

Н.Ю. Клименко, Н.П. Галаган

ІЧ-СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ, ТИТАНО- ТА АЛЮМОКРЕМНЕЗЕМІВ, МОДИФІКОВАНИХ БІЛКОМ

Методом ІЧ-спектроскопії досліджено вплив природи поверхні високодисперсних оксидів (кремнезему А-300, титано- та алюмокремнеземів) на адсорбцію білку бичачого сироваткового альбуміну (БСА) при різних значеннях рН розчину (2.5, 4.8, 7.0). За даними аналізу ІЧ-спектрів встановлено, що при рН 4.8 (ізоелектрична точка (ІЕТ) БСА) у всіх випадках процес супроводжується утворенням сильного водневого зв'язку між вільними силанольними групами поверхні та карбоксильними і аміногрупами адсорбованого білку. Зниження величини граничної адсорбції для білку при рН 2.5 та 7.0 для кожного з оксидів та ступеня покриття їх поверхні БСА свідчить про залежність процесу від особливостей структури оксиду та рН. На підставі аналізу смуг поглинання амід І та амід ІІ в ІЧ-спектрах оксидів з адсорбованим альбуміном розглянуто зміни в просторовому розташуванні білку на поверхні твердої фази в залежності від рН.

ВСТУП. Наноккомпозити (НК) на основі високодисперсного кремнезему (ВДК) та біополімеру здатні удосконалити деякі біотехнологічні процеси [1]. На прикладі білків встановлено [2], що нативність біополімеру залежить від просторового розташування на носії, отже, надалі це визначає прояв його біоактивності. При адсорбційній взаємодії бичачого сироваткового альбуміну (БСА) із ВДК (А-300) має місце багатоцентрове зв'язування білку за участю як ізольованих ОН-груп, так і віцинальних та гемінальних [3]. Для визначення просторового розташування білку на поверхні твердої фази застосовують декілька методів, в тому числі ІЧ-спектроскопію [4]. Саме завдяки ІЧ-спектроскопії молекул БСА на А-175 встановлено [5], що ізольовані гідроксили взаємодіють з імідними групами біополімеру, віцинальні — з карбонільними, а гемінальні виявлені як одиничні адсорбційні центри. Процес супроводжувався появою у вторинній структурі білку до 10 % витягнутих β -ділянок, хоч в цілому α -структура адсорбованих макромолекул зберігалась. При цьому згорнуті у глобули макромолекули орієнтовані нахилено до поверхні адсорбенту. Для А-300 та змішаних оксидів на його основі такі дослідження відсутні. Тому метою даного дослідження було визначення за допомогою ІЧ-спектроскопії змін у просторовому розташуванні БСА при його адсорбційній взаємодії з ВДК А-300, титано- та алюмокремнеземами при різних значеннях рН.

ЕКСПЕРИМЕНТ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ. Як адсорбенти в роботі використовували ВДК (дослідний завод Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАНУ, Калуш, Україна; $S_{\text{пит}}=285$

$\text{м}^2/\text{г}$), титанокремнезем (ТК20, вміст TiO_2 20 %, $S_{\text{пит}}=84 \text{ м}^2/\text{г}$) та алюмокремнезем (АК1, вміст Al_2O_3 1 %, $S_{\text{пит}}=203 \text{ м}^2/\text{г}$). ВДК попередньо прожарювали 2 год при 400°C , а ТК20 та АК1 — 1 год при 450°C . У дослідах використовували білок БСА (М.в.~67000, фірма Fluka, USA).

Адсорбцію БСА проводили з водних розчинів при рН 2.5, 4.8 та 7.0 при постійному перемішуванні 2 год ($t=20\text{--}23^\circ\text{C}$). Співвідношення адсорбат : адсорбент становило 1:10. Тверду фазу відокремлювали центрифугуванням (10 хв, швидкість 4000 об/хв) та висушували при 37°C , після чого механічно подрібнювали. Величину адсорбції (A) БСА розраховували по різниці концентрації білку в адсорбаті згідно з роботою [6], використовуючи мікробіуретовий метод [7]. Десорбцію білка з поверхні НК проводили у воду протягом 4 год при $20\text{--}23^\circ\text{C}$. Висушені зразки подрібнювали та використовували для ІЧ-спектроскопічних досліджень.

