

АДСОРБЦИЯ ДИПЕПТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

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

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164*

Изучена адсорбция двух дипептидов – аргинил- и лизилфенилаланина на поверхности высокодисперсного кремнезема из водных растворов в зависимости от ионной силы и рН. С использованием основной модели Штерна для двойного электрического слоя и программы GRFIT рассчитаны константы равновесия реакций образования поверхностных комплексов.

Введение

Известно, что высокодисперсный аморфный кремнезем эффективно, быстро и в большом количестве связывает белки [1], структурными единицами которых являются аминокислоты. Нами было показано [2], что из всех наиболее распространенных аминокислот на поверхности высокодисперсного кремнезема из водных растворов адсорбируются только аминокислоты, имеющие в боковой цепи дополнительные основные группы, которые при физиологических значениях рН остаются положительно заряженными. Было предположено, что при адсорбции белков на поверхности электростатическое взаимодействие, благоприятствующее сближению биомолекул и диссоциированных силанольных групп, возможно только за счет дополнительных основных групп аминокислот. Интересно отметить, что нейтральные аминокислоты и пептиды на их основе практически не адсорбируются на поверхности ВДК. Нам так и не удалось определить, какое количество аминокислотных остатков (были исследованы пептиды на основе фенилаланина, содержание аминокислоты изменялось от одного до пяти) должен содержать пептид, для того чтобы его адсорбция на ВДК из водных растворов стала заметной.

В настоящей работе была изучена адсорбция двух дипептидов – аргинилфенилаланина и лизилфенилаланина, в состав которых входят основные аминокислоты, на поверхности высокодисперсного кремнезема из водных растворов, определены состав и устойчивость образующихся поверхностных комплексов.

Экспериментальная часть

В работе использовали высокодисперсный аморфный кремнезем А-300 (Aerosil, Degussa, Германия), аргинилфенилаланин ацетат и лизилфенилаланин дигидробромид (Sigma, США), стандарт-титры NaOH и HCl (Titrisol, Merck, Германия), хлорид натрия (х.ч., Merck, Германия), нингидрин (Fluka, Германия).

Адсорбцию дипептидов изучали при комнатной температуре, $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Смешивали равные объемы исходной суспензии кремнезема (20 г/л) и 2 ммоль/л растворов дипептидов, так что в полученных суспензиях концентрация кремнезема составляла 10 г/л, дипептидов – 1 ммоль/л. Ионная сила суспензий была 0,001, 0,01 или 0,1 М, соответственно. Затем готовили образцы объемом 10 мл, доводили рН до необходимых значений в интервале 3 – 8 добавлением растворов щелочи или кислоты и перемешивали в течение 1 ч, предварительно убедившись, что этого времени достаточно для установления адсорбционного равновесия. После этого проверяли значения рН (Иономер ЭВ-74) и

центрифугированием (8000 об/мин, 20 мин) отделяли кремнезем. Равновесные концентрации дипептида определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Спекорд М-40, Германия) по поглощению в УФ-области спектра, обусловленному наличием в молекуле дипептида ароматического кольца фенилаланина ($\lambda_{\max} = 258$ нм, $\epsilon = 195$), или после проведения нингидринной реакции [3]. Определение концентрации дипептидов по нингидринной реакции было выполнено потому, что интенсивность полосы поглощения дипептидов невысока. Предварительно была изучена зависимость поглощения в УФ-области от концентрации и рН, а также получены калибровочные прямые для определения дипептидов по реакции с нингидрином. Величины адсорбции дипептидов, рассчитанные по разнице исходной и равновесной концентраций, были практически одинаковы для обоих методов.

Константы диссоциации дипептидов были определены нами методом рН-потенциометрического титрования их 0,5 ммоль/л растворов 0,1 М раствором NaOH. Полученные значения рН в зависимости от концентрации добавленной щелочи были использованы для расчета констант диссоциации путем решения системы соответствующих балансовых уравнений [4]. Константы диссоциации силанольных групп кремнезема и комплексообразования с ионами натрия были определены методом потенциометрического титрования ранее [2].

