

УДК 544.723

АДСОРБЦИЯ НЕКОТОРЫХ БИОМОЛЕКУЛ НА ПОВЕРХНОСТИ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ДИБЕНЗО-18-КРАУН-6

Л.П. Головкова*, О.В. Маркитан, Н.Н. Власова

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

Исследована адсорбция биогенных аминов (агматина, гистамина, тирамина, триптамина), аминокислот (аргинина, лизина, тирозина) и дипептидов (лизилфенилаланина и аргинилфенилаланина) на поверхности высокодисперсного кремнезема, модифицированного макроциклическим полиэфиром дибензо-18-краун-6. На основании анализа изотерм адсорбции рассчитаны условные константы связывания биомолекул с краун-эфиром, закрепленным на поверхности. Показано, что эти величины для ароматических аминов и дипептидов выше, чем для алифатических соединений. Наличие в молекуле аргинина и лизина дополнительной основной группы приводит к образованию этими аминокислотами более прочного комплекса с краун-эфиром по сравнению с тирозином

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для аналитических исследований, при которых успешно используются сенсорные приборы, высока востребованность краун-эфиров, жестко закрепленных на поверхности твердых носителей [1]. Однако синтез краун-эфиров, способных к прививке, весьма сложен и трудоемок. В противоположность этому, адсорбционный способ модифицирования твердой поверхности краун-эфирами прост. В связи с этим можно предположить, что высокодисперсный кремнезем, модифицированный краун-эфирами, может найти свое место в процессах определения, выделения, разделения и очистки различных соединений в химической промышленности, фармации или медицине.

Известно, что макроциклический полиэфир дибензо-18-краун-6 (ДБК) используется как электронейтральный ионофор в чувствительных мембранных электродах для определения катионов щелочных металлов. Использование ДБК в качестве покрытия таких электродов позволяет значительно увеличить их чувствительность при определении концентраций органических аминов, которые образуют прочные комплексы типа "хозяин-гость" с молекулой ДБК [2]. В то время как катион металла захватывается полостью макроцикла, протонированный амин связывается водородными связями с атомами кислорода макроцикла.

Такие аминокислоты, как аланин, фенилаланин, триптофан, тирозин и родственные им соединения могут образовывать прочные комплексы с макроциклическими полиэфирами как за счет связывания аминогруппы с кислородными атомами полости краун-эфира посредством водородных связей и электростатического взаимодействия, так и за счет дополнительных дисперсионных взаимодействий (гидрофобного, стэкинг).

Целью настоящей работы было изучение адсорбции некоторых аминокислот (лизина, аргинина, тирозина), родственных им биогенных аминов (гистамина, триптамина, агматина, тирамина) и дипептидов (аргинилфенилаланина и лизилфенилаланина) на поверхности высокодисперсного кремнезема, покрытого мономолекулярным слоем дибензо-18-краун-6.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали высокодисперсный аморфный кремнезем (ВДК) А-300 (Калуш, Украина), дибензо-18-краун-6 ("чда", Новосибирский институт органической химии, Россия), гистамин дигидрохлорид, агматин сульфат, триптамин гидрохлорид и тирамин гидрохлорид ("чда", Fluka, Швейцария), аргинин, лизин и тирозин в L-форме, хроматографически чистые (Reanal, Венгрия), аргинилфенилаланин ацетат и лизилфенилаланин дигидробромид (Sigma, США), нингидрин (Fluka, Германия) стандарт-титры NaOH и HCl (Titrisol, Merck, Германия),

* контактный автор Igolovkova@rambler.ru

хлорид натрия ("хч", Merck, Германия), хлороформ ("чда", Химреактив, Россия).

Поверхность кремнезема модифицировали методом импрегнации из раствора ДБК в хлороформе при комнатной температуре (20 ± 2 °С). Концентрация ДБК была выбрана так, чтобы 0,1382 г ДБК приходилось на 1 г ВДК; эта концентрация соответствует мономолекулярному покрытию поверхности краун-эфиром. После полного растворения ДБК добавляли навеску кремнезема, тщательно перемешивали и высушивали в течение 3 суток при комнатной температуре. Спектрофотометрически, по полосе поглощения краун-эфира в УФ-области спектра ($\lambda_{\max} = 273,6$ нм, молярный коэффициент поглощения $\varepsilon \approx 6000$) было проведено определение концентрации краун-эфира, переходящего с поверхности ВДК в воду, в зависимости от pH. Было установлено, что в области pH от 2 до 5 "смыть" ДБК не зависит от кислотности среды и в условиях проведения адсорбции (навеска адсорбента 0,1 г) концентрация перешедшего в раствор краун-эфира равна $2,2 \cdot 10^{-5}$ М, что составляет приблизительно 0,6 % от его общего содержания на поверхности.

