, cho nên tất cả các phụ tùng cho kỹ thuật này đều cho phép làm mẫu với lượng rất bé (microsampling).

III-GIỚI THIỆU ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU :

Đối tượng mà chúng tôi nghiên cứu là các axit amin. Các axit amin là những chất hữu cơ đồng thời có mang hai nhóm chức: amin – NH_2 mang tính kiềm và cacboxyl – COOH mang tính axit. Các axit amin có công thức chung như sau (hình 1):



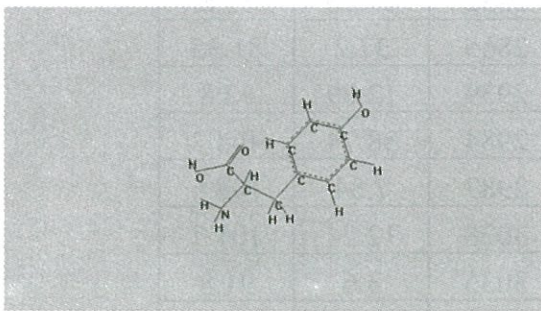
Hình 1. Công thức phân tử của các axit amin

Trong bài báo này chúng tôi khảo sát các acid amin :

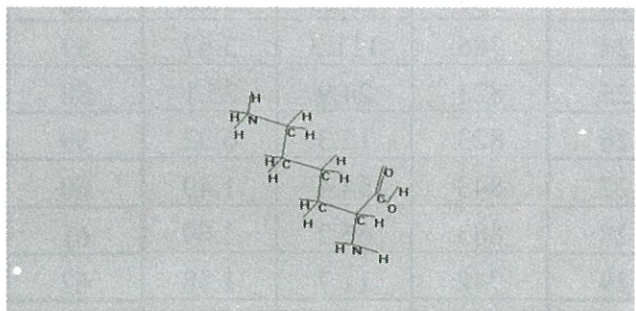
- Tyrosine (Tyr), gốc R vòng thơm, thuộc nhóm act amin kỵ nước. (hình 3)
- Lysine(Lys), gốc R tích điện, acit amin mạch thẳng.(hình 4)
- Histidine((His), gốc R tích điện, acit amin dị vòng..(hình 5)

IV-TÍNH TOÁN LƯỢNG TỬ AB-INITIO :

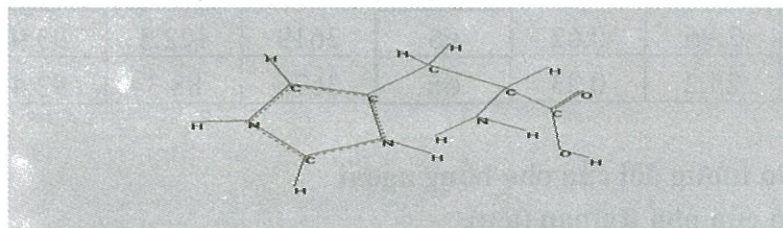
Dưới đây là kết quả tính toán Ab Initio cho các phân tử khảo sát. Tất cả đều được tính toán với mức lý thuyết HF và hệ hàm cơ sở 6-31G* trên bộ phận phần mềm Gaussian 98.



Hình 3. Công thức cấu tạo Tyrosine



Hình 4. Công thức cấu tạo của Lysine



Hình 5. Công thức cấu tạo Histidine

Bảng 1. Kết quả tính toán Ab Initio cho phân tử Tyrosine .

