

PACS numbers: 61.48.De, 68.43.Mn, 81.05.ub, 81.16.Fg, 87.14.G-, 87.85.Qr, 87.85.Rs

Створення комплексів біомономерів з вуглецевими нанорурками

М. В. Маніло^{*,**}, І. А. Ар'єв^{**}, Г. С. Литвинов^{*}

**Національний технічний університет України «КПІ»,
просп. Перемоги, 37,
03056 Київ, Україна*

***Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України,
бульв. Акад. Вернадського, 42,
03142 Київ, Україна*

З метою створення біонанокompозита експериментально досліджено процеси зв'язування біомономерів (на прикладі амінокислот з алифатичними і ароматичними радикалами) вуглецевими нанорурками, а також визначено основні характеристики (розміри посадкових площ, константи рівноваги, вільні енергії) сорбції в широкому інтервалі рН. Знайдено оптимальні значення параметрів середовища для створення композитів амінокислота–вуглецеві нанорурки.

The processes of biomonomers (aminoacids with aliphatic and aromatic radicals) binding by multiwalled carbon nanotubes are investigated experimentally with an objective to fabricate bionanocomposites. Main parameters of sorption (free energies, surface areas per biomolecule, equilibrium constants) are calculated. Optimal values of medium parameters for fabrication of aminoacid–carbon nanotubes' composites are determined.

Для создания бионанокompозита экспериментально изучены процессы связывания биомономеров (на примере аминокислот с алифатическими и ароматическими радикалами) углеродными нанотрубками, а также рассчитаны основные характеристики (размеры посадочных площадок, константы равновесия, свободные энергии) сорбции в широком интервале рН. Определены оптимальные значения параметров среды для создания композитов аминокислота–углеродные нанотрубки.

Ключові слова: адсорбція, біомомери, амінокислоти, вуглецеві нанорурки, біонанокompозити.

(Отримано 13 березня 2012 р.)

1. ВСТУП

Для використання в біонанотехнологіях перспективними є вуглецеві нанорурки (ВНР) [1], які є гідрофобними і нерозчинними в більшості біологічних систем та можуть бути функціоналізовані біологічно важливими речовинами: амінами, амінокислотами, білками [2, 3], молекулами ДНК [4], нуклеотидами [5] та ін. Така функціоналізація знижує токсичність ВНР і дозволяє застосовувати їх як транспортні засоби цілеспрямованої дії без руйнування біологічних молекул. Дослідження взаємодії біомономерів з ВНР є надзвичайно важливим для розвитку новітніх біотехнологій зі створення стабільних транспортних систем. Особливої уваги заслуговують дослідження досить простих речовин, які одночасно мають лікувальну чи терапевтичну дію, а саме: гліцин, α - і β -аланін, фенілаланін і триптофан. Гліцин — найпростіша амінокислота з алифатичним вуглеводневим радикалом, яка входить до складу білків і є попередником у біосинтезі порфіринових сполук і пуринових основ нуклеїнових кислот, а також є лікарським седативним засобом та компонентом парентерального харчування. Аланін — заміна амінокислота, що є важливим джерелом енергії для головного мозку і центральної нервової системи; укріплює імунну систему шляхом вироблення антитіл, знижує ризик утворення каміння у нирках, регулює рівень глюкози в крові. Це одна з основних амінокислот, які витрачаються в м'язових тканинах при фізичних навантаженнях. Аланін існує в двох формах: α -аланін — зустрічається у вільному стані і входить до складу багатьох білків, легко включається у процеси обміну вуглеводнів і органічних кислот, приймає участь в детоксикації аміаку при фізичних навантаженнях. β -аланін — природна β -амінокислота, яка у вільному стані виявляється в тканинах мозку і входить до складу низки біологічно активних сполук, наприклад, пантотенової кислоти (вітамін В5), коензиму А (один з найважливіших каталізаторів в організмі), карнозину і ансерину (азотисті екстрактивні речовини кістякової мускулятури). Біологічна дія β -аланіну, як складової карнозину, визначається буферними властивостями амінокислоти в м'язовій тканині, що перешкоджає закисненню середовища під час інтенсивних навантажень. Фенілаланін — амінокислота, яка є сировиною для солодшого у 200 разів за сахарозу харчового пептидного підсолоджувача аспартама. При введенні в організм фенілаланін впливає на настрій, пригнічує біль, покращує пам'ять і здібності до навчання, у зв'язку з чим його використовують при лікуванні артрити, депресії, мігрені, синдрому хронічної втоми та інших захворювань. Триптофан — незамінна амінокислота, яка регулює функцію ендокринної системи і таким чином попереджає анемію, регулює кров'яний тиск, відповідає за синтезу гемоглобіну. Припускають, що ця амінокислота стимулює