ІЧ-спектри НК знімали на спектрометрі Thermo Nicolet Nexus FTIR в області $4000\text{--}400 \text{ см}^{-1}$. Ступінь покриття поверхні адсорбентів білком (θ) визначали зі співвідношення оптичних густин смуги 3750 см^{-1} до і після адсорбції згідно з даними роботи [8].

Одержані результати свідчать, що БСА здатний до адсорбції на ВДК, ТК20 та АК1 при всіх досліджених значеннях рН, а саме 2.5, 4.8 та 7.0. Але найбільше значення граничної адсорбції (A_∞) альбуміну на поверхні змішаних оксидів спостерігається при рН 4.8 (табл. 1), близькому до ізоелектричної точки (ІЕТ) білку. Згідно з [9] це зумовлено тим, що незаряджені глобули білку ма-

Т а б л и ц я 1

Значення адсорбції БСА на досліджених високодисперсних оксидах

Зразок	Величина граничної адсорбції альбуміну на поверхні зразка								
	рН 2.5			рН 4.8			рН 7.0		
	мг/г	мг/м ²	моль/г·10 ⁻⁷	мг/г	мг/м ²	моль/г·10 ⁻⁷	мг/г	мг/м ²	моль/г·10 ⁻⁷
ВДК	48	0.17	7.05	410	1.44	60.29	41	0.14	6.02
ТК20	64	0.76	9.41	340	4.05	50.0	78	0.93	11.47
АК1	24	0.12	3.52	175	0.86	25.73	24	0.12	3.52

ють мінімальний розмір і їх більша кількість розміщується на одиницю площі поверхні.

Найвища A_{∞} (в мг/м²) при всіх значеннях рН (2.5, 4.8 та 7.0) для ТК20 пояснюється наявністю максимальної кількості містків Si–O(H)–Ti, тобто В-центрів, які можуть сильно взаємодіяти з аміногрупами білку. Для АК1, на поверхні якого міститься менша кількість Si–O(H)–Al містків, спостерігається відповідно і найменша A_{∞} . Відомо [10], що зменшення $S_{\text{пит}}$ відповідає меншій агрегації первинних часток. Тому адсорбція малої кількості білку на поверхні АК1 порівняно з ТК20 може бути спричинена змінами у взаємодії частинка—частинка при утворенні агрегатів і агломератів, розміри яких більші для зразка АК1, ніж для ТК20.

При рН 2.5 та 7.0 A_{∞} зменшується. Це пояснюється впливом латерального відштовхування однойменно заряджених молекул білку в адсорбційному шарі [9]. Крім того, при рН 2.5 молекули БСА можуть взаємодіяти з поверхнею незруйнованих агрегатів, формуючи кілька зв'язків з частками від сусідніх агрегатів, що спричиняє максимальну флокуляцію, яка зменшує A_{∞} [11]. При рН 7.0 (рН > ІЕТ) білкова глобула та поверхня заряджені негативно і A_{∞} знижується через відштовхування однойменних зарядів. Оскільки для доведення розчину білку до рН 7.0 використовували NaOH, то в адсорбаті присутні йони Na⁺, наявність яких може викликати міжмолекулярне відштовхування за рахунок сил гідратації внаслідок формування водної оболонки навколо молекул БСА [12]. Крім того, кількість адсорбованого білку залежить від концентрації OH-груп на поверхні адсорбенту, розмірів первинних частинок, режимів обробки твердої фази (центрифування) [9] та можливих орієнтацій адсорбованих молекул на поверхні зразка, що супроводжується зменшенням α -спіралей [13].

БСА — білок, що належить до α -спірального типу [14]. Зміну конформації поліпептидного ланцюга в ІЧ-спектрах фіксують за зсувом смуг амід I, амід II та амід III [14]. Для неадсорбованого стану альбуміну (рис. 1) наявні смуги амід I в області біля 1650 см⁻¹, амід II — 1550 см⁻¹, а також поглинання в інтервалі 1030–1450 см⁻¹, що захоплюють смугу амід III (1200–1300 см⁻¹). Сму́га амід I описує валентні C=O-коливання пептидної групи білку, C–N-зв'язки та характеризує коливання, в якому змінюється довжина зв'язку C=O. Сму́га амід II визначається взаємодією валентного коливання C–N із деформаційними N–H коливаннями [14]. Сму́ги амід II та III зумовлені коливаннями, при яких зв'язок N–H повертається в площині пептидної групи [14, 15]. Для неадсорбованого стану БСА характерні також N–H коливання в області 3000–3500 см⁻¹: амід А (3300 см⁻¹) та амід В (3060–3100 см⁻¹) [15].