Mode	ν (cm-1)	I _{IR}	I _R	Mode	ν (cm-1)	I _{IR}	I _R
1	34	2.1	5.35	34	1062	7.53	9.43
2	46	1.14	2.23	35	1068	21.1	2.61
3	75	4.37	1.9	36	1105	105.3	2.01
4	80	0.96	0.98	37	1155	138.2	2.74
5	157	0.44	0.34	38	1162	60.6	3.76
6	223	0.76	1.01	39	1178	145.6	11.216
7	263	48.3	1.08	40	1181	58.4	3.43
8	271	5.12	1.39	41	1213	43.8	5.5
9	286	143.3	1.81	42	1240	31.9	4.78
10	313	2.04	1.6	43	1255	125.7	6.28
11	324	18.01	1.12	44	1289	13.37	4.01
12	343	1.1	4.5	45	1305	22.52	2.01
13	409	9.07	0.12	46	1327	36.28	0.97
14	416	1.58	0.06	47	1370	7.69	9.96
15	482	8.56	1.11	48	1428	20.79	2.12
16	504	35.9	1.77	49	1437	44.4	2.44
17	550	61.4	1.68	50	1457	9.47	11.05
18	566	16.7	1.69	51	1516	120.5	0.49
19	595	64.3	2.49	52	1601	24.86	5.78
20	629	0.39	5.89	53	1630	60.8	38.22
21	705	5.65	0.99	54	1638	43.1	5.92
22	742	51.2	4.36	55	1821	312.86	3.6
23	757	12.25	3.28	56	2832	44.16	55.8
24	786	111.3	3.67	57	2865	37.2	81.35
25	821	24.9	25.1	58	2939	12.09	42.8
26	823	12.3	6.92	59	2984	38.74	46.02
27	843	54.4	1.49	60	2987	7.84	108.6
28	883	66.2	2.69	61	3028	12.74	101.7
29	942	11.7	1.58	62	3035	3.6	91.8
30	960	10.3	1.69	63	3339	2.8	111.5
31	975	1.27	0.21	64	3416	3.83	76.1
32	993	2.96	0.62	65	3619	122.3	93.9
33	1000	25.2	0.23	66	3676	88.3	92.4

- I_{IR} : cường độ tương đối của phổ hồng ngoại
- I_R : cường độ của phổ Raman (a.u).

Bảng 2. Kết quả tính toán Ab Initio cho phân tử Lysine

Mode	ν (cm ⁻¹)	I _{IR}	I _R	Mode	ν (cm ⁻¹)	I _{IR}	I _R
1	45	3.69	0.88	34	1205	4.57	5.32
2	68	2.62	0.18	35	1224	78.7	4.7
3	61	3.96	0.39	36	1252	3.7	2.8
4	92	0.4	0.13	37	1280	0.009	3.6
5	125	0.94	0.06	38	1300	0.38	33.3
6	143	1.58	0.75	39	1305	1.68	0.61
7	196	0.87	0.87	40	1321	1.31	2.42
8	246	26.7	0.85	41	1343	56.5	0.48
9	253	38.7	1.37	42	1367	13.5	1.74
10	260	43.5	1.72	43	1399	35.3	2.49
11	280	18.1	0.52	44	1402	2.83	0.79
12	302	0.31	4.86	45	1420	13.52	0.94
13	386	3.3	1.22	46	1461	2.43	7.65
14	486	22.7	0.32	47	1462	0.52	23.2
15	535	11.35	1.14	48	1474	1.84	4.43
16	563	61.5	1.92	49	1491	1.13	7.8
17	590	71.5	2.27	50	1638	59	5.68
18	709	9.44	0.17	51	1641	34.2	7.62
19	748	11.3	2.95	52	1810	392.9	5.83
20	778	87.06	2.91	53	2798	82.9	73.1
21	797	77.5	1.35	54	2842	5.59	68.1
22	850	120.1	3.09	55	2845	1.48	46.7
23	894	78.6	1.27	56	2850	99.5	18.3
24	927	19.8	1.95	57	2855	21.2	161.1
25	935	38.6	4.23	58	2875	12.4	104.1
26	971	6.36	1.95	59	2882	38.56	25.5
27	1005	7.13	9.02	60	2902	96.05	27.4
28	1015	1.71	8.2	61	2922	48.6	24.8
29	1047	22.5	12.6	62	3325	8.81	114.8
30	1059	5.9	5.9	63	3332	2.01	108.6
31	1083	86	4.01	64	3399	0.13	89.3
32	1113	11.07	8.92	65	3409	2.68	73.1
33	1200	70.6	0.96	66	3619	118.5	86.7

- I_{IR} : cường độ tương đối của phổ hồng ngoại
- I_R : cường độ của phổ Raman (a.u).