секрецію інсуліну, що, у свою чергу, активує синтезу жирних кислот у печінці, і особливе значення має у фармакології, де вона та її похідні застосовуються як інгредієнти багатьох лікарських препаратів, наприклад, при таких захворюваннях, як рак, туберкульоз та діабет. Триптофан сприяє нормальному функціонуванню різних систем організму. Нестача його призводить до розвитку пелагри, погіршення стану зубів, помутніння рогівки ока, катаракти. В літературі наведені результати досліджень адсорбції амінокислот на традиційних сорбентах (наприклад, шаруваті силікати як складові біополімера [6]) та результати моделювання адсорбції амінокислот на ВНР [7], але експериментально адсорбцію амінокислот на ВНР практично не досліджено.

Метою роботи було дослідження умов утворення біонанокомпозита на основі амінокислот і вуглецевих нанорурок; експериментально дослідити та визначити основні характеристики процесу прикріплення біомономерів до ВНР.

2. МАТЕРІЯЛИ І МЕТОДИ

Для одержання нанокомпозитів амінокислот і вуглецевих нанорурок використовували багатошарові вуглецеві нанорурки 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, α -, β -аланін, L-карбобензоксифенілаланін, триптофан) застосовували реактиви «х.ч.» виробництва Reanal (Угорщина). Створення біонанокомпозита здійснювалося шляхом адсорбції при температурі $293 \pm 1 \text{ К}$ на шейкері в широкому інтервалі рН, значення яких підтримувалося різними буферними розчинами. Концентрація біологічно важливих сполук визначалася спектрофотометричними методами.

3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

На рисунку 1 наведено типові залежності питомої сорбції α - і β -аланіну, гліцину (рис. 1, а) та L-карбобензоксифенілаланіну і триптофану (рис. 1, б) від рН.

Відмітимо, що значення рН екстремумів сорбції для всіх досліджених амінокислот збігаються (рН = 6,00), при цьому це мінімальне і максимальне значення сорбції для амінокислот з аліфатичним та ароматичним радикалом відповідно. Подібна поведінка може бути пояснена максимальним вмістом у дослідженому розчині амінокислоти, її електроневтральної цвіттер-йонної форми (див. табл. 1), а відмінність у характері сорбційних кривих може свідчити про різні механізми приєднання досліджених аліфатичних і

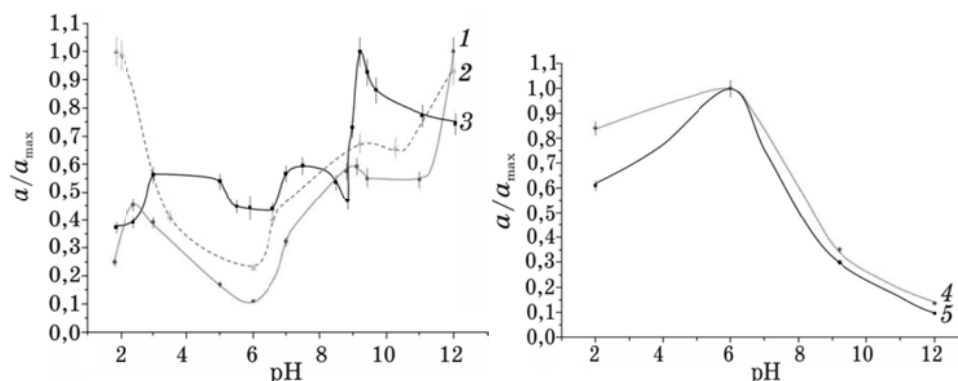


Рис. 1. Залежність питомої сорбції (a/a_{\max}) амінокислот від рН для випадку мономолекулярної сорбції: 1 — α -аланін; 2 — β -аланін; 3 — гліцин; 4 — триптофан; 5 — L-карбобензоксифенілаланін.