Адсорбцию биомолекул изучали из индивидуальных водных растворов при комнатной температуре (20 ± 2 °С). Растворы исследуемых веществ с точно заданной концентрацией и объемом 10 мл смешивали с навесками модифицированного кремнезема (0,1 г). Доводили pH растворов до необходимых значений (4,6 – для аминокислот и дипептидов; 7,4 – для биогенных аминов) добавлением кислоты или щелочи и, периодически перемешивая, выдерживали суспензии в течение 1 ч для установления адсорбционного равновесия (предварительно было установлено, что оно достигается в течение 40–50 мин). После этого проверяли значения pH растворов (иономер ЭВ-74) и центрифугированием (8000 об/мин, 20 мин) отделяли сорбент. Равновесные концентрации биомолекул определяли спектрофотометрически (Specord M-40, Carl Zeiss, Германия): биогенных аминов по положению их характеристических полос поглощения в УФ-области спектра, а агматина, аминокислот и дипептидов после проведения реакции с нингидрином [3]. Предварительно были подобраны оптимальные условия (объем исследуемой пробы, наиболее подходящий буферный раствор и время кипячения образцов) и получены калибровочные прямые для

определения концентрации биомолекул по реакции с нингидрином. Величины адсорбции исследуемых веществ определяли по разности исходной и равновесной концентраций в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены изотермы адсорбции аминокислот и дипептидов при pH 4,6: аргинин, лизин и дипептиды при данном pH протонированы и существуют в виде однозарядного катиона, а тирозин находится в виде цвиттер-иона.

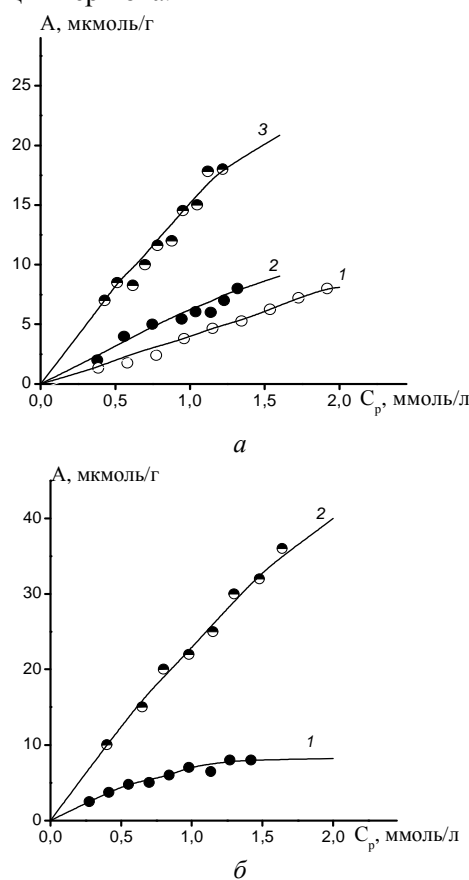
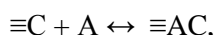


Рис. 1. Изотермы адсорбции аминокислот (а): 1 – тирозин, 2 – лизин и 3 – аргинин; и дипептидов (б): 1 – лизилфенилаланин и 2 – аргинилфенилаланин на поверхности кремнезема, модифицированного ДБК, из водных растворов при pH 4,6

Полученные изотермы адсорбции для аминокислот не лианеризуются в лэнгмюровских координатах. В связи с этим, чтобы оценить прочность связывания аминокислот и дипептидов с краун-эфиром, закрепленным на поверхности, мы рассчитали условную константу связывания в каждой точке полученных изотерм. В общем виде взаимодействие аминокислот и пептидов с краун-эфиром, закрепленным на поверхности в случае