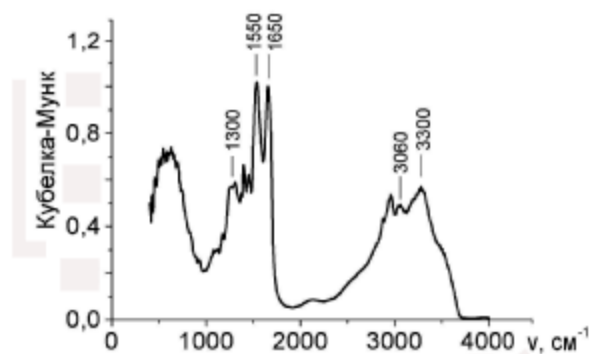


Рис. 1. ІЧ-спектр білка бичачого сироваткового альбуміну.

В ІЧ-спектрах вихідних ВДК, ТК20 та АК1 (рис. 2–4, в, криві 1) спостерігається смуга валентних OH-коливань в області 3750 см⁻¹, що належить ізольованим (вільним) OH-групам [16]. Сму́ги по-

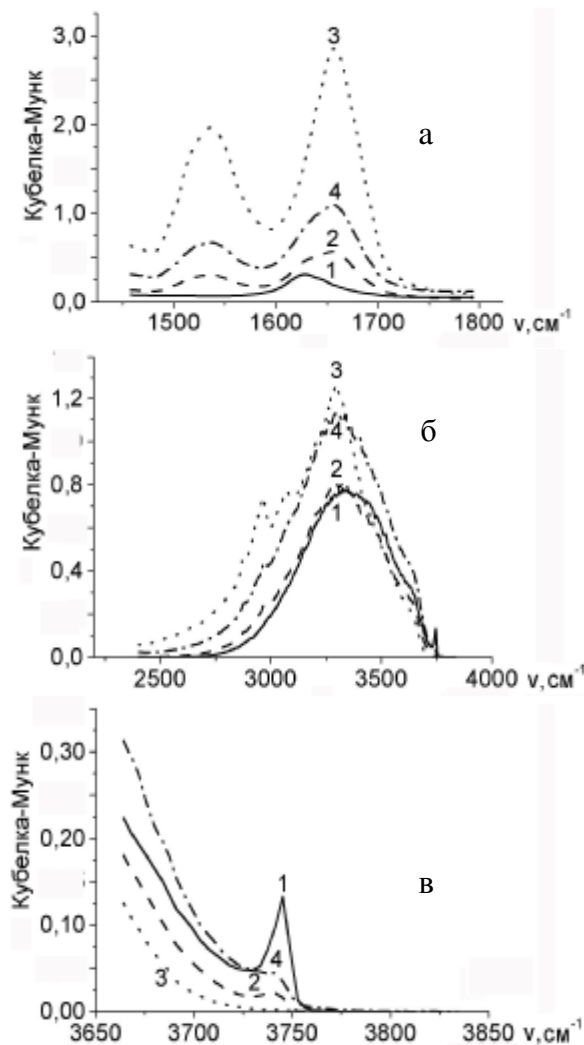


Рис. 2. ІЧ-спектри: 1 — ВДК; 2 — ВДК+БСА (рН 2.5); 3 — ВДК+БСА (рН 4.8); 4 — ВДК+БСА (рН 7.0). Тут і на рис. 3: а — смуга амід I та амід II; б — смуга поглинання в області 3300 см^{-1} ; в — в області 3750 см^{-1} .

глинання 1620 та 3360 см^{-1} (рис. 2–4, б, криві 1) відповідають деформаційним коливанням молекул води та валентним коливанням ОН-груп її адсорбованих молекул, наявність якої може бути пояснена умовами вакуумування [16].

