

АДСОРБЦІЯ АДЕНІНОВИХ НУКЛЕОТИДІВ НА ПОВЕРХНІ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ

Н.М. Власова, О.В. Маркітан

*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 аденінових нуклеотидів, що відрізняються довжиною фосфатного ланцюга, з водних розчинів на поверхні нанокристалічного діоксиду церію. Залежності адсорбції від рН та іонної сили інтерпретовані в рамках теорії комплексоутворення на поверхні. Кількісні параметри адсорбції – константи рівноваги реакцій утворення зовнішньосферних електростатичних комплексів розраховані з використанням базової моделі Штерна для подвійного електричного шару.

Вступ

В останні роки було знайдено унікальні властивості нанокристалічного діоксиду церію. З'ясувалося, що частинкам з розміром менше 10 нм притаманні специфічні окисно-відновні властивості, завдяки яким вони можуть діяти як активні рецептори вільних радикалів та інгібітори активних форм кисню [1, 2]. Було розроблено спеціальні методи синтезу наночастинок діоксиду церію, які можливі було б використовувати у медико-біологічних цілях [3]. Так, наприклад, синтез нанокристалічного діоксиду церію в присутності цитрату та аденозинтрифосфату (АТФ), приводить до одержання таких форм сорбенту, що характеризуються підвищеною здатністю проникати у мітохондрії [4], які саме і є основним джерелом активних форм кисню. При використанні під час синтезу нанокристалічного діоксиду церію як стабілізаторів цитрат-іонів та АТФ можна очікувати додаткової тропності модифікованих частинок по відношенню до мітохондрій та підвищення їх концентрації у цих органелах. Це і обумовлює інтерес до взаємодії нуклеотидів, особливо аденінового ряду, з нанокристалічним діоксидом церію, тобто до вивчення процесів адсорбції цих біологічно активних речовин на поверхні діоксиду церію з водних розчинів.

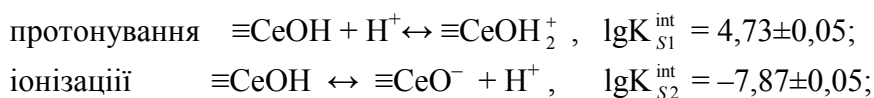
Метою роботи було визначення кількісних параметрів адсорбції нуклеотидів аденінового ряду з водних розчинів на поверхні діоксиду церію та виявлення впливу довжини фосфатного ланцюга.

Експериментальна частина

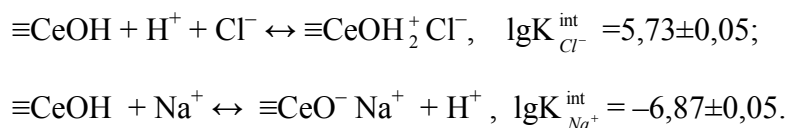
В роботі використано нанокристалічний порошок діоксиду церію (nanopowder, Aldrich) з питомою поверхнею $60 \pm 5 \text{ м}^2/\text{г}$ (Nova 1200, Quantachrome), що має кубічну кристалічну ґратку (структурний тип флуориту, карточка JCPDS 34-394). Розмір частинок, розрахований за рівнянням Шредера, становить 31 нм, що відповідає розміру, визначеному фірмою-виробником.

Аденінові нуклеотиди – аденозин-5'-моно-, ди- та трифосфати (АМФ, АДФ, АТФ, «ч.д.а.»), виробництва Sigma-Aldrich) були використані без додаткової очистки. Для встановлення рН розчинів та суспензій застосовували стандарт-титри HCl та NaOH (Titrisol, Merck).

