

Электрокаталитическое моделирование самоорганизации серосодержащих аминокислот

И.Е. Миронюк, О.С. Кругляк, Г.С. Шаповал

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,
Украина, 02094 Киев, ул. Мурманская, 1; факс: (044) 573-25-52

Методом спектроскопии импеданса на медном катоде установлена зависимость энергий адсорбции и латеральных взаимодействий тиолсодержащих аминокислот (АК) цистеина и ацетилцистеина от потенциала электрода, что свидетельствует о возможности электрокаталитического моделирования и регулирования предорганизации молекул АК и соответствующих супрамолекулярных взаимодействий при формировании ими самоорганизованных структур.

Самоорганизация аминокислот (АК) в биосистемах играет существенную роль в изменениях конформации белковых макромолекул [1–3], в процессах транспорта и детоксикации ядов [4, 5] в организме.

В этой связи большое значение приобретает информация о влиянии самоорганизации на супрамолекулярные взаимодействия АК, которые, с нашей точки зрения, могут быть смоделированы *in vitro* с помощью адсорбции в физиологической среде на поверхности отрицательно заряженного биометалла. Такое электрокаталитическое моделирование особенно перспективно в связи с тем, что АК как самостоятельно, так и в составе ферментов, участвуют в процессах переноса электронов на поверхности клеточных мембран, заряд которых регулирует активность ряда ферментов [6].

Наиболее часто в литературе описывают исследование этого направления, посвященные адсорбции на поверхности золота АК, содержащих сульфгидрильную группу [7–10], образованию с их участием на поверхности металлов монослоев и самоорганизованных структур разного назначения, в том числе селективному распознаванию ионов металлов, созданию сенсоров на различные органические биомолекулы [7], изучению единичных актов взаимодействия АК с нуклеиновыми кислотами [8], разработке новых энантиоактивных катализаторов [1–3].

С нашей точки зрения, для исследования формирования самоорганизованных структур и супрамолекулярных взаимодействий функциональных групп АК, не являющихся якорными при адсорбции на поверхности данного металла, весьма информативными являются электрохимические методы, которые дают возможность изменять величину отрицательного потенциала электрода. Мы считаем, что адсорбция АК на поверхности электрода может служить адекватной моделью предорганизации при образовании самоорганизованных структур, на базе которой можно получить достаточно достоверную информацию о супрамолекулярных взаимодействиях молекул АК, адсорбированных на поверхности используемого металла.

Исследования электрохимического поведения тиолсодержащих АК на медном электроде проводили в основном в области анодных потенциалов, где специфическое взаимодействие групп $-SH$ с Cu ведет к ускорению анодного растворения меди [11]. Не исключено, что при катодных потенциалах на поверхности медного электрода тиольные группы должны играть значительную роль в процессе адсорбции, что с учетом наличия способных к латеральным взаимодействиям карбоксильных и аминогрупп может привести к образованию самоорганизованных структур. Для проверки этого предположения мы сравнили параметры адсорбции тиолсодержащих цистеина и ацетилцистеина с их лишенным $-SH$ -группы аналогом – α -аланином.

С учетом изложенного, целью настоящей работы явилось исследование процесса самоорганизации и супрамолекулярных взаимодействий цистеина и ацетилцистеина при электрокаталитическом воздействии на них поверхности медного катода.

В качестве метода исследования избрана спектроскопия электрохимического импеданса, что, с одной стороны, позволило выделить ответственную за адсорбцию якорную группу, определить энергию взаимодействия АК с электродом, с другой – проследить за межмолекулярными взаимодействиями остальных функциональных групп АК.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования – L-цистеин, N-ацетилцистеин, α -аланин производства Fluka – использовали без дополнительной очистки. Фоновый электролит $-0,1 M NaCl$ – готовили из дважды перекристаллизованного хлорида натрия (хч) в бидистиллированной воде. Растворы исследуемых веществ в $0,1 M$ водном $NaCl$ готовили непосредственно перед измерениями.

