

УДК 544.723.2; 577.112.34

Маніло М.В., Ар'єв І.А., Литвинов Г.С.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ КОНСТРУЮВАННЯ БІОНАНОКОМПЗИТІВ НА ОСНОВІ ВЗАЄМОДІЇ АЛІФАТИЧНИХ АМІНОКИСЛОТ ІЗ ВУГЛЕЦЕВИМИ НАНОТРУБКАМИ

This paper studies the interaction between biological molecules and novel nanomaterials such as carbon nanotubes (CNT). The latter plays a crucial role in developing novel types of miniature devices for biological purposes. We also investigate the immobilization behavior of aminoacids in the multi-wall carbon nanotubes to create functional aminoacid/CNT conjugates. Furthermore, we use spectrophotometric methods. We show that the location of adsorbate molecules on the CNTs surface depends on the alkalinity and acidity of the solution. This fact proves that the interaction has the physical nature. We also study kinetics and examine influences of pH and concentration-dependence of adsorption of these molecules onto the CNT surfaces for optimizations of immobilization processes. The results obtained can serve for purposeful creation of bionanocomposites with a given surface concentration of amino-functional carbon nanotubes by using the variation of time, pH and concentration of the adsorptive. They also further optimization of these technology processes for constructing such materials and time parameters.

Вступ

Актуальною проблемою сьогодення є забезпечення цілеспрямованого транспорту біологічно активних речовин (БАР) до клітин-мішеней. Для створення терапевтичних або лікувально-профілактичних композитів важливим є визначення параметрів зв'язування (імобілізації) БАР із переносниками. На особливу увагу як сорбенти в біонанотехнологіях і медичній фармакохімії заслуговують вуглецеві нанотрубки (ВНТ) [1], які є інтактними живим клітинам і не руйнують біологічні молекули. В літературі досліджена функціоналізація ВНТ біологічно важливими речовинами: амінами, амінокислотами, білками [2, 3], молекулами ДНК [4], нуклеотидами [5] та ін.

Постановка задачі

Метою досліджень є визначення оптимальних умов утворення біотехнологічних нанокмпозитів на основі низькомолекулярних сполук (амінокислот) і ВНТ.

Матеріали і методи

Для одержання нанокмпозитів амінокислот і вуглецевих нанотрубок використовували багат шарові вуглецеві нанотрубки виробництва ТОВ "СПЕЦМАШ" (м. Київ) з питомою поверхнею $254 \text{ м}^2/\text{г}$, зовнішнім діаметром 10–20 нм, довжиною 1–10 мкм і вмістом мінеральних домішок не більше 1%. Як вихідні амінокислоти (гліцин, аланіни) застосовували реактиви "х.ч." виробництва Reanal (Угорщина). Створення біонанокмпозиту здійснюва-

лося адсорбцією за температури $293 \pm 1 \text{ К}$ на шейкері в широкому інтервалі pH, значення якого підтримувалося різними буферними розчинами. Концентрація БАР визначалася спектрофотометричними методами.

Оптимізація процесу імобілізації БАР на ВНТ проводилася за тривалістю часу контакту БАР і ВНТ та pH робочого середовища.

Результати і їх обговорення

На рис. 1 наведено кінетичні криві при $\text{pH} = 6,00$. Видно, що, за винятком великих експозицій ($t > 50\text{--}60 \text{ хв}$), форми кінетичних залежностей досить подібні, а саме: швидка сорбція протягом перших 3–5 хв змінюється інтервалами, де її значення практично незмінні. В подальшому спостерігається деяке змен-