ароматичних амінокислот до ВНР.

Так, при $\text{pH} \leq 6,00$ поведінка для α -амінокислот є подібною: зростання величини питомої адсорбції від $\text{pH} 6,00$ до $\text{pH} 2,00$ – $3,00$ з подальшим зменшенням адсорбції із зменшенням pH . При $\text{pH} \geq 6,00$ спостерігається зростання адсорбції і досягнення максимуму при $\text{pH} 9,20$, ступінь вираження якого залежить від структури амінокислоти (найчіткіший максимум характерний для гліцину). Після $\text{pH} 9,20$ відбувається плавне зниження величини адсорбції.

Для β -аланіну максимуми на залежності питомої адсорбції від pH зміщені в бік $\text{pH} \leq 3$ і $\text{pH} \geq 9,20$. Подібний характер взаємодії може свідчити про наявність йон-індукційної взаємодії аланіну з ВНР. Для амінокислот з ароматичним радикалом зростання адсорбції відбувається симбатно із збільшенням pH від $2,00$ до $6,00$ і подальшим зменшенням до $12,05$. Відмітимо, що триптофан сорбується краще, ніж L-карбобензоксифенілаланін, що може бути пояснено кращою його розчинністю у водних розчинах.

Для спрощення порівняння спорідненості ВНР до амінокислот, всі подальші результати наводяться для значення $\text{pH} = 6,00$.

Кінетичні криві для $\text{pH} = 6,00$ для мономолекулярної сорбції наведено на рис. 2.

Як видно з рисунка 2 форми кінетичних кривих для всіх досліджених амінокислот є подібними: швидке зростання величини адсорбції протягом перших 3–5 хв. змінюється інтервалами, на яких її значення майже стає. Досягнення рівноваги відбувається протягом часу, що не перевищує 30–45 хв., з подальшим невеликим спаданням величини адсорбції, що може свідчити про незначну десорбцію амінокислоти з поверхні ВНР. Отже, оптимальним часом для виконання адсорбції амінокислот ВНР є 40–60 хв.

ТАБЛИЦЯ 1. Розподіл (%) основних форм амінокислот залежно від рН, розрахований із констант йонізації амінокислот [8].

рН	Катіонна форма			Цвіттер-йон			Аніонна форма		
	Гліцин	α -аланін	β -аланін	Гліцин	α -аланін	β -аланін	Гліцин	α -аланін	β -аланін
2,00	68,63	97,30	70,58	31,36	2,74	29,41	7,60 $\cdot 10^{-7}$	1,19 $\cdot 10^{-8}$	1,20 $\cdot 10^{-6}$
4,00	2,14	26,18	2,34	97,85	73,82	97,63	2,40 $\cdot 10^{-4}$	3,22 $\cdot 10^{-5}$	3,98 $\cdot 10^{-4}$
6,00	2,18 $\cdot 10^{-2}$	0,35	2,40 $\cdot 10^{-2}$	99,95	99,55	99,93	2,50 $\cdot 10^{-2}$	4,35 $\cdot 10^{-3}$	4,07 $\cdot 10^{-2}$
8,00	2,14 $\cdot 10^{-4}$	3,53 $\cdot 10^{-3}$	2,31 $\cdot 10^{-4}$	97,56	99,57	96,09	2,43	0,43	3,90
10,00	2,25 $\cdot 10^{-7}$	1,12 $\cdot 10^{-5}$	4,73 $\cdot 10^{-7}$	18,30	56,29	19,71	81,68	43,70	80,28
12,00	8,68 $\cdot 10^{-11}$	7,94 $\cdot 10^{-9}$	5,87 $\cdot 10^{-9}$	0,39	2,24	0,24	99,59	97,75	99,73
13,00	8,71 $\cdot 10^{-13}$	8,11 $\cdot 10^{-11}$	5,89 $\cdot 10^{-13}$	3,98 $\cdot 10^{-2}$	0,23	2,45 $\cdot 10^{-2}$	99,95	99,78	99,97