Bảng 3 : Kết quả tính toán Ab Initio cho phân tử Histidine

Mode	ν (cm-1)	IIR	IR	Mode	ν (cm-1)	IIR	IR
1	36	1.78	1.53	28	1091	25.2	5.7
2	65	3.73	3.37	29	1107	4.49	9.9
3	99	2.18	1.7	30	1143	1.68	4.33
4	121	2.12	0.92	31	1177	25.5	2.12
5	209	4.52	0.8	32	1202	67.6	2.35
6	269	8.9	2.17	33	1223	4.36	15.72
7	283	6.87	1.64	34	1265	0.41	8.57
8	298	69.9	0.73	35	1296	23.84	0.86
9	360	5.68	1.09	36	1343	11.84	5.97
10	390	1.08	2.16	37	1366	17.07	18.13
11	532	31.62	2.9	38	1368	9.05	7.9
12	542	90.79	1.39	39	1379	57.17	2.99
13	573	57	1.83	40	1416	40.3	13.66
14	597	82.03	5.06	41	1449	11.32	9.62
15	636	95.18	1.7	42	1495	29.4	35.8
16	667	5.77	0.83	43	1596	16.72	15.72
17	709	59.4	1.05	44	1639	50.52	6.2
18	732	23.1	10.62	45	1788	324.5	3.8
19	834	45.4	1.32	46	2863	21.66	93
20	860	85.6	1.3	47	2897	31.58	113.39
21	863	47.83	0.8	48	2940	11.42	60.02
22	878	1.58	1.32	49	3069	13.23	49.6
23	893	41.7	6.23	50	3075	4.14	116.34
24	908	7.76	3.8	51	3346	4.36	80.13
25	967	11.76	1.94	52	3429	11.19	50.83
26	1001	35.88	6.37	53	3482	135.4	39.19
27	1080	38.95	2.39	54	3616	130.1	89.7

- IIR : cường độ tương đối của phổ hồng ngoại
- IR : cường độ của phổ Raman (a.u).

V-THỰC NGHIỆM :

1.Mô tả thiết bị

Phổ phản xạ khuếch tán (DR) của phân tử được đo bằng quang phổ kế EQUINOX 55-FT IR RAMAN được nối kết với bộ phận phản xạ khuếch tán (EASI DIFF), tại phòng phân tích trung tâm trường ĐHKHTN Tp.Hồ Chí Minh. Nguồn sáng hồng ngoại là đèn dây tóc Tungsten. Detector dùng để sử dụng trong thiết bị là loại DTGS.

2. Phương pháp ghi phổ

Quang phổ kế được điều khiển bằng máy vi tính với sự trợ giúp của các chương trình đã được lập trình sẵn trên máy, qua phần mềm OPUS version 3.0. Sau khi mẫu được đặt vào giá đỡ rồi đưa vào máy, phổ của mẫu khảo sát được hiển thị lên màn hình vi tính. Một thiết bị ngoại vi gắn liền với phổ kế cho phép điều khiển vị trí của mẫu sao cho đỉnh phổ của mẫu tối ưu nhất.

3. Chuẩn bị mẫu

Ba mẫu đang khảo sát đều là những mẫu dạng bột, mỗi mẫu chạy phổ được chứa trong dụng cụ gọi là bộ ly (cups).

+ Ly lớn có đường kính 10mm, sâu 2.3 mm.

+ Ly bé có đường kính 4.7 mm và sâu 1.6 mm.

Trước khi chạy mẫu ta phải chạy mẫu nền bằng chất KBr (chạy nền bằng ly nào thì mẫu cũng chạy nền bằng ly đó).

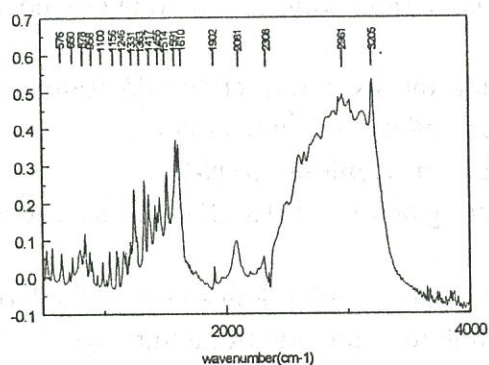
Mẫu được trộn với KBr với tỉ lệ khoảng 5-10% là mẫu nguyên chất và còn lại là 90-90%KBr. Ta đưa tất cả vào cối để nghiền nát mẫu để tránh gây ra sự phản xạ gương tạo nên các dải ngược.

Mẫu được đưa vào giá đỡ, ly đựng KBr phải đưa vào bên trong và ly đựng mẫu khảo sát để bên ngoài.