образования комплекса состава 1:1, может быть представлено уравнением



где $\equiv\text{C}$ – краун-эфир, адсорбционно закрепленный на поверхности кремнезема, А – аминокислота или дипептид, $\equiv\text{AC}$ – их адсорбционный комплекс с краун-эфиром. Условная константа образования такого комплекса описывается уравнением

$$K = \frac{[\text{AC}]}{[\text{A}][\text{C}]},$$

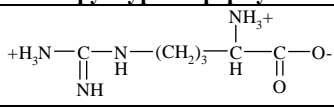
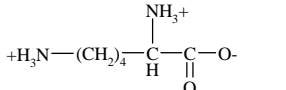
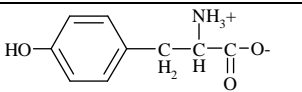
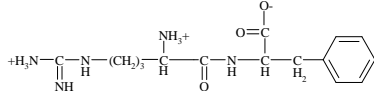
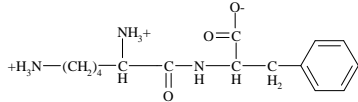
где $[\text{AC}]$ – концентрация адсорбированного вещества, определяемая экспериментально, $[\text{A}] = A_0 - [\text{AC}]$ – равновесная концентрация аминокислоты или дипептида, $[\text{C}] = C_0 - [\text{AC}]$ – равновесная концентрация закрепленного краун-эфира (A_0 – исходная концентрация адсорбата, задаваемая экспериментально, C_0 – исходная концентрация краун-эфира на поверхности ВДК, $3,85 \cdot 10^{-4}$ моль/г). Критерием правильности выполненного расчета было постоянство значений констант при различных исходных концентрациях аминокислоты или дипептида в растворе, что также подтверждает сделанное предположение об образовании в системе комплекса состава 1:1.

Как следует из полученных результатов, величины условных констант связывания увеличиваются в ряду: тирозин < лизин < аргинин, т.е. наиболее прочные комплексы с краун-эфиром, закрепленным на поверхности, образует аргинин, что может быть объяснено большей основностью гуанидиновой группы аргинина ($\lg K_a = 12,48$) по сравнению с алифатической аминогруппой лизина ($\lg K_a = 10,6$) [4] и тирозином, который не содержит дополнительной аминогруппы. Таким образом, можно предположить, что аргинин и лизин связываются с молекулой краун-эфира за счет электростатического взаимодействия и, возможно, водородных связей между атомами кислорода краун-эфира и концевой аминогруппой аминокислоты, причем константа связывания аргинина, как более основного, выше, чем лизина. Следует отметить, что такая же закономерность в изменении констант связывания аргинина и лизина наблюдается и при изучении их адсорбции на поверхности немодифицированного высокодисперсного кремнезема [5], однако адсорбция аминокислот наблюдается только при значениях pH выше 5 за счет

электростатического взаимодействия с диссоциированными силанольными группами поверхности.

Закономерно, что тирозин, молекула которого не содержит дополнительной аминогруппы, и при pH 4,6 присутствует в растворе в виде цвиттер-иона, адсорбируется в наименьшей степени и имеет самую низкую условную константу связывания с краун-эфиром, закрепленным на поверхности ВДК. Возможно, что в связывании тирозина с краун-эфиром основную роль играет стэкинг-взаимодействие между ароматическими системами краун-эфира и аминокислоты, как это наблюдается в растворах, когда ароматический радикал аминокислоты располагается непосредственно над одним из бензольных колец краун-эфира [6].

Табл. 1. Условные константы связывания ($\lg K$) аминокислот и дипептидов с краун-эфиром, закрепленным на поверхности высокодисперсного кремнезема (структурные формулы соответствуют формам, в которых биомолекулы адсорбируются на поверхности кремнезема, модифицированного ДБК)

Соединение	Структурная формула	$\lg K \pm 0,1$
аргинин		1,6
лизин		1,2
тирозин		1,0
аргинил фенилаланин		1,8
лизил фенилаланин		1,4