За даними потенціометричного титрування суспензій діоксиду церію в водних розчинах 0,01 та 0,1 моль/л NaCl з використанням програми GRFIT [5] та базової моделі Штерна [6] для подвійного електричного шару були розраховані константи рівноваги реакцій [7]



зв'язування з аніонами і катіонами електроліту



Адсорбцію нуклеотидів вивчали при кімнатній температурі ($\sim 20^\circ\text{C}$) та постійній іонній силі 0,01М NaCl. Змішували рівні об'єми суспензії CeO_2 (2г/л) та розчинів нуклеотидів (0,2 ммоль/л). Додаванням розчинів кислоти або лугу доводили значення рН до необхідних величин в інтервалі 2 – 8 (Ионметр ЭВ-74). Після вистоявання суспензій при перемішуванні протягом 2 г відокремлювали тверду фазу центрифугуванням (8000 об/хв, 20 хв). Попередньо було визначено, що цього часу достатньо для встановлення адсорбційної рівноваги. Концентрацію нуклеотидів визначали за інтенсивністю поглинання в УФ-діапазоні спектра (спектрофотометр Specord M-40). Всі нуклеотиди характеризуються інтенсивною смугою поглинання з максимумом 260 нм, положення якого змінюється до 258 нм при зниженні рН до 2. Залежність положення та інтенсивності смуги поглинання від рН розчину та концентрації нуклеотидів було попередньо досліджено. Величини адсорбції кислот (у % відносно вихідної концентрації) обчислювали за різницею концентрацій в суспензії до та після адсорбції.

Результати та їх обговорення

Поява заряду на поверхні оксидів внаслідок взаємодії з протонами водних розчинів приводить до утворення подвійного електричного шару між розчином електроліту та поверхнею оксиду. Цей заряд впливає на реакції комплексоутворення поверхневих функціональних груп з неорганічними та органічними молекулами. Для оцінки протолітичних та адсорбційних властивостей поверхневих груп застосовуються моделі комплексоутворення [6]. Будову подвійного електричного шару, що виникає на поверхні діоксиду титану при контакті з водним розчином електроліту, зображено на рис. 1.

Для того, щоб обрати можливі реакції комплексоутворення, необхідно врахувати стан функціональних груп на поверхні твердого тіла та форми, в яких присутні молекули сорбатів в залежності від рН водного середовища.

Точка нульового заряду (ТНЗ) діоксиду церію знаходиться при рН 6,3, тобто при більших значеннях рН функціональні групи іонізуються, при менших значеннях рН – протонуються. Більшість гідроксильних груп залишаються неіонізованими, але концентрації заряджених груп достатньо великі. Так, концентрація груп $\equiv\text{CeOH}_2^+$ складає 0,2 ммоль/г при рН 2, концентрація груп $\equiv\text{CeO}^-$ дорівнює 0,125 ммоль/г при рН 9.

З іншого боку, необхідно прийняти до уваги всі реакції, що відбуваються у розчині. Для характеристики складу розчинів нуклеотидів необхідно детально розглянути протолітичні перетворення, що мають місце в розчинах при різних значеннях рН.

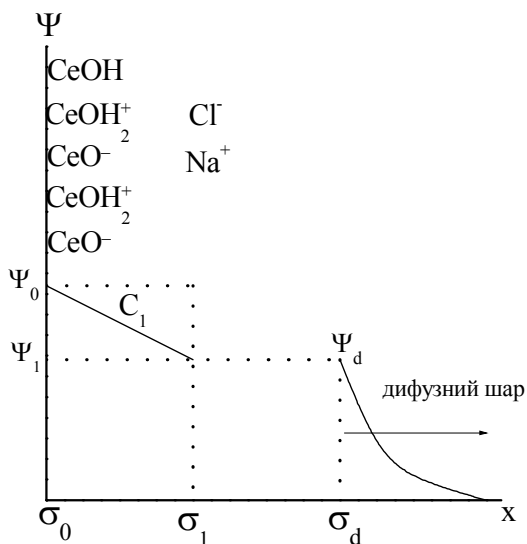


Рис. 1. Схема будови подвійного електричного шару (відповідно до базової моделі Штерна) на поверхні поділу фаз діоксид церію – розчин електроліту (Ψ – потенціал, σ – заряд поверхні, символи зарядів σ_0 та σ_1 відповідають площинам 0 та 1).

В молекулі аденозин-5'-монофосфату гідроксильна група в 5'-положенні рибози зв'язана з фосфатом, аденозин-5'-ди- та трифосфат містять залишки пірофосфатної та трифосфатної кислоти відповідно. Атом азоту аденіну N_1 протонується в слабо кислому середовищі. Аміногрупа аденіну не протонується навіть при дуже низьких значеннях рН внаслідок спряження електронної пари атому азоту з π -системою пуринового кільця. В сильно лужному середовищі іонізуються гідроксильні групи рибози, але це відбувається при $\text{pH} > 12$. Фосфатні групи у складі нуклеозидмоно-, ди- та трифосфатів мають два значення рК: первинні групи іонізовані при $\text{pH} > 1 - 2$, а іонізація вторинних груп відбувається при $\text{pH} > 6,5$ [8].