Адсорбцию соединений на медном катоде изучали с помощью универсальной системы ACM Instruments Auto по трехэлектродной схеме [12]. Рабочим электродом служил медный торцевой электрод ($d = 3,0$ мм), вспомогательным – платиновая пластина ($25,0 \times 15,0$ мм), потенциал задавали относительно насыщенного

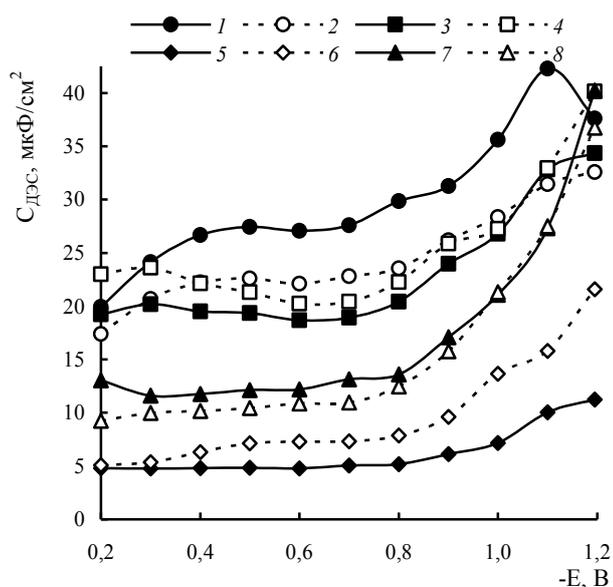


Рис. 1. Дифференциальная емкость двойного электрического слоя медного электрода в присутствии $0,57 \cdot 10^{-3}$ моль/л цистеина (1, 2), ацетилцистеина (3, 4) и α -аланина (5, 6) и в фоновом растворе 0,1 М NaCl (7, 8) без доступа кислорода (1, 3, 5, 7) и в присутствии кислорода (2, 4, 6, 8)

хлорсеребряного электрода сравнения. Измерения проводили в присутствии и в отсутствие кислорода, для удаления которого раствор продували аргоном в течение 60 мин. Степень заполнения электрода θ рассчитывали по классической модели параллельных конденсаторов.

Результаты исследования и их обсуждение

Чтобы судить о природе якорной группы при адсорбции тиолсодержащих АК, были проанализированы кривые зависимости дифференциальной емкости ($C_{дэс}$) двойного электрического слоя (ДЭС) от потенциала (E) медного катода.

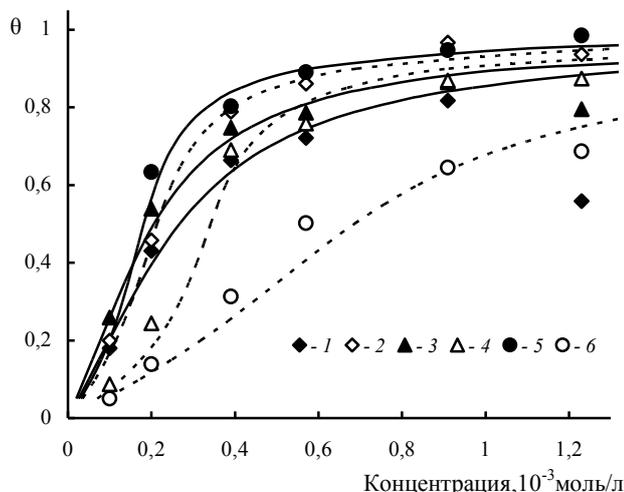


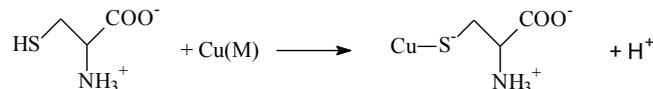
Рис. 2. Изотермы адсорбции цистеина на медном электроде при потенциалах -0,2 В (1, 2), -0,6 В (3, 4) и -1,1 В (5, 6) без доступа кислорода (1, 3, 5) и в его присутствии (2, 4, 6). Точки – экспериментальные значения, линии – аппроксимация по уравнению Фрумкина

Так, при добавлении цистеина в фоновый раствор в интервале $E = 0 - -1,1$ В емкость ДЭС повышалась симбатно концентрации этой АК. Аналогичный эффект наблюдали для ацетилцистеина, тогда как α -аланин, не содержащий сульфгидрильной группы, закономерно снижает емкость ДЭС (рис. 1).