У результаті адсорбції БСА на поверхні оксидів (ВДК, ТК20, АК1) смуга 3750 см^{-1} зникає при рН 4.8, а при рН 2.5 та 7.0 — дещо зменшується (рис. 2–4, в, криві 2–4). Це вказує на безпосередню участь ізольованих ОН-груп кремнезему в утворенні водневого зв'язку з молекулами альбуміну [5]. Крім того, його адсорбція приводить до появи широкої смуги поглинання при 3300 см^{-1} (б,

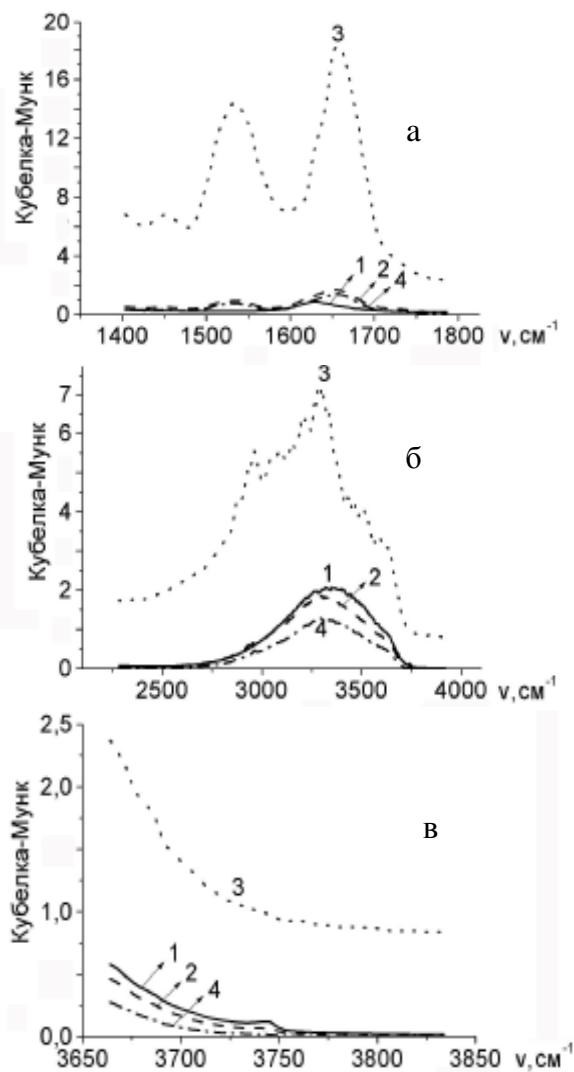


Рис. 3. ІЧ-спектри: 1 — ТК20; 2 — ТК20+БСА (рН 2.5); 3 — ТК20+БСА (рН 4.8); 4 — ТК20+БСА (рН 7.0).

криві 2–4) та появи смуги валентних С=О та N–H коливань (смуга амід I та амід II, а, криві 2–4). Згідно з [16] повне зникнення смуги вільних ОН-груп при 3750 см^{-1} та поява широкої смуги поглинання при 3300 см^{-1} на адсорбованих білком зразках характерне для утворення сильного водневого зв'язку між вільними силанольними групами поверхні кремнезему та карбоксильними і аміногрупами адсорбованого білку.

В ІЧ-спектрах зразків із адсорбованим БСА при рН 4.8 спостерігається зсув смуги амід I у високочастотну область з 1650 до 1655 см^{-1} , що характерно для α -спіральної (звернутої) вторин-