Как следует из данных рис.1б и табл. 1, дипептиды (аргинилфенилаланин и лизилфенилаланил) адсорбируются лучше, чем соответствующие им аминокислоты, а рассчитанные условные константы связывания с краун-эфиром, закрепленным на поверхности ВДК, выше. Известно, что в водных растворах дипептиды, как и аминокислоты, существуют в виде биполярных ионов. Аргинилфенилаланин и лизилфенилаланил, как и соответствующие им аминокислоты аргинин и лизин, при pH 4,6

существуют в виде однозарядного катиона [7] и, по-видимому, как и аминокислоты, адсорбируются на поверхности модифицированного кремнезема преимущественно за счет электростатического взаимодействия между кислородными атомами краун-эфира и дополнительными аминогруппами пептида. Однако, учитывая тот факт, что величины адсорбции и условные константы связывания дипептидов выше, чем соответствующих им аминокислот, небезосновательно можно предположить наличие дополнительного стэкинг-взаимодействия между ароматическим циклом молекулы дипептида и бензольными кольцами краун-эфира, жестко закрепленного на поверхности кремнезема. Подтверждением влияния ароматического кольца молекулы фенилаланина в составе дипептида на связывание с краун-эфиром служит также постоянное значение разности между условными константами связывания дипептидов и аминокислот $\lg K_{\text{lys-phe}} - \lg K_{\text{lys}} = \lg K_{\text{arg-phe}} - \lg K_{\text{arg}} = 0,2$.

На основании экспериментальных данных построены изотермы адсорбции биогенных аминов на поверхности модифицированного кремнезема при pH 7,4 на фоне 0,01 М NaCl (рис. 2).

Полученные изотермы имеют ленгмюровский характер и хорошо описываются соответствующими уравнениями, по которым были рассчитаны константы устойчивости их адсорбционных комплексов и максимальные значения величин адсорбции (табл. 2).

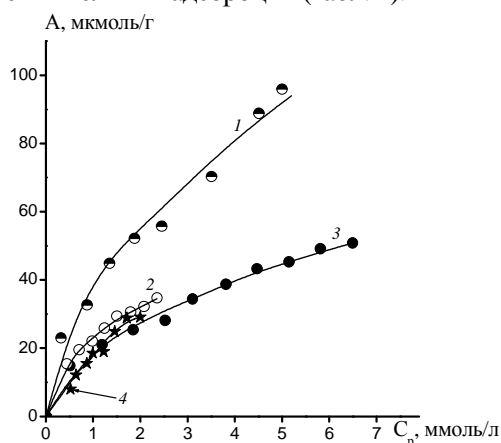
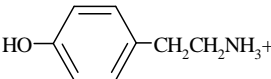
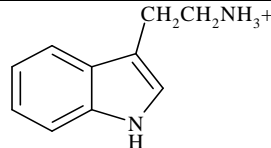
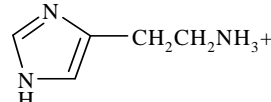
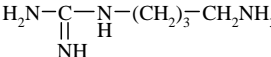


Рис. 2. Изотермы адсорбции гистамина (1), триптамина (2), тирамина (3) и агматина (4) на поверхности кремнезема, модифицированного ДБК, из водных растворов 0,01 М NaCl при pH 7,4

Табл. 2. Максимальные значения адсорбции и константы связывания катионов биогенных аминов на поверхности кремнезема – исходного и модифицированного ДБК

Биогенный амин	A_{max} мкмоль/г		$\lg K_{\pm 0,1}$	
	SiO ₂ + ДБК	SiO ₂	SiO ₂ + ДБК	SiO ₂
 тирамин	34,5	46,2	2,14	1,76
 триптамин	29,7	72,4	2,88	2,04
 гистамин	43,7	126,7	3,08	2,50
 агматин	86,5	102,8	2,34	2,51

Модифицирование поверхности кремнезема ДБК способствует повышению констант связывания ароматических биогенных аминов (тирамина, триптамина, гистамина), в отличие от алифатического биогенного амина агматина, по сравнению с немодифицированным кремнеземом [8]. По-видимому, это обусловлено тем, что между ароматическими фрагментами данных аминов и бензольными кольцами краун-эфира осуществляются дополнительные стэкинг-взаимодействия, которые вносят вклад в общую устойчивость адсорбционных комплексов. Однако значения предельной адсорбции биогенных аминов на модифицированном кремнеземе ниже, поскольку эти величины зависят от количества доступных адсорбционных центров на поверхности. Молекула же краун-эфира, будучи единичным центром адсорбции, гораздо больше по размерам, чем силанольные группы кремнезема.