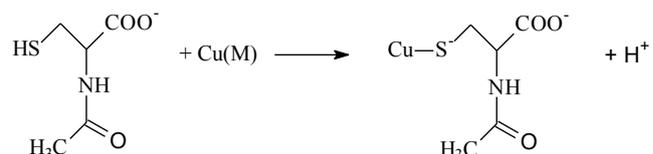
Это дает основание полагать, что при адсорбции как цистеина, так и ацетилцистеина, якорной группой является сульфгидрильная, во взаимодействии которой с поверхностью медного катода определенную и, очевидно, существенную роль играет специфическая адсорбция, что подтвердили специально проведенные Шаповал Г.С. и Кругляк О.С. эксперименты [13].

Эффект повышения емкости ДЭС, очевидно, обусловлен депротонированием сульфгидрильной группы ($R-SH \rightarrow R-S^- + H^+$) и специфической адсорбцией как цистеина, так и ацетилцистеина в виде анионов, что приводит к увеличению плотности отрицательного заряда поверхности электрода. Аналогичное повышение емкости ДЭС от 15 до 30 мкФ/см² наблюдали G. Nager, A.G. Brolo [9] при депротонировании сульфгидрильной группы и адсорбции цистеина на поверхности золотого электрода.

Специфическую адсорбцию цистеина на меди в кислой среде при использованных нами концентрациях этой АК можно представить следующей схемой:



Аналогично осуществляется специфическая адсорбция на медном катоде ацетилцистеина при pH меньше 5:



Для этих АК рассчитаны изотермы адсорбции, которые характеризуются насыщением адсорбционного слоя при концентрациях $0,6-1,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 2, 3). Судя по изотермам, степени заполнения для цистеина и ацетилцистеина значительно превышают θ для α -аланина (рис. 4) достигая 0,8 и выше. В то же время θ по-разному зависит от потенциала электрода. Так, для цистеина максимальная степень заполнения при -0,2 В составляет 0,63 при $C = 0,9 \cdot 10^{-3}$ моль/л, при более отрицательных потенциалах -0,95 (рис. 2).

Возрастание адсорбции цистеина с ростом потенциала вероятно связано с наличием у него положительно заряженной аминогруппы. При концентрациях цистеина $C > 1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л наблюдается уменьшение θ , что, очевидно, связано с переориентацией молекул на поверхности катода и возможной их десорбцией.

Для ацетилцистеина максимальные степени заполнения наблюдаются вблизи $E = -0,2$ В и закономерно

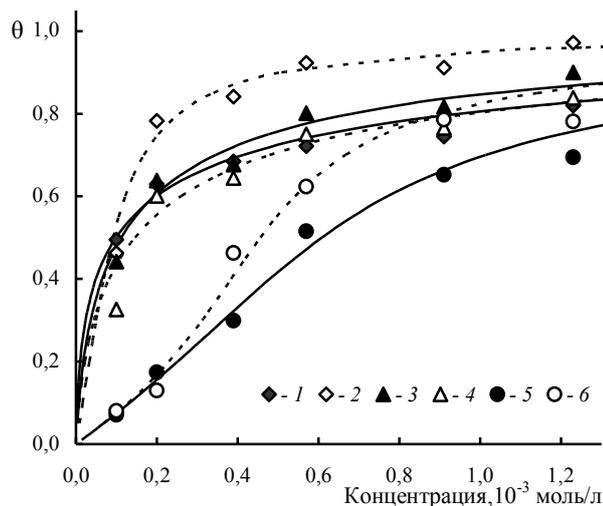


Рис. 3. Изотерма адсорбции ацетилцистеина на медном электроде при потенциалах $-0,2$ В (1, 2), $-0,6$ В (3, 4) и $-1,1$ В (5, 6) без доступа кислорода (1, 3, 5) и в присутствии кислорода (2, 4, 6). Точки – экспериментальные значения, линии – аппроксимация по уравнению Фрумкина

снижаются до 0,6 при E ниже $-0,99$ В. Насыщение поверхности ацетилцистеином достигается при его концентрации $0,57 \cdot 10^{-3}$ моль/л, причем с ее увеличением величина $\theta = 0,8$ остается практически постоянной при всех исследованных концентрациях (рис. 3).

