

УДК 544.72

## АДСОРБЦИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Н.Н. Власова, Л.П. Головкова

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, e-mail: natalie.vlasova@gmail.com*

*Изучена адсорбция глутаминовой кислоты из водных растворов на поверхности нанокристаллического диоксида церия в зависимости от pH, ионной силы и концентрации адсорбата. Рассчитаны константы устойчивости поверхностных комплексов глутаминовой кислоты, которые образуются в результате взаимодействия однозарядного глутамат-аниона с протонированными поверхностными группами диоксида церия. Строение поверхностного комплекса подтверждено методом ИК-спектроскопии.*

### Введение

Взаимодействие аминокислот, пептидов, нуклеотидов, липидов и других биологически активных веществ с поверхностью минералов играет ключевую роль во многих биологических и биогеохимических процессах, таких как адсорбция белков на поверхности имплантатов, биоминерализация, реакции, определяющие происхождение и раннюю эволюцию жизни [1, 2]. Особенно большое значение таких процессов было признано после появления теории о важности закрепления пребиотических молекул на поверхности минералов для их дальнейшей полимеризации с образованием белков из аминокислот и нуклеиновых кислот из нуклеотидов [3, 4].

Большинство работ, посвященных аминокислотам, было сосредоточено на исследовании взаимодействия глутаминовой, аспарагиновой кислот и лизина с поверхностью разнообразных оксидов [5–13]. Эти аминокислоты, кроме обычных амино- и  $\alpha$ -карбоксылной групп, обладают дополнительными заряженными функциональными группами, которые проявляют сродство к противоположно заряженным центрам поверхности минералов. Взаимодействие аминокислот с поверхностью диоксида церия до сегодняшнего дня не было изучено. Нами было начато исследование адсорбции некоторых органических кислот [14, 15] и среди них – фолиевой кислоты, которой отводится особая роль в действии нанокристаллического диоксида церия как потенциального антиоксиданта и инактиватора активных форм кислорода [16]. Молекула фолиевой кислоты состоит из трех «строительных» блоков: замещенного гетероциклического соединения птерина, *n*-аминобензойной кислоты и глутаминовой кислоты, поэтому ее еще называют – птероилглутаминовой кислотой.

Было показано, что фолиевая кислота из водных растворов сорбируется на поверхности диоксида церия с образованием разнообразных по строению комплексов. Если при комплексобразовании связывание анионов фолиевой кислоты происходит по карбоксылным группам глутаминового заместителя, то активная группировка птеринового кольца, которая принимает участие в биохимических реакциях, остается «свободной» и доступной для взаимодействия с фолат-рецепторами. Однако полученные результаты не позволили сделать однозначный выбор среди некоторого количества возможных реакций с участием фолиевой кислоты на поверхности. Для установления механизма адсорбции фолиевой кислоты на поверхности диоксида церия требуются

дополнительные исследования. Например, методом ИК-спектроскопии можно было бы выяснить, какие группировки молекулы адсорбата участвуют в непосредственном связывании с гидроксильными группами поверхности. Для облегчения интерпретации ИК-спектров фолиевой кислоты, которые содержат большое количество полос, было решено исследовать адсорбцию глутаминовой кислоты как основного составляющего элемента фолиевой кислоты, ответственного, по-видимому, за адсорбционные процессы. В настоящей работе приведены результаты исследования адсорбции глутаминовой кислоты из водных растворов на поверхности диоксида церия.

### **Экспериментальная часть**

В работе использовали нанокристаллический порошок диоксида церия (nanopowder, Aldrich) с удельной поверхностью  $60 \pm 5$  м<sup>2</sup>/г (Nova 1200, Quantachrome). Исследования методом рентгенофазового анализа (дифрактометр ДРОН-3М) показали, что в соответствии с базой данных JCPDS Database (International Center for Diffraction Data, PA, 2001) диоксид церия имеет кубическую решетку (структурный тип флуорита, карточка 34-394). Размер кристаллитов, рассчитанный по уравнению Шеррера, составляет 31 нм. Эта величина согласуется с размером частиц, определенным производителем (<25 нм).