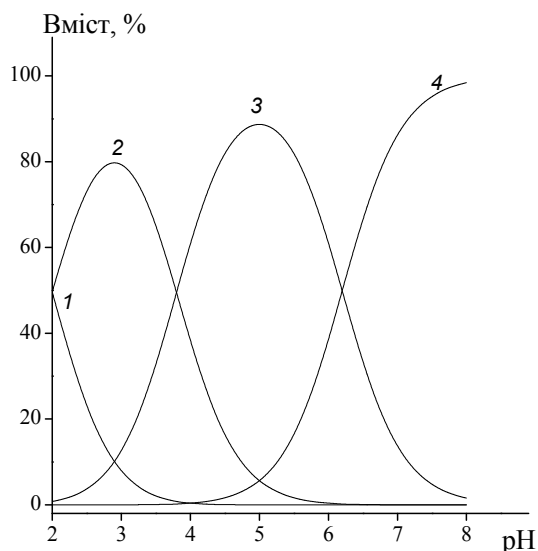
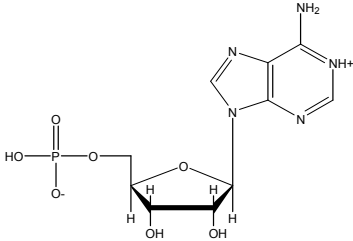
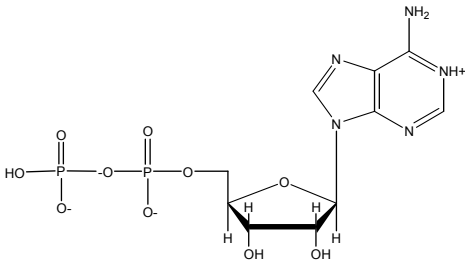
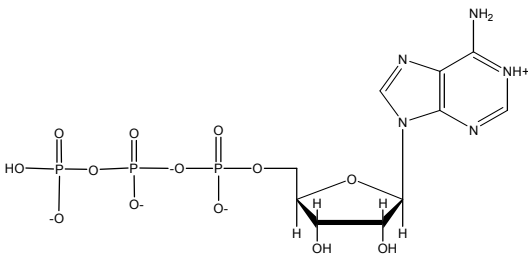


Рис. 2. Діаграма розподілу частинок АМФ в розчині в залежності від рН: повністю протонувана форма H_3L^+ (1), цвітер-іон H_2L^\pm (2), аніон HL^- (3) і діаніон L^{2-} (4).

Поєднання всіх процесів іонізації (константи іонізації нуклеотидів наведено в табл.1) приводить до складної картини розподілення різнопротонуваних частинок у розчинах нуклеотидів в залежності від рН (рис. 2).

Аналіз діаграм розподілу показує, що у дослідженому інтервалі рН 2 – 8 в розчині аденозинмонофосфату основними частинками є цвітер-іон H_2L^\pm , аніон HL^- і діаніон L^{2-} ; для аденозиндифосфату такими частинками є аніонні форми H_2L^- , HL^{2-} і L^{3-} . У разі аденозинтрифосфату частинками, що знаходяться у рівновазі, є аніони H_2L^{2-} , HL^{3-} і L^{4-} .

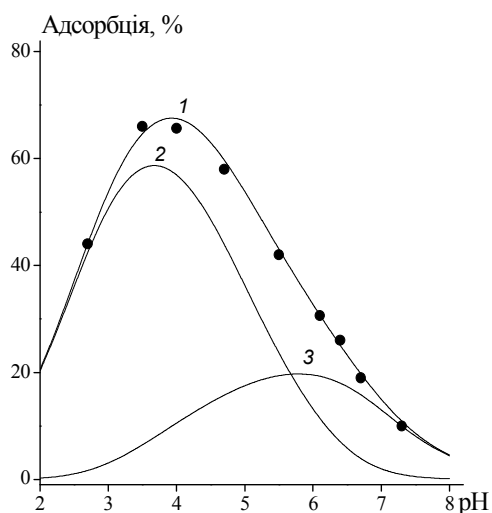
Таблиця 1. Константи іонізації аденінових нуклеотидів [9]