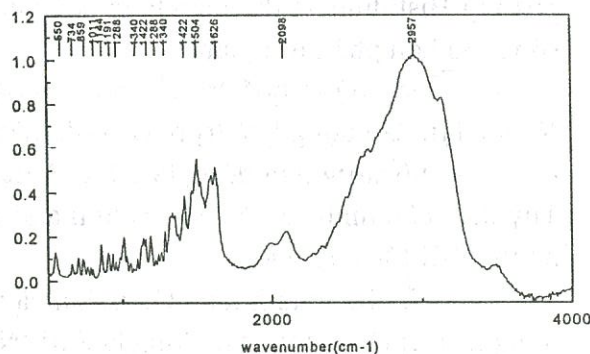
Đối với việc ghi phổ bằng phương pháp quang phổ Raman thì không cần phải chuẩn bị mẫu như trên.

4. Kết quả ghi phổ

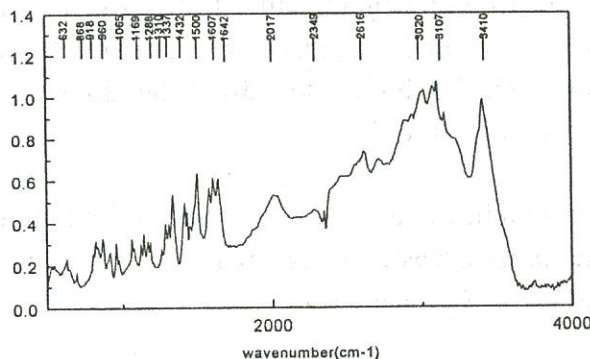
Điều kiện để chạy phổ là: Độ phân giải 4cm^{-1} , số lần quét 100(scan), vùng quan sát $250\text{-}4000\text{cm}^{-1}$. Sau đây là kết quả ghi phổ phản xạ khuếch tán của các mẫu khảo sát:



Hình 6 : Phổ DR của Tyrosine



Hình 7: Phổ DR của Lysine



Hình 8 : Phổ DR của Histidine

Dưới đây là bảng so sánh kết quả thực nghiệm và tính toán hóa học Ab Initio với hệ hàm cơ sở 6-31G* (bảng 4). Chú ý kết quả đã nhân với 0.8929 để bù sai số hệ thống [1].

Bảng 4 : Kết quả thực nghiệm và tính toán hóa học lượng tử Ab Initio một số dao động đặc trưng (*) của 03 acid amin

Phân tử	Dao động	3-61G* (cm-1)	Thực nghiệm (cm-1)	Chênh lệch (cm-1)
Tyrosine	$\nu(\text{N-H})$	3329 (mode 63)	3205	124
	$\nu(\text{C=O})$	1815 (mode 55)	1610	205
	$\delta(\text{N-H})$	1437 (mode 49)	1417	15
Lysine	$\nu(\text{N-H})$	3325 (mode 62)	2957	368
	$\nu(\text{C=O})$	1810 (mode 52)	1626	184
	$\delta(\text{N-H})$	1420 (mode 45)	1422	2
Histidine	$\nu(\text{N-H})$	3346 (mode 50)	3107	239
	$\nu(\text{C=O})$	1788 (mode 45)	1607	181
	$\delta(\text{N-H})$	1416 (mode 40)	1416	0

(*) Tham khảo : [3];[4];[5];[6];[7]

* Nhận xét:

+ **Số sóng dao động hóa trị của nhóm Cacbonyl C=O:** Trong các axit amin phân cực, nhóm R tích điện gồm có phân tử Lysine và Histidine. Phân tử Lysine có số sóng nhỏ hơn phân tử Histidine, ta dự đoán là vì phân tử Histidine chịu ảnh hưởng của dị vòng nên có số sóng lớn hơn phân tử Lysine.

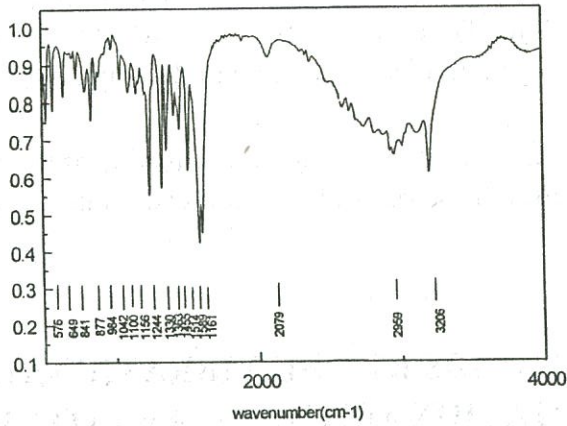
+ Dao động hoá trị của nhóm C=O có độ hấp thụ IR mạnh, cường độ Raman yếu. Ngược lại, dao động hoá trị N-H có độ hấp thụ IR yếu, cường độ Raman mạnh.