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведены результаты изучения адсорбции дипептидов на поверхности кремнезема из водных растворов в зависимости от ионной силы и рН. Адсорбция обоих дипептидов наблюдается уже в кислой области и существенно увеличивается при $\text{pH} > 5 \dots 6$. При повышении ионной силы раствора величины адсорбции понижаются.

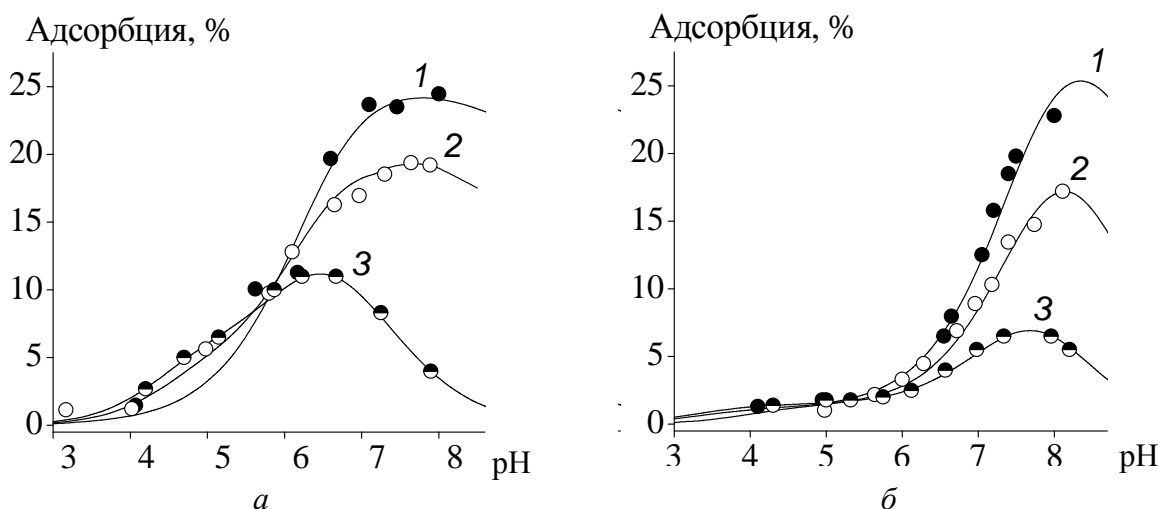


Рис. 1. Адсорбция аргинилфенилаланина (а) и лизилфенилаланина (б) на поверхности высокодисперсного кремнезема из водных растворов хлорида натрия: 0,001 (1), 0,01 (2) и 0,1 М (3). Символы – экспериментальные значения адсорбции, сплошные линии – теоретически рассчитанные кривые.

Для того чтобы рассмотреть реакции между силанольными группами кремнезема и дипептидами, возможные с точки зрения теории комплексообразования на поверхности [5], необходимо выяснить, какие формы дипептидов присутствуют в растворе в зависимости от рН. Общую формулу изучаемых дипептидов можно изобразить следующим образом: $\text{NH}_2 - \text{CH}(\text{R}_1) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{COOH}) - \text{C}_6\text{H}_5$, где $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_3\text{NH}=\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ для аргинилфенилаланина (содержит гуанидиновую группировку) и $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ для лизилфенилаланина. В кислом растворе протонированы