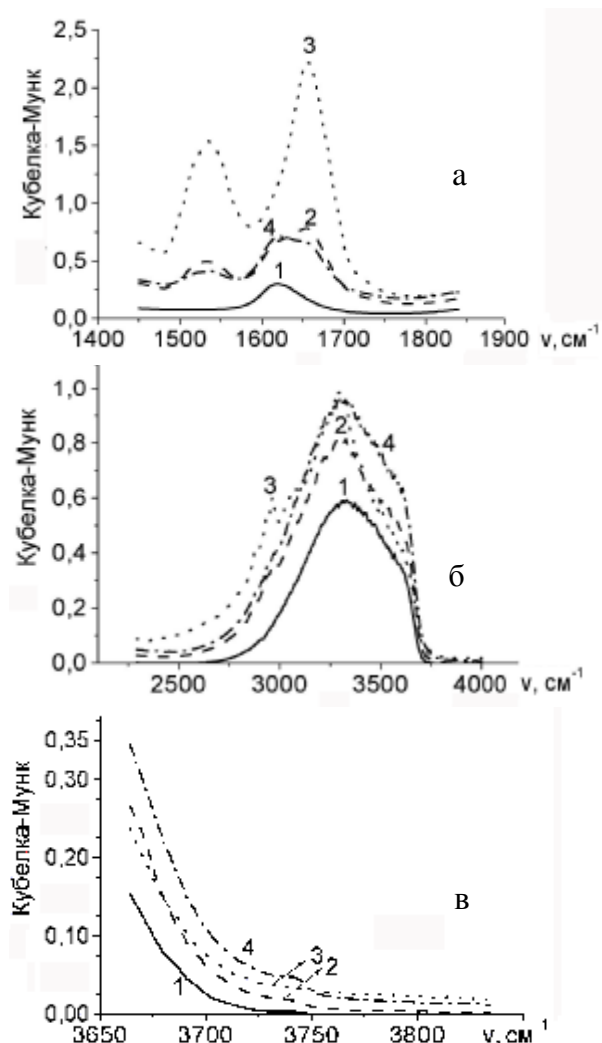


Рис. 4. ІЧ-спектри: 1 — АК1; 2 — АК1+БСА (рН 2.5); 3 — АК1+БСА (рН 4.8); 4 — АК1+БСА (рН 7.0). а — смуга амід I та амід II; б — смуга поглинання в області 3300 см⁻¹; в — в області 3750 см⁻¹

ної структури білку [15]. Для ІЧ-спектрів усіх зразків з адсорбованим білком при рН 2.5 та 7.0 спостерігається низькочастотне плече при 1630 см⁻¹, що свідчить про наявність фізично адсорбованої води та про можливий перехід білкової молекули зі звернутої α-форми (спіраль з внутрішньо молекулярними водневими зв'язками) [15] у β-форму, що визначається наявністю міжмолекулярних водневих зв'язків [5]. Останнє узгоджується з літературними даними [14, 15].

Максимальний ступінь покриття поверхні зразків БСА спостерігається при рН 4.8 (для А-300+БСА — 86, для ТК20+БСА — 97, а для АК1+

Т а б л и ц я 2

Ступінь покриття поверхні зразків білком (θ, %)

Зразок	рН 2.5	рН 4.8	рН 7.0
ВДК	46	86	51
ТК20	44	97	35
АК1	25	95	13

Т а б л и ц я 3

Значення величин А_∞ (моль/г) білка, розраховані за інтенсивністю смуг поглинання БСА

Зразок	рН	Інтегральна інтенсивність смуг поглинання амід I та амід II	А _∞ за даними	
			ІЧ-спектроскопії	адсорбції
ВДК	2.5	47.73	15.21	7.05
	4.8	251.6	112.32	60.29
	7.0	89.9	16.83	6.02
ТК20	2.5	134.26	26.27	9.41
	4.8	1482.33	104.91	50.0
	7.0	115.35	35.17	11.47
АК1	2.5	60.99	12.99	3.52
	4.8	188.32	47.08	25.73
	7.0	50.32	7.96	3.52

+БСА — 95 %) (табл. 2). Отримані нами раніше адсорбційні дані по взаємодії БСА з поверхню високодисперсних оксидів [17] добре узгоджуються з ІЧ-спектроскопічними, оскільки значення А_∞ білку, розраховане за інтенсивністю смуг поглинання БСА (амід I та амід II), співпадає з отриманим експериментально (табл. 3).

ВИСНОВКИ. Отже, методом ІЧ-спектроскопії встановлено, що адсорбція білку на поверхні високодисперсних оксидів залежить від рН розчину та природи поверхні адсорбента. В ІЧ-спектрах для модифікованих альбуміном зразків при рН 4.8 характерне утворення α-спіральної вторинної структури білку. Поява плеча при 1630 см⁻¹ для зразків із адсорбованим білком при рН 2.5 та 7.0 може свідчити про наявність фізично сорбованої води та про перехід білкової молекули зі звернутої α-форми в β-форму. Показано, що значення величин адсорбції альбуміну на поверхні високодисперсних оксидів, розраховані за інтенсивністю смуг поглинання, що належать власне БСА (амід

I та амід II), добре узгоджуються з отриманими експериментально.

Автори висловлюють подяку В.І. Зарко за надання зразків титано- та алюмокремнезему.