+ Số sóng dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm N-H:

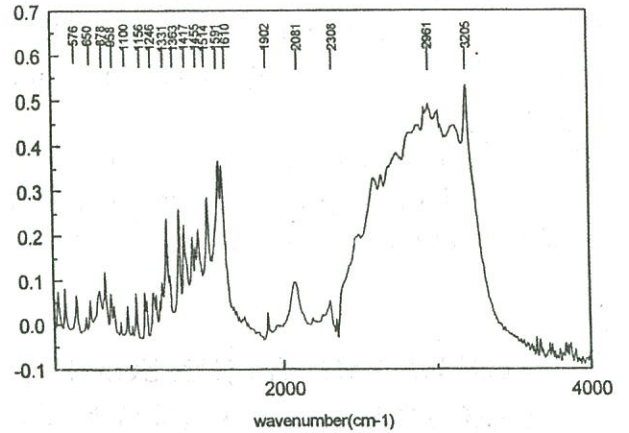
Tuỳ theo cấu hình của mỗi phân tử mà số sóng dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm N-H lớn hay nhỏ.

+ Từ những tính toán Gaussian và thực nghiệm ta nhận thấy rằng số sóng của dao động hoá trị (C=O) và dao động hoá trị (N-H) trong tính toán lớn hơn trong thực nghiệm khá nhiều, điều này có thể giải thích là : **trong acid amin có liên kết hydro, ở đây là liên kết hydro nội phân tử (intramolecular)**. Vì khi tính toán lượng tử là chỉ tính trong điều kiện với một phân tử cô lập trong chân không[1]. Còn trong thực nghiệm, mẫu là một acid amin dạng muối (bột), và như đã trình bày ở phần giới thiệu đối tượng nghiên cứu (III) ở trên, các acid amin đều có chung hai nhóm $-\text{NH}_2$ và $-\text{COOH}$, là các nhóm donor-acceptor, phân cực mạnh nên dễ dàng tạo liên kết hydro từ yếu đến trung bình, ảnh hưởng đến tần số dao động hoá trị khá lớn, còn tần số dao động biến dạng thì ảnh hưởng rất ít.[2]

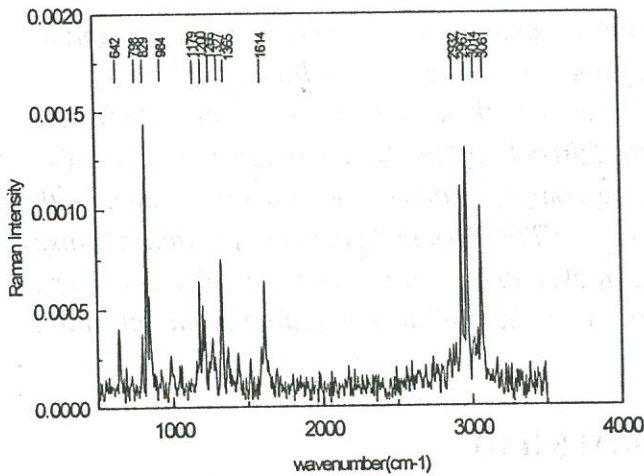
Để có thể tìm hiểu thêm về các mode dao động chính, và các tương tác phân tử trong một acid amin, chúng tôi khảo sát thực nghiệm acid amin Tyrosine bằng các phương pháp quang phổ hồng ngoại (IR), Raman (R), phản xạ khuếch tán (DR) như sau:



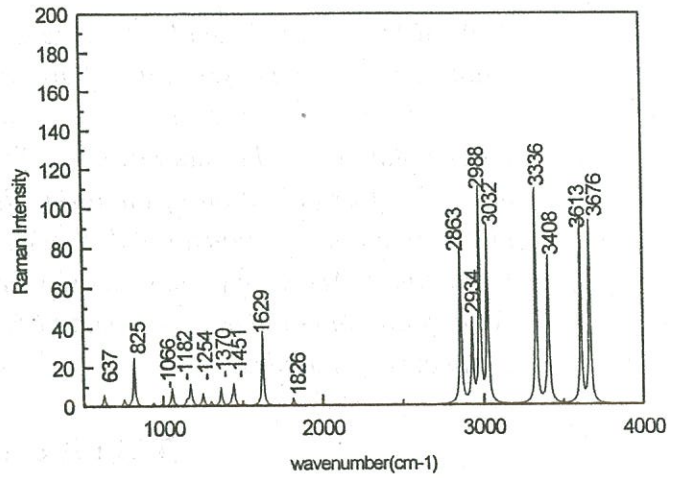
Hình 9 : Phổ hồng ngoại (IR)



