

УДК 544.723

АДСОРБЦИОННЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ДИОКСИДА ТИТАНА

© 2019 г. Н. Н. Власова¹, *, О. В. Маркитан¹

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
Украина, 03164 Киев, ул. генерала Наумова, 17

*e-mail: natalie.vlasova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.08.2018 г.

Показано, что при адсорбции пуриновых нуклеотидов из водных растворов на поверхности нанокристаллического диоксида титана образуются внешнесферные электростатические комплексы. Рассчитаны константы устойчивости адсорбционных комплексов, в которых анионные формы нуклеотидов связаны с протонированными группами диоксида титана.

DOI: 10.1134/S0023291219010142

ВВЕДЕНИЕ

Наноразмерные материалы находят все большее применение в различных отраслях техники, науки и медицины [1–3]. Благодаря набору уникальных свойств [4] наноразмерный диоксид титана широко используется в биомедицине [5], что делает особенно необходимым понимание природы взаимодействий его поверхностных групп с биообъектами [6–8]. Такие контакты сложны, поскольку они включают в себя образование множества различных по природе связей с участием многочисленных группировок биомолекул и функциональных групп поверхности твердого тела. Исследования взаимодействий поверхности наноразмерных оксидов с мономерными биомолекулами — нуклеотидами, аминокислотами, моносахаридами, из которых образуются соответствующие биополимеры, могут служить основой установления механизма на молекулярном уровне.

Целью настоящего исследования было получение количественных характеристик адсорбции нуклеотидов пуринового ряда и определение механизма их взаимодействия с поверхностью диоксида титана.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали нанокристаллический порошок диоксида титана (Aldrich) с удельной поверхностью 62 ± 5 м²/г (Nova 1200, Quantachrome), который по данным рентгенофазового анализа представляет собой анатаз с размером частиц 30 нм, что соответствует величине, заявленной производителем (<25 нм).

Пуриновые нуклеотиды в виде натриевых солей — аденозин-5'-монофосфат (АМФ, “ч.”, Reanal), гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ, “ч.”, Reanal) и инозин-5'-монофосфат (ИМФ, “ч. д. а.”, Sigma) и хлорид натрия (“ч. д. а.”, Merck) были использованы без дополнительной очистки.

Для установления необходимых значений pH растворов и суспензий применяли стандарт-титры HCl и NaOH (Titrisol, Merck, Германия). Все растворы и суспензии были приготовлены на бидистиллированной воде.

Адсорбцию пуриновых нуклеотидов изучали при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ по методике, подробно описанной в [9].

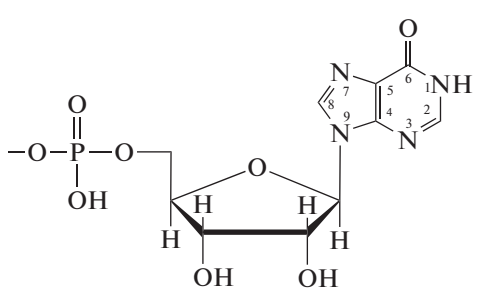
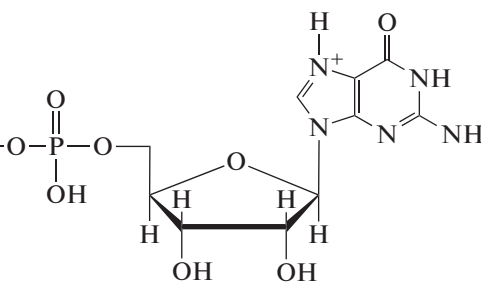
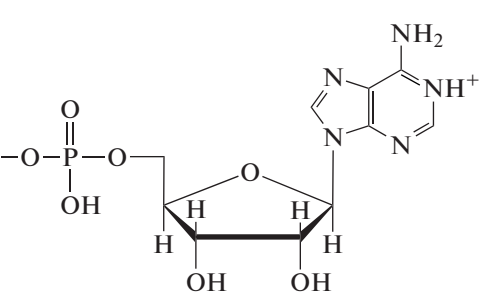
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие пуриновых нуклеотидов и функциональных групп диоксида титана было интерпретировано как образование адсорбционных комплексов. В состав таких комплексов могут входить протонированные в различной степени нуклеотиды и гидроксильные группы сорбента.