обе аминокруппы дипептида, а карбоксильная группа недиссоциирована, т.е. молекула дипептида содержит 3 потенциально отщепляющихся протона (H_3DP^{2+}). При повышении рН первым отщепляется протон от карбоксильной группы, при этом образуется частица, которая несет один положительный заряд, так как один из двух положительных зарядов компенсируется отрицательным зарядом карбоксилат-аниона (H_2DP^+). При дальнейшем увеличении рН наблюдается диссоциация протонированной α -аминогруппы (HDP^\pm) и, наконец, последним диссоциирует протон аминокруппы в боковом заместителе пептида. Мы не обнаружили в литературе данных по константам кислотно-основных реакций изучаемых пептидов, поэтому нами было проведено потенциометрическое определение констант равновесия соответствующих реакций диссоциации: отщепления протона от карбоксильной группы и от α -аминогруппы. Диссоциация третьего протона от дополнительной основной группы остатка аргинина или лизина не должна существенно изменяться при переходе от аминокислоты к дипептиду, так как она находится далеко от амидной группировки пептида и не входит с ней в сопряжение. Для количественной характеристики третьей стадии диссоциации мы использовали константы диссоциации соответствующих аминокислот.

Таблица 1. Константы диссоциации дипептидов

Дипептид	Ионная сила	pK(COOH)	pK(α -NH $_3^+$)	pK(R $_1$) [6]
Аргинилфенилаланин	0,001	4,72	6,44	12,48
	0,01	4,63	6,44	12,57
	0,1	4,47	6,41	12,66
Лизилфенилаланин	0,001	3,43	7,90	10,61
	0,01	3,34	7,90	10,72
	0,1	3,31	7,87	10,79

Сравнение полученных констант диссоциации показывает, что, как это и наблюдается обычно при образовании пептидов из аминокислот [6], величина pK карбоксильной группы повышается на 1 – 2 порядка, а pK диссоциации протонированной аминокруппы понижается. Для аргинилфенилаланина полученные величины несколько больше обычного отличаются от соответствующих величин самого аргинина, что может быть связано с тем, что исходный пептид существует в виде ацетатной соли. На рис. 2 представлены диаграммы распределения различных кислотно-основных форм пептидов, построенные с учетом рассчитанных нами констант диссоциации (табл. 1).

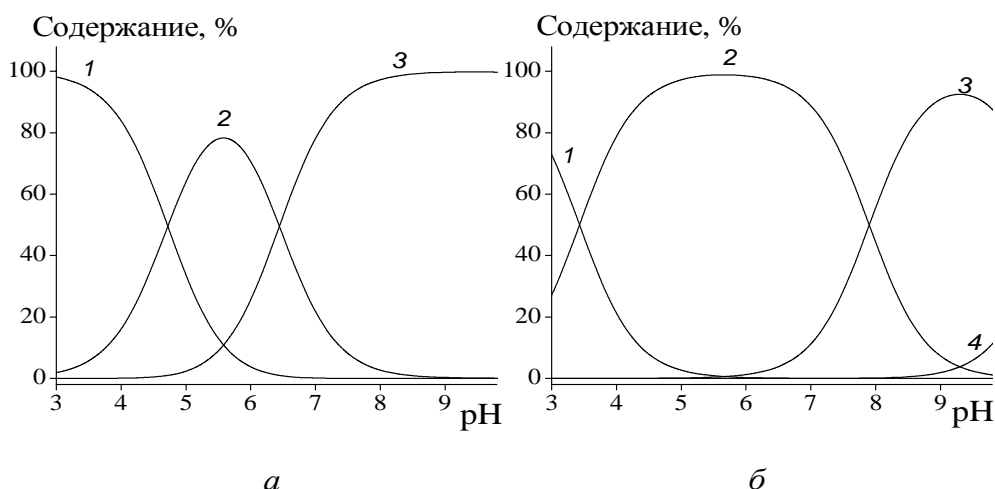


Рис. 2. Диаграммы распределения различных форм аргинилфенилаланина (а) и лизилфенилаланина (б) в водном растворе в зависимости от рН: H_3DP^{2+} (1), H_2DP^+ (2), HDP^\pm (3) и DP^- (4).