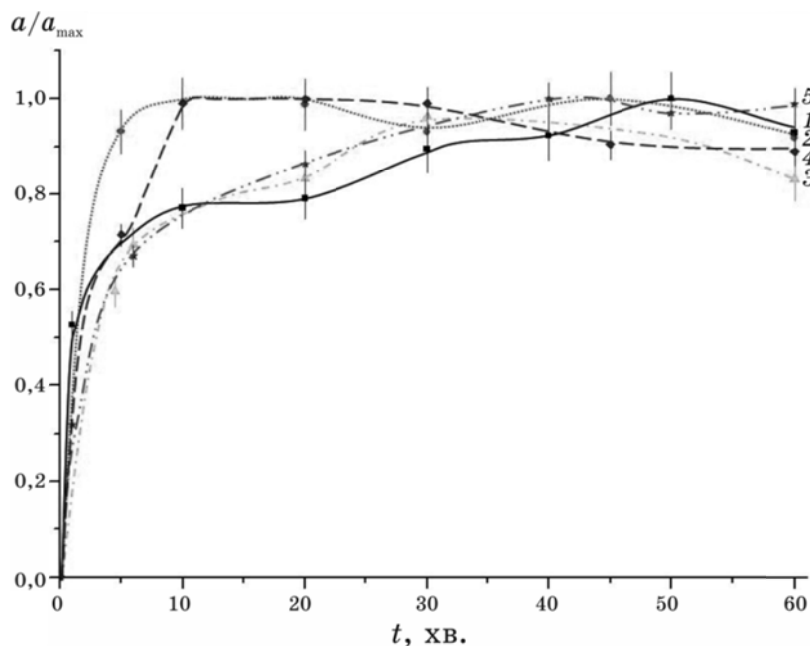


Рис. 2. Кінетика адсорбції амінокислот ВНР при рН 6,00 для концентрацій $C = (1,40 \pm 0,20) \cdot 10^{-4}$ моль/дм³: 1 — α -аланін; 2 — β -аланін; 3 — гліцин; 4 — триптофан; 5 — L-карбобензоксифенілаланін.

Для гліцину і L-карбобензоксифенілаланіну; 30–40 хв. для α -аланіну; 10–20 хв. для β -аланіну і триптофану.

У таблиці 2 наведено константи швидкості сорбційного процесу, місткість сорбенту та перерахована на мг/м² сорбція амінокислот. Розрахунок констант швидкості здійснювався при рН 6,00 за відношенням тангенса кута нахилу на початковій ділянці кінетичної кривої до початкової концентрації амінокислоти [9].

ТАБЛИЦЯ 2. Основні сорбційні параметри ВНР, розраховані для рН = 6,00.

Амінокислота	Константа швидкості $k \cdot 10^3$, дм ³ /(моль·хв.)	Місткість сорбенту при рН = 6,00, ммоль/г	Гранична сорбція при рН = 6,00, мг/м ²
Гліцин	$0,59 \pm 0,09$	$0,84 \pm 0,06$	$10,5 \pm 0,5$
α -аланін	$7,13 \pm 0,29$	$0,15 \pm 0,06$	$13,4 \pm 0,4$
β -аланін	$36,71 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,04$	$18,1 \pm 0,4$
Триптофан	$2,83 \pm 0,42$	$4,97 \pm 0,05$	$4,0 \pm 0,3$
L-карбобензоксифенілаланін	$1,13 \pm 0,08$	$2,89 \pm 0,05$	$3,4 \pm 0,2$