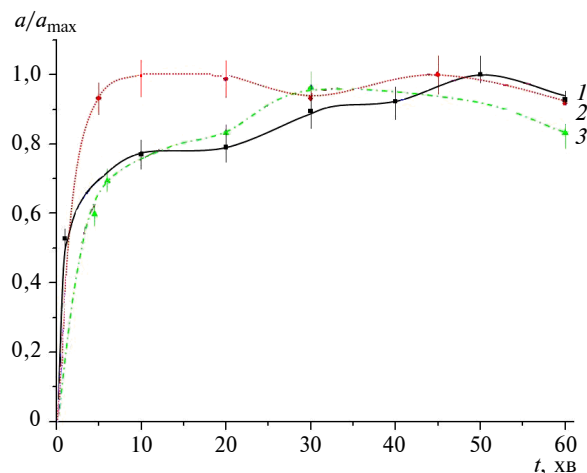


Рис. 1. Кінетичні залежності адсорбції амінокислот ВНТ при $\text{pH} = 6,00$ для концентрації адсорбтивів $(1,40 \pm 0,20) \times 10^{-4} \text{ моль/дм}^3$: 1 – α -аланін, 2 – β -аланін, 3 – гліцин

шення адсорбції, що може свідчити про повільні релаксаційні процеси встановлення адсорбційної рівноваги.

Принадно зауважити, що дослідження кінетики іммобілізації біологічно активних низькомолекулярних речовин на ВНТ проводилися в широкому інтервалі рН (від 1,84 до 12,05) і подібні за тенденціями результати були отримані для різних початкових концентрацій.

Основою для вибору оптимальних часових технологічних параметрів при виготовленні біонанокompatитів з використанням амінокислот і ВНТ може слугувати табл. 1, де наведено відносні величини адсорбції за різного часу взаємодії з адсорбентом.

Таблиця 1. Залежність адсорбції алкільних амінокислот від часу взаємодії з ВНТ при рН = 6,00

Амінокислота	Час, хв	Сорбція, %
Гліцин	3	25,8
	30	36,4
	50	40,7
α -аланін	3	64,9
	30	73,1
	45	78,5
β -аланін	3	54,3
	6	91,9
	30	88,9

На рис. 2. подано залежності питомої сорбції від рН. Як видно, при рН поблизу ізоелектричної точки (6,00–7,00) мінімуми на кривих залежностей адсорбції від рН для гліцину та обох форм аланіну збігаються, причому для α -аланіну спостерігався найбільш глибокий мінімум порівняно з двома іншими амінокислотами. При зменшенні рН розчинів від 6,00 до 3,00 зміни адсорбції трьох досліджених амінокислот є подібними і проявляються в зростанні адсорбції у 3-4 рази для обох форм аланіну і набагато менше для гліцину – в 1,25 разу. При подальшому збільшенні концентрації йонів водню в буферному розчині (рН = 3,00–1,84) адсорбція гліцину і α -аланіну зменшувались, а β -аланіну, навпаки, збільшувалась.

При рН $\geq 6,00$ спостерігається зростання адсорбції із досягненням максимуму при рН = 9,20, ступінь вираженості якого залежить від природи амінокислоти (найчіткіший і найбільший відносний максимум спостерігався для гліцину). При рН від 9,20 до 10,50 відбувалось зниження величини адсорбції – різке (на 30 %) для гліцину і плавне, майже непомітне (на 7 %),

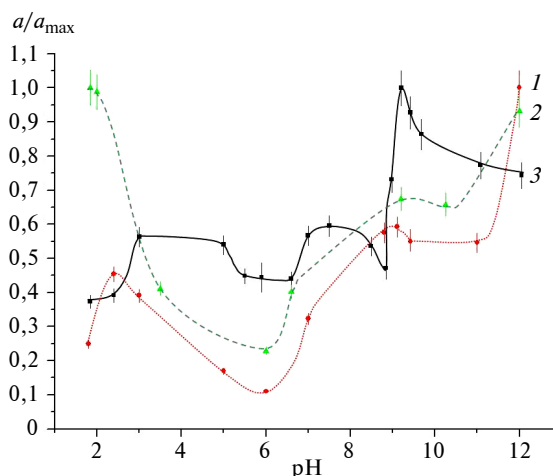


Рис. 2. Залежності питомої сорбції (a/a_{\max}) амінокислот від рН для концентрації $(1,40 \pm 0,20) \times 10^{-4}$ моль/дм³: 1 – α -аланін, 2 – β -аланін, 3 – гліцин