Hình 10: Phổ phản xạ khuếch tán (DR)



Hình 11: Phổ Raman (R)



Hình 12 : Phổ Raman (R) mô phỏng

Phổ (R) mô phỏng của Tyrosine là dựa trên các kết quả tính toán lượng tử qua phần mềm Gaussian 98, sử dụng chương trình mô phỏng phổ được lập trên phần mềm MATLAB 5.2.

Nhận xét:

- ❖ Hai phổ hồng ngoại và phổ phản xạ khuếch tán của Tyrosine đều giống hệt nhau (nếu đảo ngược phổ hồng ngoại thì thành phổ phản xạ khuếch tán).
- ❖ Phổ Raman thực nghiệm và phổ Raman mô phỏng khá giống nhau nhưng ở phổ thực nghiệm, đỉnh 1614 cm-1 là đặc trưng cho dao động hoá trị nhóm C=O. Còn ở phổ mô phỏng, đỉnh 1826 cm-1 là đặc trưng cho nhóm C=O, sự chênh lệch này là do mẫu thực nghiệm đã thể hiện có liên kết hydro nội phân tử (như giải thích ở phần trên), về tỉ lệ cường độ thấp hơn nhiều so với phổ hồng ngoại.

VI-KẾT LUẬN:

Với phương pháp phổ dao động : quang phổ phản xạ khuếch tán (DR), hồng ngoại (IR) và Raman để khảo sát acid amin rất thuận lợi, nhanh chóng, các phương pháp này hoàn

toàn có thể hỗ trợ cho nhau, đồng thời nếu kết hợp với tính toán lượng tử Ab Initio thông qua bộ phần mềm Gaussian 98 sẽ xác định các dao động đặc trưng của phổ phân tử của các hợp chất sinh học này nhanh chóng, dự đoán cấu trúc phân tử của acid amin với độ chính xác cao hơn.

Qua nghiên cứu này chúng tôi sẽ sử dụng làm cơ sở để nghiên cứu tiếp theo các polypeptide, enzym, protein là những đại phân tử, đồng thời là những hợp chất sinh học rất cần thiết trong cuộc sống.

THE EXAMINATION SOME AMINO ACIDS BY THE VIBRATIONAL SPECTRA AND QUANTUM COMPUTATION METHODS (AB INITIO)

Tran Quang Hinh, Nguyen van Den
University of Natural Sciences –VNU-HCM

ABSTRACT: *Amino acids is basic structure component of protein, a determination amino acids in some agricultural product, food,... is necessary for life.*

Previously and now, these following methods research amino acids are Electrophoresis, Chromatographic, X-ray diffraction. In the chemical biology, these methods of examination of amino acids are complex labors, spend a lot of time. With physical methods- vibrational spectra - by FTIR-Raman spectroscopy and Diffuse Reflectance Accessory (Easi DiFF) are quickly and none destroy sample, accuracy. With quantum computation method (Ab Initio) is helpful determination mode vibration of spectra of samples.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Aeleen Frisch, Michael J. Frisch, *Gaussian 98 User's Reference*, Gaussian Inc., USA, (1998)
- [2] Lý Hoà, *Cấu trúc phổ phân tử*, giáo trình trường ĐHTH TP HCM (1980).
- [3] Daimay Lin-Vien, Norman B. Colthup, William G. Fateley, Jeanette G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, (1991)
- [4] Takehiko Shimanouchi, *Tables of Molecular Vibrational frequencies Consolidated Volume I*, United Department of Commerce-National bureau of standards, National Standard Reference data system, (1972)
- [5] Pretsch Clerc Seibl Simon, *Tables of Spectra Data for Structure Determination of Organic Compounds*. Second edition, Springer-Verlag Heidelberg New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, (1988)
- [6] R.M. Silverstein, G. Clayton Bassler, Terence C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Fifth Edition, (1991)
- [7] Gerhard Herzberg, F.R.S.C, *Molecular spectra and Molecular structure*, Volume 2, Krieger publishing Co., (1998)