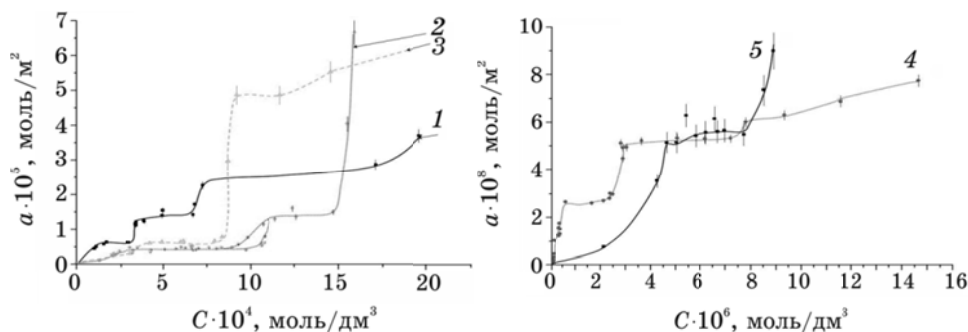


Рис. 3. Ізотерми адсорбції: 1 — гліцину, 2 — α -аланіну, 3 — β -аланіну (а); 4 — триптофану, 5 — L-карбобензоксифенілаланіну поверхнею ВНР (б).

На рисунку 3 наведено ізотерми адсорбції досліджених амінокислот поверхнею ВНР, виміряні при кімнатній температурі при рН 6,00.

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

У випадку гліцину формування моношару починається при менших ($C = 1,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) концентраціях, ніж для α - і β -аланіну. Полішари гліцину формуються вже при $C > 3,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, а для α - і β -аланіну при $C > 10,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ та $C > 9,1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ відповідно. Найбільш довга горизонтальна ділянка мономолекулярної адсорбції спостерігається для α -аланіну, що свідчить про більш повне заповнення поверхні ВНР моношаром адсорбату. Зменшення довжини горизонтальної ділянки і відповідно заповнення поверхні ВНР моношаром амінокислоти відбувається в низці: α -аланін– β -аланін–гліцин. Можна припустити, що найбільш щільне заповнення поверхні ВНР моношаром α -аланіну, порівняно з β -аланіном і гліцином, відбувається за рахунок посилення латеральних взаємодій між молекулами адсорбату внаслідок розгалуження вуглеводневого кістяка α -аланіну. Зазначеними латеральними взаємодіями можуть бути водневі, електростатичні, індукційні, диполь–дипольні і дисперсійні взаємодії між молекулами адсорбату. Дослідження сорбції L-карбобензоксифенілаланіну виконувалися при мікромолярних концентраціях амінокислоти (див. рис. 3, б) через малу розчинність амінокислоти у водних розчинах. Відмітимо, що при досліджених рівноважних концентраціях адсорбату спостері-

галася лише мономолекулярна адсорбція з достатньо довгою горизонтальною ділянкою. Після повного заповнення поверхні ВНР шаром адсорбату відбувається різке зростання величини адсорбції. Подальше збільшення C призводить до появи на ізотермі додаткових горизонтальних ділянок, які, очевидно, відповідають утворенню адсорбційних бішарів і т. ін. (див. рис. 3, *a*). При більших рівноважних концентраціях C відбувається симбатне зростання величини адсорбції a разом із збільшенням C .

В області високих концентрацій розчинів адсорбтивів ($C > 15 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) величина адсорбції спадала в низці α -аланін- β -аланін-гліцин, причому найбільш слабка залежність $a(C)$ спостерігалася для гліцину, що свідчить про важливий вплив не лише наявності, але і положення метильної групи в структурі амінокислоти. Відмінності в характері полімолекулярної адсорбції, які спостерігаються для досліджених амінокислот, можливо відображають відмінності структури молекул-асоціатів у водних розчинах.

У таблиці 3 наведено розраховані значення площі посадкової площадки s , константи рівноваги k_f і вільної енергії G , які характеризують мономолекулярну адсорбцію досліджених амінокислот. Посадкові площі розраховуються відповідно до формули $s = 1/aN_A$, де a — адсорбція в моль/м² для моношару амінокислоти. Константа рівноваги, k_f , була поражована за формулою $k_f = aS / C_{\text{рівн.}}^2$ на початковій ділянці ізотерми, де a — адсорбція, моль/м²; S — питома площа поверхні, що припадає на досліджуваний зразок (25,4 м²/г), $C_{\text{рівн.}}$ — концентрація досліджуваної речовини після сорбції. Вільна енергія $G = -RT \ln k_f$.