Формули нуклеотидів	Константи іонізації (0,01 М)	
	$pK_1 (N_1-H^+)$	$pK_2 (-PO_3H^-)$
 <p>Аденозин-5'-монофосфат (H_2L^\pm)</p>	3,83	6,46
 <p>Аденозин-5'-дифосфат (H_2L^-)</p>	4,21	6,71
 <p>Аденозин-5'-трифосфат (H_2L^{2-})</p>	4,38	6,96

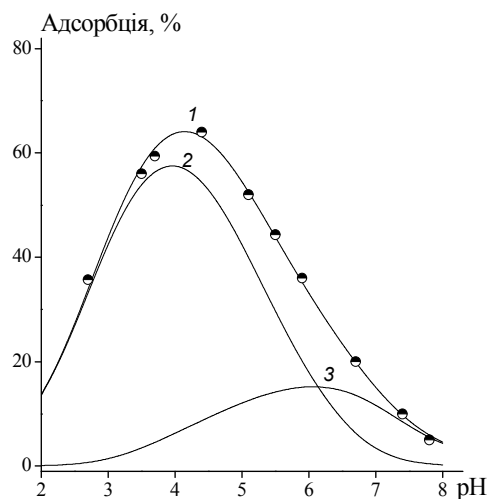
Результати дослідження адсорбції аденінових нуклеотидів на поверхні діоксиду церію з водних розчинів від рН наведено на рис.3.

Всі адсорбційні криві мають подібний вигляд: вони проходять через максимум, положення якого за шкалою рН приблизно відповідає pK дисоціації протону від атому азоту пуринового кільця. Слід відмітити, що величини адсорбції зменшуються в ряду $AM\Phi > AD\Phi > AT\Phi$.

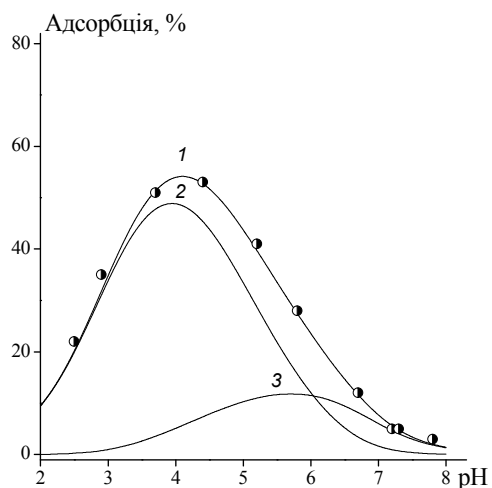
Аналіз адсорбційних кривих показує, що найбільш ймовірною формою, що адсорбується, є частинка, в якій атом азоту аденінового кільця нейтральний, оскільки зростання величин адсорбції починається після іонізації групи N_1-H^+ . Сорбуються, скоріше за все, аніонні форми нуклеотидів. Можна припустити, що аніони нуклеотидів зв'язуються з протонованими поверхневими групами за рахунок електростатичної взаємодії. Зменшення величин адсорбції при зростанні рН > 5–6 (більше ТНЗ діоксиду церію) свідчить про можливе взаємне відштовхування негативно заряджених аніонів та іонізованих функціональних поверхневих груп.



a



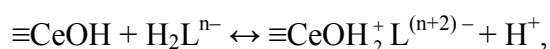
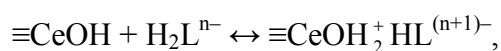
б



в

Рис. 3. Залежність адсорбції аденозин-5'-монофосфату (*a*), аденозин-5'-дифосфату (*б*) і аденозин-5'-трифосфату (*в*) на поверхні діоксиду церію з водних розчинів 0,01 М NaCl від рН (1) та розподіл поверхневих комплексів $\equiv\text{CeOH}_2^+ \text{HL}^{(n+1)-}$ (2) і $\equiv\text{CeOH}_2^+ \text{L}^{(n+2)-}$ (3).