для аланінів. Надалі при зростанні рН до 12,05 адсорбція аланінів значно, у 2 рази, зростала, а для гліцину продовжувала дещо, в 1,1 разу, зменшуватись. Така немонотонна, з кількома максимумами і мінімумами, залежність взаємодії амінокислот з ВНТ від концентрації водневих йонів може свідчити про значну роль у цих процесах йон-індукційних сил, залежних від зарядженості й дипольності молекул адсорбатів. На це, зокрема, вказує і певна кореляція адсорбції з відносним вмістом чотирьох електростатичних форм амінокислоти гліцину [6].

При виборі оптимального значення параметра рН для забезпечення бажаної величини сорбції залежно від технологічних цілей орієнтиром можуть виступати дані, наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Залежність адсорбції амінокислот і ВНТ від рН розчинів

Амінокислота	рН	a/a_{\max}
Гліцин	1,84	0,37
	6,00	0,45
	9,20	1,00
	12,05	0,74
α -аланін	1,84	0,25
	6,00	0,11
	9,20	0,59
	12,05	1,00
β -аланін	1,84	1,00
	6,00	0,23
	9,20	0,67
	12,05	0,93

На рис. 3 наведено ізотерми сорбції гліцину, α - і β -аланіну.

Для всіх досліджених амінокислот форми ізотерм адсорбції принципово не різняться. Початкові ділянки ізотерм відповідають процесу утворення моношару адсорбату на поверхні ВНТ. При зростанні рівноважної концентрації C до деякого значення, що характеризує заповнення поверхні ВНТ моношаром речовини, спостерігається плато. При подальшому зростанні концентрації адсорбату в розчині для всіх досліджених амінокислот спостерігається поведінка, характерна для полімолекулярної адсорбції (див. рис. 3).

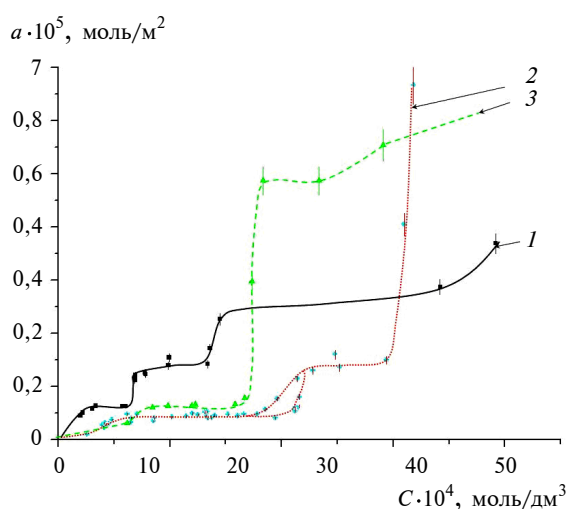


Рис. 3. Ізотерми адсорбції при $\text{pH} = 6,00$: 1 – гліцину, 2 – α -аланіну, 3 – β -аланіну

У випадку гліцину формування моношару починається при менших ($C = 1,5 \times 10^{-4}$ моль/дм³) концентраціях, ніж для α - і β -аланіну. Полішари гліцину формуються вже при $C > 3,5 \times 10^{-4}$ моль/дм³, а для α - і β -аланіну – при $C > 10,5 \times 10^{-4}$ моль/дм³ і $C > 9,1 \times 10^{-4}$ моль/дм³ відповідно. Найдовша горизонтальна ділянка мономолекулярної адсорбції спостерігається для α -аланіну, що свідчить про більш повне заповнення поверхні ВНТ моношаром адсорбату. Зменшення довжини горизонтальної ділянки і, відповідно, заповнення поверхні ВНТ моношаром амінокислоти відбувається у послідовності: α -аланін– β -аланін–гліцин. Можна при-

пустити, що більша концентрація адсорбтиву, необхідна для забезпечення граничного тиску молекул на поверхню ВНТ, заповнену моношаром, у випадку α -аланіну, порівняно з β -аланіном і гліцином, пов'язана зі зменшенням латеральних взаємодій, що впорядковують молекули адсорбату в бішарі внаслідок більш розгалуженого N-кінця молекули α -аланіну. Такі латеральні зв'язки, неоднакові при різних pH розчину, які впливають на концентрацію конкуруючих електролітичних форм амінокислоти, забезпечуються множиною електростатичних, індукційних, диполь-дипольних і дисперсійних взаємодій між молекулами адсорбату.