Глутаминовая кислота («ч.д.а.», Reanal, Венгрия) была использована без дополнительной очистки. Для подведения pH растворов и суспензий до требуемых величин использовали стандарт-титры HCl и NaOH (Titrisol, Merck, Германия). Все растворы и суспензии были приготовлены на бидистиллированной воде.

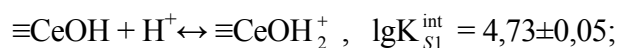
Для изучения зависимости адсорбции глутаминовой кислоты от pH были приготовлены серии суспензий диоксида церия (1г/л) и глутаминовой кислоты с различными значениями pH на фоне 0,01 М NaCl. Выдерживали суспензии в течение 2 ч и после проверки значения pH отделяли твердую фазу центрифугированием (8000 об/мин, 20 мин). Предварительно было установлено, что этого времени достаточно для установления адсорбционного равновесия.

Концентрации кислоты определяли по интенсивности поглощения продукта реакции аминокислоты с нингидрином [17] при 570 нм (спектрофотометр Specord M-40). Величины адсорбции рассчитывали по разности исходной и равновесной концентраций кислоты и выражали в мкмоль/г.

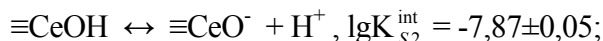
ИК-спектры образцов в виде прессованных пластинок с бромидом калия («ч.д.а.», Merck, Германия) записывали на спектрофотометре Specord M-80.

### **Результаты и их обсуждение**

Появление заряда на поверхности оксидов в результате взаимодействия с протонами водного раствора приводит к образованию двойного электрического слоя между раствором электролита и поверхностью оксида, который влияет на реакции комплексообразования с неорганическими и органическими молекулами, т.е. на адсорбционные взаимодействия между функциональными группами оксида и сорбирующихся молекул. Для описания связывания протонов активными группами поверхности оксидов успешно применяются модели комплексообразования на поверхности [18]. Одним из условий применения этих моделей для количественного описания адсорбционных равновесий является точное представление обо всех протолитических реакциях, имеющих место в растворе и на поверхности оксида. Константы реакций протонирования и диссоциации гидроксильных групп на поверхности диоксида церия, а также константы связывания их с ионами фонового электролита были определены нами ранее методом потенциометрического титрования суспензий диоксида церия в водных суспензиях 0,01 и 0,1 моль/л NaCl [14,15]. Были рассчитаны константы равновесия реакций протонирования:



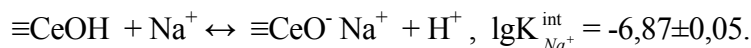
диссоциации:



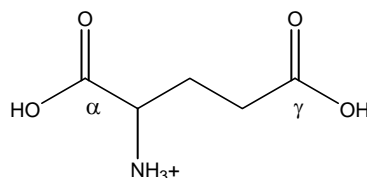
связывания с анионами:



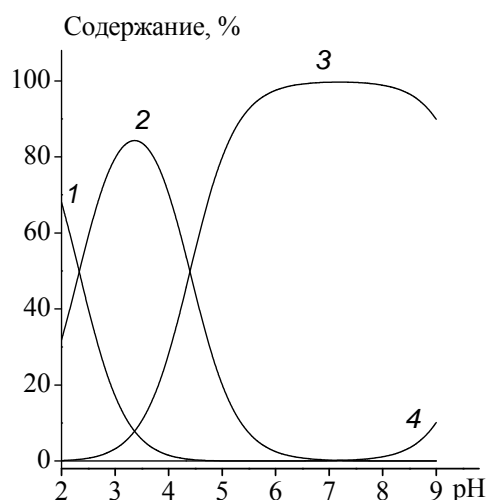
и связывания с катионами:



Глутаминовая кислота является аминокислотой, в молекуле которой, кроме обычных amino- и  $\alpha$ -карбоксильной групп, присутствует карбоксильная группа в  $\gamma$ -положении. В полностью протонированном состоянии ( $\text{H}_3\text{L}^+$ ) молекула несет положительный заряд:

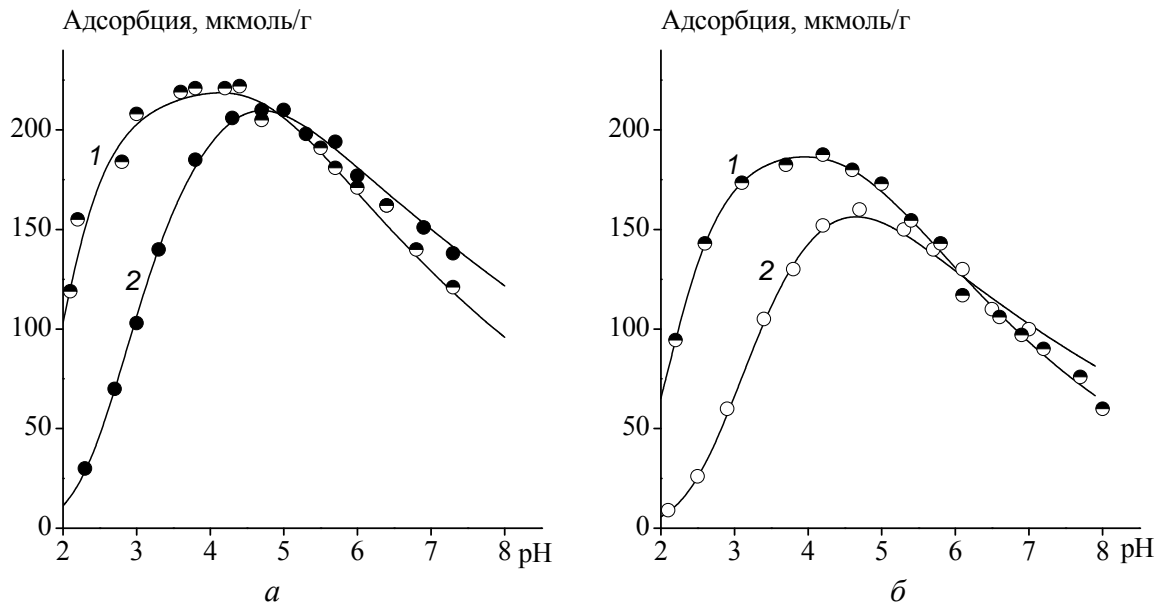


В водных растворах в зависимости от pH присутствуют различные формы глутаминовой кислоты: катионы, цвиттер-ионы, одно- и двухзарядные анионы. Последовательность отщепления протонов отражается в следующем ряду:  $\alpha$ -COOH ( $\text{pK}_1 = 2,33$ ),  $\gamma$ -COOH ( $\text{pK}_2 = 4,40$ ) и  $\text{NH}_3^+$  ( $\text{pK}_3 = 9,95$ ). Константы ионизации взяты из [19] и пересчитаны на ионную силу 0,01 М. На рис.1 представлена диаграмма распределения различно протонированных форм глутаминовой кислоты.



**Рис. 1.** Диаграмма распределения глутаминовой кислоты: катион  $\text{H}_3\text{L}^+$  (1), цвиттер-ион  $\text{H}_2\text{L}^\pm$  (2), однозарядный анион  $\text{HL}^-$  (3) и двухзарядный анион  $\text{L}^{2-}$  (4).

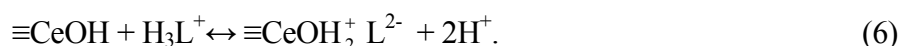
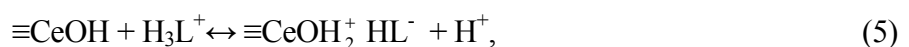
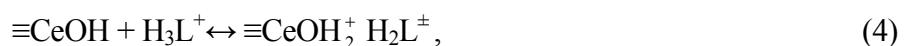
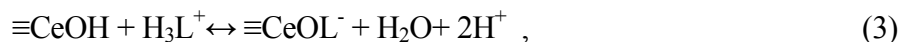
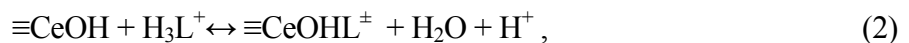
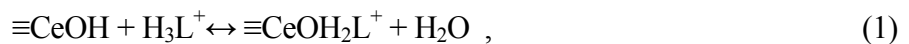
Результаты изучения адсорбции глутаминовой кислоты от pH для двух концентраций сорбата представлены на рис.2. Адсорбционные кривые проходят через максимум, положение которого по шкале pH примерно соответствует константе диссоциации  $\gamma$ -карбоксильной группы.