Також необхідно зауважити, що одержані значення посадкової площі для досліджених амінокислот при рН = 6,00 перевищують теоретично розраховані за густинами кристалічних амінокислот у сферичному наближенні. Це означає, що пакування молекул досліджених амінокислот на поверхні ВНР є відносно пухким. З урахуванням, що молекула гліцину має найменшу площу, можна вважати, що її пакування на поверхні ВНР при рН = 6,00 є найбільш пухким. Принагідно зауважимо, що величина посадкової площі для гліцину і β -аланіну на ВНР відповідає розташуванню типу «ча-

ТАБЛИЦЯ 3. Основні показники адсорбції амінокислот ВНР.

Амінокислота	s , нм ²	$k_f \cdot 10^{-3}$	$-G$, кДж/моль
Гліцин	0,263±0,002	6,00±0,02	21,18±0,01
α -аланін	0,374±0,05	1,65±0,24	18,04±0,26
β -аланін	0,255±0,01	0,94±0,27	16,67±0,07
Триптофан	62,9±0,12	987,38±81,49	33,61±0,21
L-карбобензоксифенілаланін	32,1±0,1	58,08±3,38	26,71±0,06

стоколу», тоді як для α -аланіну характерне більш щільне пакування, оскільки молекулі розташовуються на поверхні ВНР кістяком.

4. ВИСНОВКИ

Адсорбція амінокислот з водно-буферних розчинів поверхнею ВНР має значення вільної енергії, характерні для фізичної сорбції. Досягнення адсорбційної рівноваги відбувається протягом часу, що не перевищує 30–45 хв., з подальшим спаданням величини адсорбції, що може свідчити про незначну десорбцію амінокислоти з поверхні ВНР. Оптимальним часом для виконання адсорбції амінокислот ВНР є: 40–60 хв. для гліцину і L-карбобензоксифенілаланіну; 30–40 хв. для α -аланіну; 10–20 хв. для β -аланіну і триптофану. Полімолекулярна адсорбція для гліцину починається вже при концентраціях $C > 3,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, а для α - і β -аланіну при $C > 10,5 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ та $C > 9,1 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ відповідно. Одержані експериментальні значення посадкової площадки для досліджених амінокислот при рН = 6,00 перевищують теоретично розраховані за густинами кристалічних амінокислот у сферичному наближенні, тобто пакування молекул досліджених амінокислот на поверхні ВНР є відносно пухким. З урахуванням, що молекула гліцину має найменшу площу, можна вважати, що її пакування на поверхні ВНР при рН = 6,00 є найбільш пухким. Відмінності в характері полімолекулярної адсорбції, які спостерігаються для досліджених амінокислот, можливо відображають відмінності структури молекуляр-асоціатів у водних розчинах.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. М. В. Манило, І. А. Ар'єв, Г. С. Литвинов, *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*, **9**, № 3: 719 (2011).
2. N. W. Shi Kam and H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**: 6021 (2005).
3. K. Keren, R. S. Berman, E. Buchstab et al., *Science*, **302**: 1380 (2003).
4. A. Bianco, K. Kostarelos, and M. Prato, *Current Opinion in Chemical Biology*, **9**: 674 (2005).
5. М. В. Манило, Т. А. Алексеева, И. А. Арьев, Н. И. Лебовка, *Коллоид. журнал*, **73**, № 2: 235 (2011).
6. В. С. Рак, Ю. И. Тарасевич, Л. В. Закревская, *ТЭХ*, **17**, № 5: 611 (1981).
7. A. De Leon, A. F. Jalbout, and V. Basiuk, *Computational Materials Science*, **44**: 310 (2008).
8. А. Альберт, Е. Сергент, *Константы ионизации кислот и оснований* (Москва: Химия: 1964).
9. Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре, *Курс химической кинетики* (Москва: Высшая школа: 1984).