В області високих концентрацій розчинів адсорбтивів ($C > 15 \times 10^{-4}$ моль/дм³) величина адсорбції зменшується в ряді α -аланін– β -аланін–гліцин, причому найбільш слабка залежність адсорбції від C спостерігалась для гліцину, що свідчить про важливий вплив не лише наявності, але й положення метильної групи в структурі амінокислоти. Відмінності форм кривих полімолекулярної адсорбції, які спостерігаються для досліджених амінокислот, швидше за все, є наслідком відмінностей фізико-хімічної структури молекул-асоціатів у водних розчинах, які визначають характер і внесок різних енергетичних компонентів взаємодії молекул амінокислот із ВНТ при адсорбції.

У табл. 3 наведено розраховані значення граничної сорбції ВНТ, а також розміри посадкової площі s , константи рівноваги k_f і вільної енергії $-G$, які характеризують мономолекулярну адсорбцію досліджених амінокислот при $\text{pH} = 6,00$.

Як видно з графіків залежностей на рис. 2, 3 і з табл. 3, адсорбція і, відповідно, компактизація молекул на вуглецевій поверхні досягають абсолютних максимумів для гліцину та α -аланіну при значеннях pH , що дорівнюють 9,20 і 12,05 відповідно, а для β -аланіну – при 1,84 і 12,05. Проведені розрахунки показали, що при цьому посадкові площі для гліцину і β -аланіну вже при $\text{pH} = 6,00$ зменшуються аж до мінімально можливих величин, які корелюють з розрахованими за кристалграфічними

Таблиця 3. Основні показники адсорбції аліфатичних амінокислот ВНТ при $\text{pH} = 6,00$

Амінокислота	Гранична сорбція, мг/м ²	Посадкова площа s , нм ²	Рівновага $k_f \times 10^{-3}$	Вільна енергія $-G$, кДж/моль
Гліцин	$10,5 \pm 0,5$	$0,263 \pm 0,002$	$6,00 \pm 0,02$	$21,18 \pm 0,01$
α -аланін	$13,4 \pm 0,4$	$0,374 \pm 0,05$	$1,65 \pm 0,24$	$18,04 \pm 0,26$
β -аланін	$18,1 \pm 0,4$	$0,255 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,27$	$16,67 \pm 0,07$

[7] геометричними параметрами мінімальних площ перерізів, які проходять через короткі осі цих еліпсоїдальних молекул, 0,14–0,16 нм². Перерізи, які містять довгі осі цих еліпсоїдальних молекул, мають у 2-3 рази більші площі – 0,34 і 0,44 нм² відповідно. Таким чином, величина посадкової площі для гліцину і β-аланіну на ВНТ відповідає розміщенню типу “частоколу” [8].

Для молекули α-аланіну на ВНТ посадкова площа відповідає положенню, коли молекула займає найбільшу (з двох можливих) площу 0,38 нм², що, згідно з розрахунком за кристалографічними даними [7], збігається з площею перерізу, який проходить через проекції CH₃- і NH₃⁺-груп на поверхню ВНТ.