**Рис. 2.** Адсорбция глутаминовой кислоты на поверхности диоксида церия из водных растворов в зависимости от рН и ионной силы: концентрация кислоты  $1 \cdot 10^{-3}$  (а) и  $5 \cdot 10^{-4}$  (б) моль/л; 0,01 М (1) и 0,1 М (2) NaCl. Символы – экспериментальные значения адсорбции, линии – адсорбционные кривые, рассчитанные в предположении образования комплекса  $\equiv\text{CeOH}_2^+ \text{HL}^-$ .

Анализ литературных данных по адсорбции глутаминовой и аспарагиновой кислот на поверхности оксидов [5–13] показывает, что авторы считают основными возможными реакциями взаимодействия между нейтральными группами  $\equiv\text{MeOH}$  и карбоксильными группами аминокислот с образованием ковалентной связи  $\text{Me}-\text{O}-\text{C}$ . Высказано предположение, что обе карбоксильные группы аминокислоты связаны с 2 или 4 атомами металла (алюминия или титана) ковалентными или водородными связями. Авторы находят подтверждения этому в ИК-спектрах адсорбированных аминокислот, хотя и не исключают возможности образования комплексов, в которых анионы аминокислот связаны электростатически с положительно заряженными группами поверхности. Нам кажется маловероятным образованием таких полидентатных комплексов, тем более что изменения, наблюдаемые в ИК-спектрах, не могут быть интерпретированы столь однозначно.

Сопоставление диаграмм распределения форм глутаминовой кислоты в растворе и функциональных групп поверхности оксида позволили нам предположить протекание следующих реакций комплексообразования:

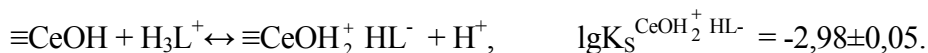


Исходными взаимодействующими частицами (компонентами) во всех реакциях являются незаряженные гидроксильные группы на поверхности и полностью протонированная молекула аминокислоты. Первые три реакции характеризуют взаимодействие нейтральных центров поверхности с  $\gamma$ -карбоксильной группой аминокислоты, результатом чего является образование ковалентной связи  $\text{Ce}-\text{O}-\text{C}$ ; при этом остаток аминокислоты содержит следующие группы:  $\text{NH}_3^+$  и  $\alpha\text{-COOH}$  (1);  $\text{NH}_3^+$  и  $\alpha\text{-COO}^-$  (2);  $\text{NH}_2$  и  $\alpha\text{-COO}^-$  (3). Эти реакции сопровождаются выделением молекул воды и протонов. Мы предполагаем, что образование ковалентных связей может происходить с участием  $\gamma$ -карбоксильной группы, поскольку нейтральные аминокислоты, не содержащие дополнительных функциональных групп, не сорбируются на поверхности диоксида церия да и некоторых других оксидов [9–11]. Если бы во взаимодействие с гидроксильными группами поверхности вовлекались  $\alpha\text{-COOH}$  группы, то все другие аминокислоты тоже сорбировались бы на поверхности оксидов. При исследовании адсорбции таких аминокислот, как триптофан и тирозин, заметного понижения исходной концентрации после контакта с сорбентом нами обнаружено не было. По-видимому, наличие положительно заряженной группы  $\text{NH}_3^+$  вблизи  $\alpha$ -карбоксигруппы мешает приближению молекулы аминокислоты к поверхности, которая при значениях  $\text{pH} < 6,3$  (точка нулевого заряда) несет положительный заряд. Нельзя, впрочем, исключить возможность образования поверхностных комплексов, в которых различно протонированные формы аминокислоты связаны с поверхностью только водородными связями.

Три следующие реакции характеризуют образование электростатических комплексов между протонированными центрами поверхности и различными формами аминокислоты – цвиттер-ионом (4), однозарядным анионом (5) и двухзарядным анионом (6).