Співставлення діаграм розподілу форм нуклеотидів в розчині та функціональних груп на поверхні оксиду дозволяє припустити перебіг наступних реакцій комплексоутворення:



де n дорівнює 0 (\pm) для АМФ, 1 для АДФ та 2 для АТФ.

Найкращу відповідність між експериментальними даними та розрахованими за програмою GRFIT на підставі основної моделі Штерна адсорбційними кривими було одержано у разі перебігу на поверхні саме цих двох реакцій. На рис. 3 лініями представлені розраховані адсорбційні криві, а також наведено діаграми розподілу поверхневих комплексів в залежності від рН.

Константи рівноваги відповідних реакцій комплексоутворення були розраховані за наступними рівняннями:

$$K_{1S} = \frac{[CeOH_2^+ HL^{(n+1)-}]}{[CeOH][H_2L^{n-}]} \exp(F\{\Psi_0 - (n+1)\Psi_1\} / RT),$$

$$K_{2S} = \frac{[CeOH_2^+ L^{(n+2)-}][H^+]}{[CeOH][H_2L^{n-}]} \exp(F\{\Psi_0 - (n+2)\Psi_1\} / RT),$$

де коефіцієнти при величинах потенціалів (Ψ_0 та Ψ_1) відповідають зарядам: величина заряду у площині 0 становить +1 (заряд протонованої групи $\equiv CeOH_2^+$), а для площини 1 дорівнює заряду аніонної форми нуклеотиду, яка приймає участь у комплексоутворенні.

Константи рівноваги реакцій були перераховані в константи стійкості відповідних комплексів з урахуванням константи рівноваги реакції протонування гідроксильних груп на поверхні діоксиду церію та констант іонізації нуклеотидів. Всі розраховані величини наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Константи рівноваги реакцій комплексоутворення аденінових нуклеотидів на поверхні діоксиду церію ($\lg K \pm 0,05$)

Реакція на поверхні	АМФ	АДФ	АТФ
$\equiv CeOH + H_2L^{n-} \leftrightarrow \equiv CeOH_2^+ HL^{(n+1)-}$	4,97	4,68	4,55
$\equiv CeOH + H_2L^{n-} \leftrightarrow \equiv CeOH_2^+ L^{(n+2)-} + H^+$	0,50	-0,40	-1,27
$\equiv CeOH_2^+ + HL^{(n+1)-} \leftrightarrow \equiv CeOH_2^+ HL^{(n+1)-}$	4,23	4,00	3,83
$\equiv CeOH_2^+ + L^{(n+2)-} \leftrightarrow \equiv CeOH_2^+ L^{(n+2)-}$	5,76	5,13	4,50

Всі розрахунки проведено у припущенні, що поверхневі комплекси утворюються за рахунок електростатичної взаємодії протонованих функціональних груп діоксиду церію з аніонними формами нуклеотидів. Це положення підтверджується наявністю залежності величин адсорбції від іонної сили. На рис. 4, як приклад, наведено величини адсорбції АМФ із розчинів з різними концентраціями фонового електроліту. Із збільшенням іонної сили посилюється конкуренція між аніонами фонового електроліту та аніонами нуклеотидів, що приводить до зменшення величин адсорбції особливо з кислих розчинів.

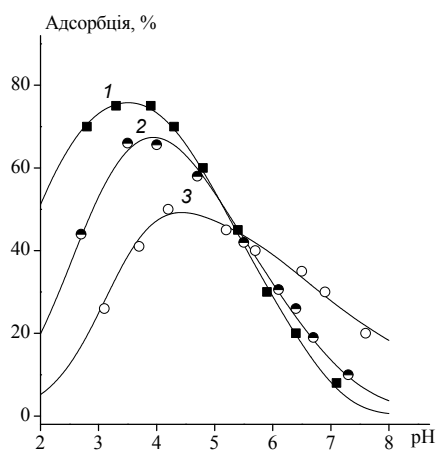


Рис. 4. Адсорбція аденозин-5'-монофосфату на поверхні діоксиду церію в залежності від концентрації NaCl: 0,001 (1), 0,01 (2) і 0,1 (3) М.