Определенные нами величины констант диссоциации были использованы для моделирования взаимодействия пептидов с поверхностью кремнезема и его количественной характеристики. При изучении адсорбции аргинина и лизина мы предположили, что на поверхности кремнезема протекают реакции образования комплексов между катионными формами аминокислот и диссоциированными силанольными группами [2]. В случае адсорбции пептидов оказалось, что одной этой реакции недостаточно для удовлетворительного моделирования адсорбционных кривых с использованием модели комплексообразования Штерна [7] и программы GRFIT [8]. Наилучшее соответствие между экспериментальными данными и рассчитанными адсорбционными кривыми было получено при подборе констант равновесия следующих реакций на поверхности кремнезема:



а для аргинилфенилаланина необходимо было учитывать еще одну реакцию:



Помимо этих реакций были учтены также реакции диссоциации силанольных групп и их взаимодействия с ионами натрия с образованием внешнесферных комплексов [2]. Понижение величин адсорбции при увеличении ионной силы раствора объясняется конкуренцией между ионами натрия и протонированными формами пептидов. Поверхностные комплексы, образованные по реакции (1), и формируются, по-видимому, за счет водородных связей, в то время как движущей силой образования комплексов (2) и (3) являются электростатические взаимодействия. Константы равновесия реакций комплексообразования на поверхности приведены в табл.2.

Таблица 2. Константы равновесия реакций комплексообразования на поверхности кремнезема

Реакция	lgK±0,1 (для всех ионных сил)	
	аргинилфенилаланин	лизилфенилаланин
$\equiv\text{SiOH} + \text{H}_2\text{DP}^+ \leftrightarrow \equiv\text{SiOH}\cdots\text{H}_2\text{DP}^+$	1,2	0,5
$\equiv\text{SiO}^- + \text{H}_2\text{DP}^+ \leftrightarrow \equiv\text{SiO}^-\text{H}_2\text{DP}^+$	2,7	1,8
$\equiv\text{SiO}^- + \text{HDP}^\pm \leftrightarrow \equiv\text{SiO}^-\text{HDP}^\pm$	2,4	—

На рис. 3 представлены диаграммы распределения комплексов дипептидов на поверхности кремнезема, рассчитанные по программе GRFIT с использованием полученных констант равновесия реакций.

Кривые адсорбции дипептидов характеризуются наличием максимумов, положение которых зависит от природы пептида и ионной силы раствора. Положение этих максимумов по шкале рН примерно соответствует рН, при котором происходит диссоциация протона от α-аминогруппы. Мы полагаем, что между положительно заряженными группами в боковых цепях аргинина и лизина и отрицательно заряженными диссоциированными силанольными группами возможны электростатические взаимодействия. Причем для аргинилфенилаланина возможно образование поверхностного комплекса как с дважды протонированным катионом ($\equiv\text{SiOH}\cdots\text{H}_2\text{DP}^+$), так и с частицей, в которой протонированным остается только атом азота гуанидиновой группировки ($\equiv\text{SiO}^-\text{HDP}^\pm$). Устойчивость поверхностных комплексов в случае дипептидов несколько выше, чем исходных аргинина и лизина (lgK = 2,1 и 1,6, соответственно).

Возможно, что молекула дипептида имеет больше центров для образования водородных связей с поверхностью кремнезема.