Комплексы с образованием ковалентных связей являются внутрисферными, а комплексы с электростатическими связями – внешнесферными. Обычно вид зависимости степени адсорбции от ионной силы позволяет сделать выбор в пользу образования одного из типов комплексов. Нами наблюдалось небольшое уменьшение величины адсорбции в кислой области при повышении ионной силы (рис.2), что указывает на конкуренцию между анионами аминокислоты и электролита за положительно заряженные центры поверхности диоксида церия.

Экспериментальные данные по адсорбции глутаминовой кислоты (рис. 2) были использованы для подбора констант устойчивости поверхностных комплексов с помощью программы GRFIT [20] в рамках основной модели Штерна [18]. Рассчитать адсорбционные кривые в предположении образования двух каких-либо комплексов не удалось. Наилучшее соответствие между экспериментальными данными и рассчитанными адсорбционными кривыми было получено в предположении образования одного комплекса, в котором однозарядный анион глутаминовой кислоты, (с обеими ионизированными карбоксильными группами и протонированной аминогруппой) взаимодействует с положительно заряженными  $\equiv\text{CeOH}_2^+$  группами диоксида церия (реакция 5):



Рассчитанная константа равновесия реакции может быть пересчитана в константу устойчивости комплекса  $\equiv\text{CeOH}_2^+ \text{HL}^-$ , если учесть константы равновесия реакций протонирования поверхностных групп и диссоциации молекулы аминокислоты:

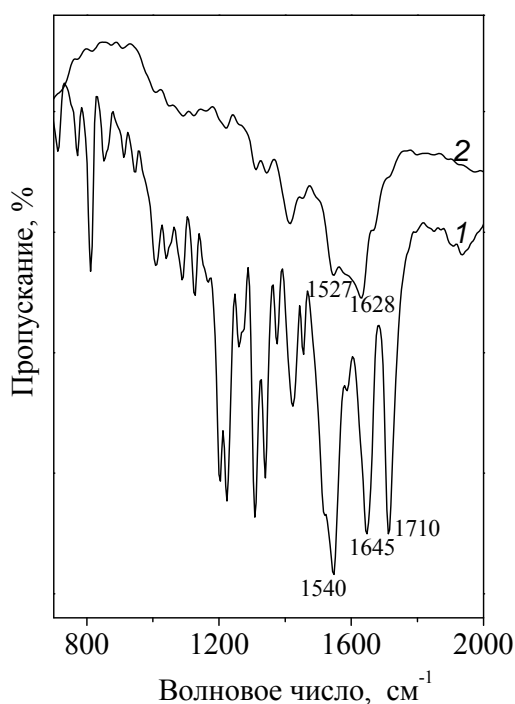


Интересно отметить, что константа устойчивости соответствующего комплекса фолиевой кислоты, в котором с поверхностью связан анион с обеими ионизированными

карбоксильными группами глутаминового остатка ( $\equiv \text{CeOH}_2^+ \text{HL}^{2-}$ ,  $\lg K_s = 7,35$ ), значительно выше. Эта разница в константах устойчивости сопоставима по величине с разностью величин констант диссоциации  $\alpha$ - и  $\gamma$ -карбоксильных групп для глутаминовой и фолиевой кислот: фолат-анион прочнее связывается и с протонами в растворе, и с протонированными группами на поверхности диоксида церия.

ИК-спектры глутаминовой кислоты, как и многих других аминокислот, детально изучены, проведено полное отнесение полос поглощения для различных форм аминокислоты [13, 21].

На рис.3. приведены ИК-спектры поглощения глутаминовой кислоты в свободном состоянии и адсорбированной на поверхности диоксида церия. Спектры адсорбированных молекул практически не зависят от pH раствора, из которого проводили сорбцию, они отличаются только интенсивностью поглощения, поэтому на рис. 3 приведен только один спектр.



**Рис. 3.** ИК-спектр глутаминовой кислоты ( $\text{H}_2\text{L}^{\pm}$ ) в свободном состоянии (1) и адсорбированной из раствора с pH 4,5 (2) на поверхности диоксида церия.