Эти эффекты легко проследить на кривых зависимости емкости ДЭС медного катода от концентрации цистеина и ацетилцистеина при различных потенциалах (рис. 5).

В случае адсорбции α -аланина наблюдается более медленное по сравнению с цистеином и ацетилцистеином возрастание степени заполнения с концентрацией, а насыщение достигается при вдвое более высокой $C = 1,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, что является дополнительным свиде-

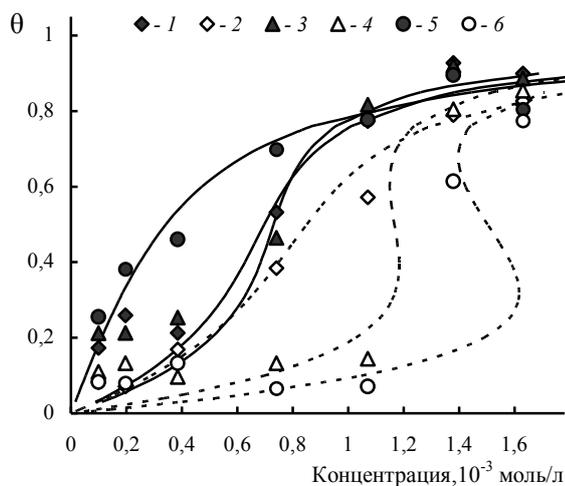


Рис. 4. Изотерма адсорбции α -аланина на медном электроде при потенциалах $-0,2$ В (1, 2), $-0,6$ В (3, 4) и $-1,1$ В (5, 6) без доступа кислорода (1, 3, 5) и в присутствии кислорода (2, 4, 6). Точки – экспериментальные значения, линии – аппроксимация по уравнению Фрумкина

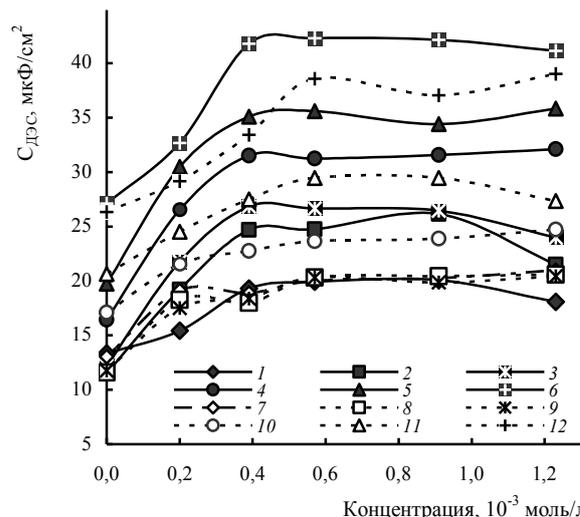


Рис. 5. Дифференциальная емкость двойного электрического слоя медного электрода в зависимости от концентрации цистеина (1–6) и ацетилцистеина (7–12) при потенциалах медного катода: $-0,2$ В – (1, 7); $-0,3$ В – (2, 8); $-0,4$ В – (3, 9); $-0,9$ В – (4, 10); $-1,0$ В – (5, 11); $-1,1$ В – (6, 12)

тельством в пользу существенного вклада в адсорбцию тиолсодержащих АК специфической составляющей (рис. 4).

Изотермы адсорбции исследованных АК в координатах $\theta - \ln C$ линейны, что позволяет аппроксимировать их уравнением Фрумкина:

$$B \cdot C = \frac{\theta}{1-\theta} \exp(-2a\theta),$$

где $B = \exp(-G_{ad}/RT)$ – константа адсорбционного равновесия, связанная с энергией адсорбции; a – аттракционная постоянная, характеризующая латеральные взаимодействия адсорбированных молекул (энергию последних можно рассчитать из соотношения $G_L = -2RTa$).

Рассчитанные энергии адсорбции цистеина и ацетилцистеина, как видно из таблицы, согласуются с установленными в работе [10] энергиями адсорбции этих АК на золотом электроде.