ВЫВОДЫ

Установлено, что биомолекулы, содержащие основные функциональные группы и ароматические заместители, адсорбируются на поверхности высокодисперсного кремнезема, модифицированного дибензо-18-краун-6.

Устойчивость поверхностных комплексов определяется различными типами взаимодействия: стэкинг между ароматическими системами, ион-дипольные или образование водородных связей между аминогруппами адсорбатов и атомами кислорода полости макроцикла. Наиболее прочные комплексы образуют те биомолекулы, для которых реализуются все типы взаимодействий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хираока М. Краун-соединения. – Москва: Мир, 1986. – 363 с.
2. Poels I., Nagels L.J. Potentiometric detection of amines in ion chromatography using macrocycle – based liquid membrane electrodes // Anal. Chim. Acta. – 2001. – V. 440. – P. 89–98.
3. Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кертин Д., Моррилл Т. Идентификация органических соединений. – Москва: Мир, 1983. – 704 с.
4. Яцимирский К.Б., Крисс Е.Е., Гвяздовская В.Л. Константы устойчивости комплексов металлов с биолигандами. – Киев: Наук. думка, 1979. – 228 с.
5. Власова Н.Н., Головкова Л.П. Адсорбция аминокислот на поверхности высокодисперсного кремнезема // Коллоид. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С.733–738.
6. Бидзиля В.А., Головкова Л.П., Рожкова З.З. Стэкинг-взаимодействие в комплексах краун-эфиров с ароматическими аминокислотами // Журн. общей химии. – 1988. – Т. 58, № 7. – С. 1645–1650.
7. Власова Н.Н., Головкова Л.П., Маркитан О.В. Адсорбция дипептидов на поверхности высокодисперсного кремнезема из водных растворов // Химия, физика и технология поверхности. – 2008. – Вып. 14. – С. 488–493.
8. Власова Н.Н., Маркитан О.В., Стукалина Н.Г. Адсорбция биогенных аминов на поверхности высокодисперсного кремнезема из водных растворов // Коллоид. журн. – 2006. – Т. 68, № 3. – С. 421–423.

Поступила 30.05.2011, принята 06.06.2011

Адсорбція деяких біомолекул на поверхні високодисперсного кремнезему, модифікованого дибензо-18-краун-6

Л.П. Головкова, О.В. Маркітан, Н.М. Власова

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, lgolovkova@rambler.ru

Досліджено адсорбцію біогенних амінів (агматину, гистаміну, тираміну, триптаміну), амінокислот (аргініну, лізину, тирозину) та дипептидів (аргінілфенілаланіну та лізілфенілаланіну) на поверхні високодисперсного кремнезему, модифікованого макроциклічним полієфіром дибензо-18-краун-6. На основі аналізу ізотерм адсорбції розраховані умовні константи зв'язування біомолекул з краун-ефіром, що був адсорбційно закріплений на поверхні. Показано, що ці величини для ароматичних амінів та дипептидів вищі, ніж для аліфатичних сполук. Наявність у складі молекул аргініну та лізину додаткової основної групи сприяє утворенню цими амінокислотами більш стійкого комплексу з краун-ефіром порівняно з тирозином.

Adsorption of some biomolecules on highly dispersed silica surface modified with dibenzo-18-crown-6

L.P. Golovkova, O.V. Markitan, N.N. Vlasova

Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, lgolovkova@rambler.ru

The adsorption of biogenic amines (agmatine, histamine, tyramine, tryptamine), amino acids (arginine, lysine, tyrosine), and dipeptides (lysylphenylalanine and arginylphenylalanine) has been studied on fumed silica surface modified with macrocyclic polyether dibenzo-18-crown-6. The apparent binding constants of biomolecule complexes with crown ether fastened to the surface have been calculated according to obtained adsorption isotherms. It has been shown that the binding constants of aromatic amines and dipeptides with crown ether are higher than those of aliphatic compounds. The presence of additional basic groups in arginine and lysine molecules leads to the formation of more stable complexes with crown ether in comparison with that of tyrosine.