В области поглощения  $3700 - 3000 \text{ см}^{-1}$  проявляются полосы валентных колебания гидроксильных групп  $\text{Ce-OH}$  и молекул воды, которые перекрывают полосы поглощения сорбированных молекул, поэтому на рис.3 приведена та часть спектра, в которой преимущественно проявляются полосы сорбирующейся молекулы. Наиболее информативными являются полосы валентных колебаний обеих карбоксильных групп глутаминовой кислоты. Протонированным карбоксильным группам соответствует полоса поглощения при  $1710 - 1720 \text{ см}^{-1}$ , при диссоциации этих групп в спектре появляются полосы асимметричных валентных колебаний при  $1645 \text{ см}^{-1}$  ( $\alpha\text{-COO}^-$ ) и  $1540 \text{ см}^{-1}$  ( $\gamma\text{-COO}^-$ ). Полосы около  $1420 \text{ см}^{-1}$  относятся к симметричным валентным колебаниям карбоксилат-анионов. Деформационные колебания  $\text{CH}_2$ -групп наблюдаются при  $1340 - 1300 \text{ см}^{-1}$ . В ИК-спектрах адсорбированной глутаминовой кислоты полностью отсутствуют полосы валентных колебаний  $\text{COOH}$ -групп при  $1710 \text{ см}^{-1}$ . Это указывает на то, что обе карбоксильные группы ионизированы. Полосы асимметричных валентных колебаний  $\alpha\text{-COO}^-$  группы сдвигаются до  $1628 \text{ см}^{-1}$ ,  $\gamma\text{-COO}^-$  группы – до  $1547 \text{ см}^{-1}$ . Сдвиг обеих полос поглощения ионизированных карбоксильных групп в адсорбированном состоянии по сравнению со спектром глутаминовой кислоты свидетельствует о том, что обе группы

принимают участие в комплексообразовании на поверхности. Поскольку полосы поглощения сдвигаются в противоположных направлениях и величины их сдвигов не одинаковы, можно предположить, что связи, образуемые этими группами на поверхности диоксида церия, неравноценны.

## Выводы

Установлено, что молекулы глутаминовой кислоты связываются с функциональными группами на поверхности диоксида церия через карбоксильные группы. Сходство зависимости адсорбции от pH для фолиевой и глутаминовой кислот позволяет предположить, что структура образующихся поверхностных комплексов подобна. Комплексообразование анионов фолиевой кислоты происходит по карбоксильным группам глутаминового заместителя, т. е. активная группировка птеринового кольца, которая принимает участие в биохимических реакциях, остается «свободной» и доступной для взаимодействия с рецепторами.

## Литература

1. Cleaves H.J., Scott A.M., Hill F.C., Leszczynsky J., Sahai N, Hazen R. Mineral-organic interfacial processes: potential roles in the origin of life // *Chem. Rev.* – 2012. – V.41. – P. 5365 – 5568
2. Xu J., Sahai N., Eggleston C.M., Schoonen M.A.A. Reactive oxygen species at the oxide/water interface: formation mechanisms and implication for prebiotic chemistry and the origin of life // *Earth Planet. Sci Letts.* – 2013. – V. 363. – P. 156 – 167.
3. Orgel L.E. Polymerization on the rocks: theoretical introduction // *Origin Life Evol. Biosh.* – 1998. – V. 28. – P. 227 – 234.
4. Hazen R.M., Sverjensky D.A. Mineral surfaces, geochemical complexities, and the origin of life // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* doi.10.1101/cshperspect.a002162
5. Kumanomido H., Patel R.C., Matjevic E. Interaction of amino acids with hydrous metal oxides. I. Chromium-hydroxide-*D*-aspartic acid system // *J.Colloid Interface Sci.* – 1978. – V. 66. – P. 183 – 191.
6. Giancomelli C.E., Avena M.J., De Pauli C.P. Aspartic acid adsorption onto TiO<sub>2</sub> particle surface, experimental data and model calculations // *Langmuir.* – 1995. – V. 11, №9. – P. 3483 – 3490.
7. Roddick-Lanzilotta A.D., McQuillan A.J. An in situ infrared spectroscopic investigation of lysine peptide and polylysine adsorption on TiO<sub>2</sub> from aqueous solutions // *J.Colloid Interface Sci.* – 1999. – V. 217. – P. 194 – 202.
8. Roddick-Lanzilotta A.D., McQuillan A.J. An in situ infrared spectroscopic investigation of glutamic acid and of aspartic acids adsorbed on TiO<sub>2</sub>: implications for biocompatibility of titanium // *J.Colloid Interface Sci.* – 2000. – V. 227. – P. 48 – 54.
9. Sverjensky D.A., Jonsson C.M., Jonsson C.I., Cleaves H.J., Hazen R.M. Glutamate surface speciation on amorphous titanium dioxide and hydrous ferric oxide // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – V.42. – P. 6034 – 6039.
10. Jonsson C.M., Jonsson C.L., Sverjensky D.A., Cleaves H.J., Hazen R.M. Attachment of L-glutamate to rutile (TiO<sub>2</sub>): a potentiometric, adsorption and surface complexation study // *Langmuir.* – 2009. – V. 25. – P. 12217 – 12135.
11. Jonsson C.M., Jonsson C.L., Ertada C., Sverjensky D.A., Cleaves H.J., Hazen R.M. Adsorption of L-aspartate to rutile (TiO<sub>2</sub>) : experimental and theoretical surface complexation studies // *Geochim. Cosmochim. Acta.* - 2010. – V. 74. – P. 2356 – 2367.
12. Parikh S.J., Kubicki J.D., Jonsson C.M., Jonsson C.L., Hazen R.M., Sverjensky D.A., Sparks D.L. Evaluation glutamate and aspartate binding mechanisms to rutile via ATR-FTIR spectroscopy and quantum chemical calculations // *Langmuir.* – 2011. – V. 27, №5. – P. 1778 – 1787.