Наибольшие энергии адсорбции характерны для ацетилцистеина вблизи $E = -0,2$ В, что подтверждает сочетание при этом потенциале физической и специфической адсорбции, а также превышение энергии адсорбции цистеина по сравнению с этой величиной для α -аланина.

Положительный знак аттракционных постоянных для цистеина и α -аланина свидетельствует о преобладании сил притяжения между адсорбированными на поверхности молекулами. Рассчитанные энергии латеральных взаимодействий G_L близки для цистеина и α -аланина (см. таблицу). По порядку величины (6–8 кДж/моль) такие энергии характерны для супрамолекулярных (водородных, электростатических и вандерваальсовых) взаимодействий. Для исследованных АК это латеральные взаимодействия карбоксильных и

Аттракционные постоянные и энергии адсорбции аминокислот, рассчитанные по уравнению Фрумкина

Аминокислота	-E, В	Без доступа кислорода			В присутствии O ₂		
		<i>a</i>	G _L , кДж/моль	G _{ад} , кДж/моль	<i>a</i>	G _L , кДж/моль	G _{ад} , кДж/моль
Цистеин	0,2	1,48	-7,2	-16,5	1,30	-6,3	-17,3
	0,6	0,68	-3,3	-19,0	1,10	-5,4	-17,1
	1,1	1,30	-6,3	-17,8	1,05	-5,1	-15,6
Ацетилцистеин	0,2	-1,45	7,1	-26,0	0,95	-4,6	-20,0
	0,6	-0,85	4,1	-17,2	-0,71	3,5	-23,4
	1,1	0,84	-4,1	-16,0	1,17	-5,7	-15,9
α-Аланин	0,2	1,62	-7,9	-13,3	2,20	-10,7	-10,8
	0,6	1,78	-8,7	-13,2	2,20	-10,7	-10,8
	1,1	1,65	-8,0	-13,4	2,40	-11,7	-10,0

аминогрупп, которые участвуют в самоорганизации АК на поверхности.

Аналогичная самоорганизация установлена [14] для цистеина методом усиленного поверхностью рамановского рассеяния (SERS).

Рассчитанные по экспериментальным данным энергии адсорбции цистеина значительно ниже энергий, характерных для специфической адсорбции, что связано с отрицательным зарядом электрода и, соответственно, с электростатическим отталкиванием, которое уменьшает наблюдаемый энергетический выигрыш в результате адсорбции. Это также подтверждают более низкие значения $G_{ад}$ α-аланина, для которого специфическая адсорбция на меди не характерна.

На рис. 6, а, б представлена предполагаемая ориентация молекул цистеина на поверхности электрода в области концентраций цистеина, при которых pH раствора составляет 4,50–3,07 и цистеин находится в форме цвиттер-ионов.

При более высоких отрицательных потенциалах положительно заряженная аминогруппа будет ориентироваться к поверхности катода (рис. 6, в). При более высоких концентрациях цистеина pH снижается и становится заметной доля положительно заряженных ионов цистеина в растворе. Для них естественной якорной может стать аминогруппа, что, в свою очередь, способно привести к снижению θ при возрастании кон-

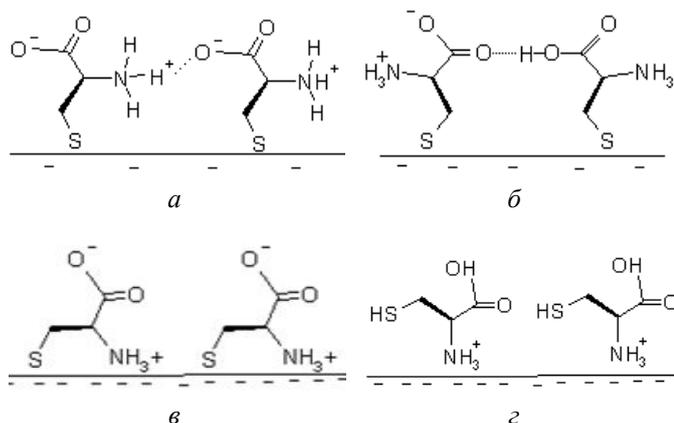


Рис. 6. Схемы возможной ориентации молекул цистеина на заряженной поверхности медного электрода

центрации цистеина выше $1,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 6, г).