Слід відзначити, що для молекул гліцину і β-аланіну в околі ізоелектричних точок (рН = 6,00) отримані на основі наших адсорбційних даних значення посадкових площ для досліджених амінокислот у 1,5-2 рази перевищують теоретично розраховані за густинами кристалічних амінокислот у сферичному наближенні. Це означає, що упаковка молекул цих амінокислот на поверхні ВНТ при зазначеній концентрації водневих йонів є нещільною, відстані між центрами молекул збільшуються на 25–30 %. Той факт, що для молекул гліцину і β-аланіну при змінах рН ≤ 7 у бік рН ≥ 7, як і при переході від ізоелектричної точки до більших рН, спостерігаються істотні зменшення посадкових площ, дає підстави вважати, що їх упаковка на поверхні ВНТ при рН = 6,00 є найменш щільною. Причинами декомпактизації можуть бути проникнення молекул води між молекулами амінокислот та/або зміни топології розміщення молекул внаслідок їх переорієнтації при перерозподілі поверхневого заряду, змінах водневих взаємодій молекул з ВНТ і зарядженості кінцевих груп, спричинених таутомірним переносом протонів.

Висновки

Адсорбції аліфатичних амінокислот із водно-буферних розчинів поверхнею ВНТ мають значення вільної енергії, типові для низькоенергетичної фізичної взаємодії адсорбату з адсорбентом. Досягнення адсорбційної рівноваги

відбувається протягом часу, який не перевищує 30–60 хв, з подальшими коливаннями величини адсорбції, що може свідчити про наявність повільних сорбційно-десорбційних процесів при взаємодії амінокислот з поверхнею ВНТ на стадії насичення адсорбції. Оптимальний час для досягнення максимальної адсорбції амінокислот ВНТ для різних амінокислот становить: для гліцину – 40–60 хв, для α-аланіну – 30–40 хв і для β-аланіну – 10–20 хв.

Також різняться концентрації адсорбтиву, за якого відбувається формування першого і наступних шарів для різних амінокислот із дослідженої сукупності при фіксованих рН.

Залежності величин адсорбції від концентрації водневих йонів мають багатоекстремний характер, положення екстремумів частково корелюють зі значеннями відносних концентрацій різних електролітичних форм амінокислот.

Експериментально визначені посадкові площі при концентраціях водневих йонів, які відповідають максимальній адсорбції, є близькими до таких для надщільної упаковки в молекулярних кристалах досліджених амінокислот і варіюють зі змінами рН, набуваючи найбільших значень при наближенні до ізоелектричної точки, перевищуючи теоретично розраховані значення за густинами амінокислот у кристалічному стані.

Розміщення молекул адсорбатів на поверхні ВНТ залежить від лужності-кислотності розчину, що вказує на фізичний характер взаємодії і допускає зміни орієнтації молекул у поверхневому шарі зі змінами параметрів середовища. Відмінності форм кривих полімолекулярної адсорбції, які спостерігались для досліджених амінокислот, можуть бути пов'язані з особливостями фізико-хімічної структури молекул адсорбтивів у водних розчинах.

Подальші дослідження будуть спрямовані на створення біонаноконструкцій із заданою поверхневою концентрацією амінокислот-функціоналів ВНТ з використанням варіації часу, рН і концентрації адсорбтиву, а також дадуть можливість оптимізувати технологічні процеси такого конструювання за матеріальними та часовими параметрами.

2. *N.W. Shi Kam and H. Dai*, "Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, pp. 6021–6026, 2005.
3. *K. Keren et al.*, "DNA-templated carbon nanotube field-effect transistor", *Science*, vol. 302, pp.1380–1382, 2003.
4. *A. Bianco et al.*, "Applications of carbon nanotubes in drug delivery", *Current Opinion Chem. Biol.*, vol. 9, pp. 674–679, 2005.
5. *Адсорбция* аденозина, аденозинмонофосфата и аденозинтрифосфата из водных растворов на поверхности многослойных углеродных нанотрубок / М.В. Манило, Т.А. Алексева, И.А. Арьев и др. // *Коллоид. журн.* – 2011. – 73, № 2. – С. 235–238.
6. *Робинсон Р., Стокс Р.* Слабые электролиты. – М.: Изд-во иностр. лит-ры 1963. – 648 с.
7. *Китайгородский А.И.* Органическая кристаллохимия. – М.: Изд-во АН СССР, 1955. – 558 с.
8. *Адамсон А.* Физическая химия поверхностей. – М.: Мир, 1979. – 568 с.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
17 квітня 2012 року