13. Greiner E., Kumar K., Sumit M., Guiffre A., Zhao W., Pedersen J., Sahai N. Adsorption of L-glutamic and L-aspartic acid to  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 2014. – V. 133. – P. 142 – 155.
14. Власова Н.Н., Головкова Л.П., Стукалина Н.Г. Адсорбция фолиевой кислоты на поверхности нанокристаллического диоксида церия // *Поверхность.* – 2014. – Вып.6(21). – С. 39 – 46.
15. Власова Н.Н., Головкова Л.П., Стукалина Н.Г. Адсорбция органических кислот на поверхности диоксида церия // *Коллоид. журн.* – 2015. – Т. 77, № 4. – С. 433 – 440.
16. Иванов В.К., Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванова О.С. Необычные свойства диоксида церия // *Природа.* – 2011. – №3. – С. 47 – 57.
17. McCaldin D.J. The chemistry of ninhydrin // *Chem. Rev.* – 1960. – V. 60. – P. 39 – 51.
18. Westall J.C., Hohl H., A comparison of electrostatic models for the oxide/ solution interface // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1980. – V. 12. – P. 265–294.
19. Яцимирский К.Б., Крисс Е.Е., Гвяздовская В.Л. Константы устойчивости комплексов биометаллов с лигандами. Справочник. – Киев: Наук. думка, 1979. – 228 с.
20. 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.
21. Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains // *Prog. Biophys. Mol. Biology.* – 2000. – V. 74. – P. 141 – 173.

### **АДСОРБЦІЯ ГЛЮТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ НА ПОВЕРХНІ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ**

**Н.М. Власова, Л.П. Головкова**

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,  
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, e-mail: natalie.vlasova@gmail.com*

*Досліджено адсорбцію глютамінової кислоти з водних розчинів на поверхні діоксиду церію в залежності від рН, іонної сили та концентрації сорбату. Розраховано константи стійкості поверхневих комплексів, що утворюються внаслідок взаємодії між глютамат-моноаніоном та протонованими поверхневими групами діоксиду церію. Будову поверхневого комплексу підтверджено методом ІЧ-спектроскопії.*

### **ADSORPTION OF GLUTAMIC ACID ON THE NANOCRYSTALLINE CERIA SURFACE**

**N.N. Vlasova, L.P. Golovkova**

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,  
17 General Naumov Str. Kyiv, 03164, Ukraine, e-mail: natalie.vlasova@gmail.com*

*The adsorption of glutamic acid at the ceria/aqueous solution interface is studied as a function of pH, ionic strength and adsorbate concentration. Stability constants of surface complex of glutamic acid, in which glutamate-monoanion is bound with protonated hydroxyl groups of ceria, are calculated. Structure of surface complex is confirmed by IR-spectroscopy.*