В случае ацетилцистеина аттракционные постоянные в области потенциалов $-0,2 \div -0,6$ В отрицательны, что свидетельствует о преобладании отталкивательных взаимодействий. Очевидно, это связано с объемной ацетильной группой. У ацетилцистеина нет, как у цистеина, несущей положительный заряд $-\text{NH}_3^+$ аминогруппы, ответственной за электростатическое притяжение. При добавлении ацетилцистеина pH исследуемого раствора снижается от нейтральных значений до 3,13. При концентрации ацетилцистеина менее $0,91 \cdot 10^{-3}$ моль/л (pH 3,28) большая часть молекул в растворе диссоциирована ($pK_{\text{COOH}} = 3,24$), и вблизи потенциала нулевого заряда ацетилцистеин адсорбируется в виде анионов, чем можно объяснить их взаимное отталкивание при таком потенциале. Это подтверждается концентрационной зависимостью аттракционной постоянной ацетилцистеина при $E = -0,2$ В, которая изменяется от $-0,63$ до $-2,32$ и при $C = 0,91 \cdot 10^{-3}$ моль/л достигает максимального отрицательного значения.

При более высоких катодных потенциалах и малых концентрациях ацетилцистеина $a > 0$, средняя энергия притяжения боковых групп составляет $G_L = -4,1$ кДж/моль – вероятно, за счет водородных связей. Предполагаемая ориентация молекул ацетилцистеина

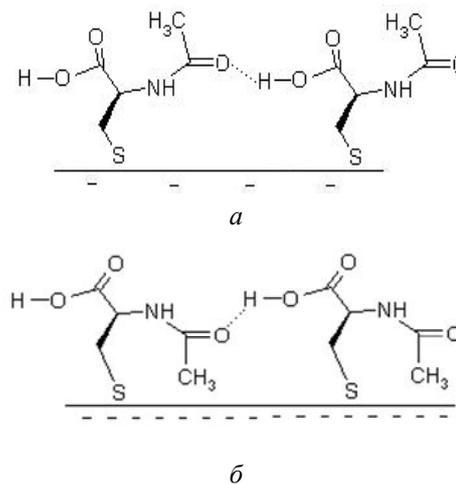


Рис. 7. Схемы возможной ориентации молекул ацетилцистеина на заряженной поверхности медного электрода

на поверхности электрода в этом случае представлена на рис. 7. Следует отметить, что адсорбцию L-цистеина на серебряном электроде исследовали A.G. Brolo и соавт. [14]. Методами рамановской спектроскопии они показали, что на серебряном электроде адсорбция тильной группы также наблюдается при достаточно высоких катодных потенциалах, вплоть до -0,95 В. Однако авторам не удалось с помощью этого метода установить прямую зависимость количества адсорбированных молекул на поверхности электрода от его потенциала.

Далее было исследовано влияние на межмолекулярные взаимодействия АК растворенного кислорода, который играет важную роль в протекающих в биосистемах супрамолекулярных взаимодействиях АК и аминокислотных фрагментов белковых макромолекул.

В результате анализа параметров адсорбции АК на медном катоде в присутствии и в отсутствие кислорода отмечено следующее.

Судя по емкостным зависимостям (см. рис. 1, кривые 7, 8), кислород активно адсорбируется на поверхности медного катода в исследуемой области потенциалов.

Характер изменения емкости АК с концентрацией в присутствии и в отсутствие кислорода аналогичен (рис. 1).

В присутствии кислорода возрастают степень заполнения и энергия адсорбции вблизи $E = -0,2$ В (см. рис. 2, таблицу), что может быть связано с одновременной адсорбцией кислорода. Соотношение размеров молекул цистеина и кислорода позволяет последним располагаться между адсорбированными молекулами цистеина (см. рис. 6, а, б). При более высоких катодных потенциалах наблюдается снижение θ , G_{ad} и G_L , что, вероятно, связано с определенным вкладом адсорбции продуктов восстановления O_2 и частичной десорбцией цистеина, вызванной этим процессом.