Порівняння одержаних величин свідчить, що зв'язування аніонів одного і того ж нуклеотида з більшим зарядом характеризується більш високою константою рівноваги. Це закономірно для комплексів, що утворені за рахунок електростатичної взаємодії.

Константи стійкості комплексів обох видів зменшуються в ряду від АМФ до АТФ. Це здається дивним, тому що збільшення заряду аніону звичайно приводить до підвищення констант стійкості відповідних комплексів. Можливо, цей факт пояснюється тим, що утворення комплексів нуклеотидів з іонами церію приводить до часткового розчинення діоксиду церію та переходу деякої кількості останнього в розчин. Про це може свідчити поява смуги поглинання з максимумом при 310 нм для розчинів з $\text{pH} > 5,5$, причому ця смуга з'являється лише у випадку ди- та трифосфатів. З іншого боку, відомо, що наявність у розчині іонів церію приводить до пришвидшення гідролізу нуклеотидів [10]. Всі ці факти потребують додаткового дослідження, тим більше, що утворення комплексів нуклеотидів кількісно охарактеризоване лише для іонів церію (III).

Висновки

Таким чином, адсорбція нуклеотидів аденінового ряду на поверхні діоксиду церію визначається електростатичною взаємодією аніонних форм нуклеотидів з протонованими функціональними групами сорбенту. Довжина фосфатного ланцюга майже не впливає на величини адсорбції аденінових нуклеотидів.

Можливо, при синтезі нанокристалічного діоксиду церію в присутності АТФ утворюються більш стійкі комплекси за рахунок ковалентного зв'язування фосфатів з нейтральними поверхневими групами, тим більше, що умови проведення синтезу відрізняються від умов, в яких виконувалось дослідження адсорбції.

Література

1. Иванов В.К., Щербаков А.Б., Усатенко А.В. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия // Успехи химии. – 2009. – Т. 78, № 9. – С. 924–941.
2. Иванов В.К., Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванова О.С. Необычные свойства диоксида церия // Природа. – 2011. – №.3. – С. 47–57.
3. Иванов В.К., Полежаева О.С., Шапорев А.С. Синтез и исследование термической устойчивости зольей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // Журн. неорган. химии. – 2010. – Т. 55, № 3. – С. 368–373.
4. Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д., Спивак Н.Я. Нанометериалы на основе диоксида церия: свойства и перспективы в биологии и медицине // Біотехнологія. – 2011. – Т.4, 1. – С. 9–28.
5. 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.
6. 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.
7. Власова Н.Н., Головкова Л.П., Стукалина Н.Г. Адсорбция органических кислот на поверхности диоксида церия // Коллоид. журнал – 2015. – Т. 77, № 4. – С. 433–440.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – 1987. – Москва: Мир. – 360 С.
9. Smith R.M., Martell A.E., Chen Y. Critical evaluation of stability constants for nucleotide complexes with protons and metal ions and the accompanying enthalpy changes // Pure Appl. Chem. – 1991. – V. 63, № 7. – P. 1016–1080.

10. Zhu B., Wu Y.-J., Zhao D.-Q., Ni J.-Z. Cleavage of nucleotides by Ce⁴⁺ and the lanthanide metal complexes // BioMetals. – 1999. – V.12. – P. 11–17.

АДСОРБЦИЯ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Н.Н.Власова, О.В. Маркитан

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

Исследована адсорбция адениновых нуклеотидов, отличающихся длиной фосфатной цепи, из водных растворов на поверхности нанокристаллического диоксида церия. Зависимости адсорбции от pH и ионной силы интерпретированы в рамках теории комплексообразования на поверхности. Количественные параметры адсорбции – константы равновесия реакций образования внешнесферных электростатических комплексов рассчитаны с использованием базовой модели Штерна для двойного электрического слоя.

ADSORPTION OF ADENINE NUCLEOTIDES ON THE NANOCRYSTALLINE CERIA SURFACE

N.M.Vlasova, O.V. Markitan

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

The adsorption of adenine nucleotides with different phosphate chains from aqueous solutions onto nanocrystalline ceria surface was investigated. The adsorption dependences of pH and ionic strength are interpreted in terms of surface complexation theory. The equilibrium reaction constants of the formation of outer-sphere electrostatic complexes are calculated with using basic Stern model for double electric layer.