РЕЗЮМЕ. Методом ИК-спектроскопии исследовано влияние природы поверхности высокодисперсных оксидов (кремнезема А-300, титано- и алюмокремнезема) на адсорбцию белка бычьего сывороточного альбумина (БСА) при разных значениях pH раствора (2.5, 4.8, 7.0). По данным анализа ИК-спектров установлено, что при pH 4.8 (изоэлектрическая точка (ИЭТ) БСА) во всех случаях процесс сопровождается образованием сильной водородной связи между свободными силанольными группами поверхности и карбоксильными и аминокруппами адсорбированного белка. Снижение величины предельной адсорбции для белка при pH 2.5 и 7.0 для каждого из оксидов и степени покрытия их поверхности БСА свидетельствует о зависимости процесса от особенностей структуры оксида и pH. На основе анализа полос поглощения амид I и амид II в ИК-спектрах оксидов с адсорбированным альбумином рассмотрены изменения в пространственном размещении белка на поверхности твердой фазы в зависимости от pH.

SUMMARY. The effect of surface structure of ultra-fine silicas (silica A-300, titania/silica and alumina/silica) on adsorption of bovine serum albumin (BSA) was studied at various solution pH values (2.5, 4.8, 7.0). To the IR spectra show that the adsorption at pH 4.8 (isoelectric point (IEP) of BSA) was accompanied by the formation of strong hydrogen bonds between free surface silanol groups and carboxil and amino groups of adsorbed protein molecules. Decrease in the plateau adsorption and surface coverage by BSA at pH 2.5 and 7.0 observed for all oxides confirm dependence of the adsorption upon surface structure and pH value. Changes in protein space location at solid surface depending on pH are discussed on the basis of analysis of such absorption bands as amid I and amid II.

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка
НАН України, Київ

Надійшла 24.07.2009

УДК 541.132.4+541.45+541.133

В.В. Стецик

КОНЦЕНТРАЦІЇ ПРАКТИЧНО ГРАНИЧНОГО СТУПЕНЯ ЕЛЕКТРОЛІТИЧНОЇ ДИСОЦІАЦІЇ КИСЛОТ ТА ОСНОВ У РОЗЧИННИКАХ З АВТОПРОТОЛІЗОМ

Досліджено залежність концентрації, при якій досягаються практично граничні ступені електролітичної дисоціації нейтральних кислот (основ) та сольволізу йонів, від констант дисоціації кислот (основ) та констант

© В.В. Стецик, 2010

1. Галаган Н.П., Настасієнко Н.С., Грищенко І.В. та ін. // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. -2004. -2, вип. 2. -С. 597—608.
2. Andrade J.D., Hlady V.L., Van Vagenen R.A. // Pure and Appl. Chem. -1984. -56, № 10. -Р. 1345—1350.
3. Воронін Є.П., Пахлов Є.М., Власова Н.М. та ін. // Фарм. журн. -1999. -№ 4. -С. 61—63.
4. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / Под ред. Г. Парфита, К. Рочестера. -М.: Мир, 1986.
5. Тарасевич Ю.И., Смирнова В.А., Монахова И.Л. // Коллоид. журн. -1979. -XL. -Вып. 6. -С. 1214—1216.
6. Айвазов Б.В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции. -М.: Высш. шк., 1973.
7. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. -М.: Высш. шк., 1980.
8. Пахлов Е.М. // Химия, физика и технология поверхности. -2008. -Вып. 11—12. -С. 271—283.
9. Чуйко А.А., Власова Н.Н., Давиденко Н.К. и др. // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. -Киев: Наук. думка, 2003. -С. 116—152.
10. Gun'ko V.M., Nychiporuk Y.M., Zarko V.I. et al. // Appl. Surf. Sci. -2007. -253. -Р. 3215—3230.
11. Gun'ko V.M., Zarko V.I., Voronin E.F. et al. // Langmuir. -2002. -581. -Р. 581—596.
12. Gun'ko V.M., Klyueva A.V., Levchuk Y.N. et al. // Adv. in Colloid and Interface Sci. -2003. -105. -Р. 201—328.
13. Gray J.J. // Current Opinion in Structural Biology. -2004. -14. -Р. 110—115.
14. Соркина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. -Киев: Выща шк., 1989.
15. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. -М.: Наука, 1965.
16. Литтл Л. Инфракрасные спектры адсорбированных молекул. -М.: Мир, 1969.
17. Клименко Н.Ю., Галаган Н.П., Місчанчук Б.Г. та ін. // Химия, физика и технология поверхности. -2008. -Вып. 14. -С. 456—466.