Подобные же изменения происходят и для α -аланина, однако значения энергии латеральных взаимодействий, благодаря присутствию кислорода, возрастают. При этом энергия взаимодействия молекул α -аланина с поверхностью электрода снижается (см. таблицу).

Наиболее интересным является изменение в присутствии кислорода знака аттракционной постоянной ацетилцистеина вблизи потенциала нулевого заряда электрода (таблица). При совместной адсорбции ацетилцистеина и кислорода вместо сил отталкивания преобладают силы притяжения. Возможно, кислород становится “мостиком” между двумя молекулами аце-

тилцистеина и способствует формированию предорганизованного адсорбционного слоя.

Установленная зависимость энергий адсорбции и латеральных взаимодействий АК от потенциала электрода в определенной степени свидетельствует о возможности электрокаталитического моделирования и регулирования самоорганизации молекул АК и соответствующих супрамолекулярных взаимодействий при образовании ими самоорганизованных структур.

Кроме того, полученные данные дали основание высказать предположения об ориентации молекул цистеина и ацетилцистеина при их адсорбции на поверхности медного катода и о роли кислорода в этом процессе.

1. Steed J.W., Turner D.R., Wallace K., *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, Wiley, 2007.
2. Ulman A., *Chem.Rev.*, 1996, **96**, 1533–1547.
3. Feng J., Slocik J.M., Sarikaya M. et al., *Smoll*, 2012, **8** (7), 1049–1059.
4. Пшенкина Н.Н., *Фармакология*, 2011, **12**, 1067–1091.
5. Луйк А.И., Лукьянчук В.Д., *Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов*, Москва, Медицина, 1984.
6. Гринштейн С.В., Кост О.А., *Успехи биол. химии*, 2001, **41**, 77–94.
7. Arnold S., Feng Z.Q., Kakiuchi T. et al., *J. Electroanal. Chem.*, 1997, **438** (1–2), 91–97.
8. Chen Q., Richardson N.V., *Nature Mater*, 2003, **2**, 324–328.
9. Hager G., Brolo A.G., *J. Electroanal. Chem.*, 2009, **625** (2), 109–116.
10. Feng J., Pandey R.B., Berry R.J. et al., *Soft Matter*, 2011, (7), 2113–2120.
11. Matos J.B., Pereira L.P., Agostinho S.M.L. et al., *J. Electroanal. Chem.*, 2004, **570**, 91–94.
12. Миронюк И.Е., Шаповал Г.С., Громова В.Ф., Кухарь В.П., *Теорет. и эксперим. химия*, 2001, **37** (2), 105–108.
13. Шаповал Г.С., Кругляк О.С., *Полимерный журнал*, **35** (1), 69–75.
14. Brolo A.G., Germain P., Hager G., *J. Phys. Chem. B.*, 2002, **106** (23), 5982–5987.

Поступила в редакцию 11.09.2013 г.

Електрокаталітичне моделювання самоорганізації сірковмісних амінокислот

І.Є. Миронюк, О.С. Кругляк, Г.С. Шаповал

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
Україна, 02094 Київ, вул. Мурманська, 1; факс: (044) 573-25-52*

Методом спектроскопії імпедансу на мідному катоді встановлено залежність енергій адсорбції та латеральної взаємодії тіоловмісних амінокислот (АК) цистеїну й ацетилцистеїну від потенціалу електрода, що свідчить про можливість електрокаталітичного моделювання й регулювання передорганізації молекул АК і відповідних супрамолекулярних взаємодій при утворенні ними самоорганізованих структур.

Electrocatalytic modelling of self-assembly of sulfur-containing aminoacids

I.Ye. Myroniuk, O.S. Kruglyak, G.S. Shapoval

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine,
1, Murmanskaya Str., Kyiv, 02094, Ukraine, Fax: (044) 573-25-52*

The dependence of both adsorption energies and energies of lateral interactions of sulfur-containing aminoacid (AA) cysteine and acetylcysteine on copper cathode potential is established by electrochemical impedance spectroscopy technique. It indicates the opportunity of electrocatalytic modelling and regulation of pre-assembling of AA molecules to control appropriate supramolecular interactions during the formation of their self-assembled structures.