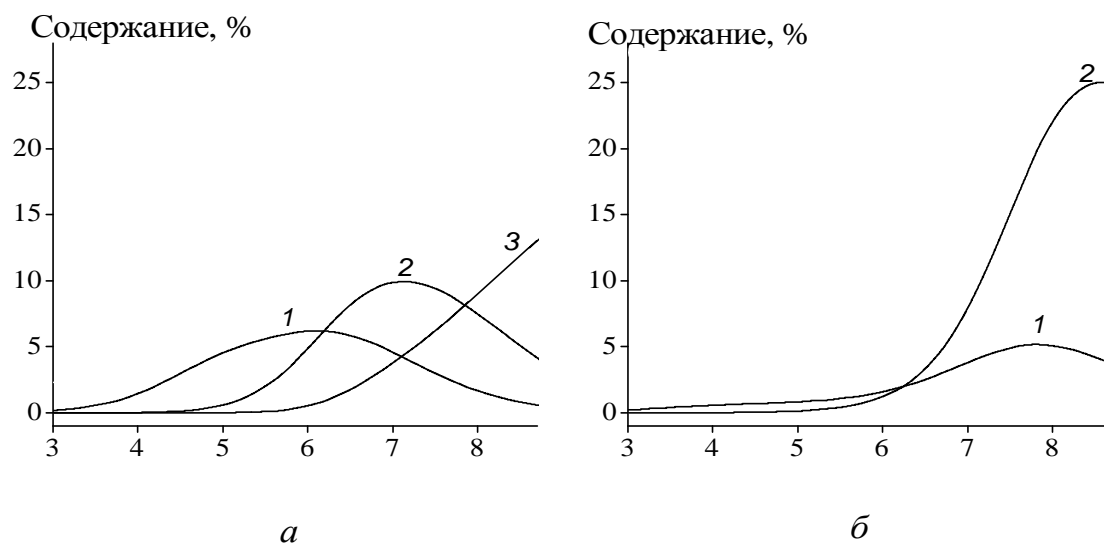


Рис. 3. Диаграммы распределения комплексов аргинилфенилаланина (а) и лизилфенилаланина (б) на поверхности кремнезема: $\text{SiOH}\cdots\text{H}_2\text{DP}^+$ (1), $\text{SiO}^- - \text{H}_2\text{DP}^+$ (2) и $\text{SiO}^- - \text{HDP}^\pm$ (3) (последний комплекс только для аргинилфенилаланина).

Выводы

В результате проведенного исследования установлено, что дипептиды, содержащие в своем составе основные аминокислоты в качестве N-концевых остатков, адсорбируются на поверхности аморфного кремнезема из водных растворов в отличие от пептидов, образованных нейтральными аминокислотами. Устойчивость образующихся поверхностных комплексов выше, чем комплексов, образованных соответствующими аминокислотами. Движущей силой образования комплексов силанольных групп кремнезема с катионами дипептидов являются электростатические взаимодействия, хотя, возможно, протонированные формы дипептидов могут образовывать водородные связи с силанольными группами кремнезема или молекулами воды приповерхностного слоя.

Литература

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А.Чуйко. – Киев: Наук. думка, 2003. – 415 с.
2. Власова Н.Н., Головкова Л.П. Адсорбция аминокислот на поверхности высокодисперсного кремнезем // Коллоид. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 733 – 738.
3. Идентификация органических соединений / Р. Шрайнер, Р. Фьюзон, Д. Кертин, Т. Моррилл. – М.: Мир, 1983. – 704 с.
4. Альберт А., Сергент Е. Константы ионизации кислот и оснований / Пер. с англ. – М.-Л.: Химия, 1964. – 180 с.
5. Davis J.A., Kent D.B. Surface complexation modeling in aqueous geochemistry // Rev. Mineral. – 1990. – V. 23. – P. 177 – 260.
6. Яцимирский К.Б., Крисс Е.Е., Гвяздовская В.Л. Константы устойчивости комплексов биометаллов с лигандами. – Киев: Наук. думка, 1979. – 229 с.
7. Westall J.C., Hohl H. A comparison of electrostatic models for the oxide/solution interface // Advan. Colloid Interface Sci. – 1980. – V. 12. – P. 265 – 294.

8. Ludwig Chr. GRFIT, a Program for Solving Speciation Problems, Evaluation of Equilibrium Constants, Concentrations, and Other Physical Parameters. Internal Report of University of Bern, 1992.

ADSORPTION OF DIPEPTIDES ONTO FUMED SILICA SURFACE FROM AQUEOUS SOLUTIONS

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

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164*

The adsorption of arginylphenylalanine and lysylphenylalanine onto fumed silica surface has been studied as a function of pH and ionic strength. Equilibrium reaction parameters were determined using the basic Stern model for double electric layer and GRFIT program package.