Нуклеотиды являются мономерными единицами нуклеиновых кислот, состоящими из гетероциклического основания, в котором атом водорода при одном из атомов азота замещен фосфорилированным углеводным остатком. Кроме обычных пуриновых оснований — аденина и гуанина в составе нуклеиновых кислот встречается “минорное” основание гипоксантин, нуклеозид которого называется инозин, а соответствующий нуклеотид — инозинмонофосфат.

Формулы исследованных пуриновых мононуклеотидов и константы их ионизации, рассчи-

Таблица 1. Константы ионизации пуриновых мононуклеотидов

Нуклеотид	Константы ионизации	
	$\lg K_{a1} (-NH^+)$	$\lg K_{a2} (-OP(=O)(OH)O^-)$
		$-6.19 \pm 0.1 \text{ M [9]}$
		$-6.47 \pm 0.01 \text{ M}$
		$-6.59 \pm 0.001 \text{ M}$
Инозин-5'-монофосфат, HL^-		
	$-N_7H^+$	
	$-2.32 \pm 0.1 \text{ M [9]}$	$-6.20 \pm 0.1 \text{ M [9]}$
	$-2.48 \pm 0.01 \text{ M}$	$-6.48 \pm 0.01 \text{ M}$
	$-2.54 \pm 0.001 \text{ M}$	$-6.66 \pm 0.001 \text{ M}$
Гуанозин-5'-монофосфат, $H_2L^\pm$		
	$-N_1H^+$	
	$-3.80 \pm 0.1 \text{ M [9]}$	$-6.18 \pm 0.1 \text{ M [9]}$
	$-3.96 \pm 0.01 \text{ M}$	$-6.46 \pm 0.01 \text{ M}$
	$-4.01 \pm 0.001 \text{ M}$	$-6.58 \pm 0.001 \text{ M}$
Аденозин-5'-монофосфат, $H_2L^\pm$		

танные для разных значений ионной силы, представлены в табл. 1.

Атомы азота пуринового кольца изученных нуклеотидов существенно различаются по основности. Отщепление протона от группы N_1-H^+

аденозин-5'-монофосфата происходит при $pH \sim 4$; депротонирование группы N_7-H^+ гуанозин-5'-монофосфата наблюдается при $pH > 2.3$; атом азота N_7 инозин-5'-монофосфата протонирован только в очень кислых растворах. К этим кислот-

но-основным равновесиям добавляются общие для всех мононуклеотидов реакции ионизации фосфатных групп. В табл. 1 приведены константы ионизации вторичной фосфатной группы, поскольку отщепление протона от первичной группы происходит в кислой области ($\text{pH} < 2$). На рис. 1 представлены диаграммы распределения различных форм изученных пуриновых нуклеотидов в зависимости от pH .

Для того чтобы выбрать возможные реакции комплексообразования необходимо учесть состояние функциональных групп поверхности оксида и формы, в виде которых адсорбирующиеся вещества присутствуют в растворе в зависимости от pH .

Для интерпретации экспериментальных данных о зависимости адсорбции пуриновых нуклеотидов от pH и ионной силы были использованы основная модель комплексообразования на поверхности Штерна [11] и программа GRFIT [12]. В соответствии с положениями этой модели на поверхности оксида присутствуют нейтральные ($\equiv\text{TiOH}$), протонированные ($\equiv\text{TiOH}_2^+$) и ионизированные ($\equiv\text{TiO}^-$) группы, которые частично связаны с ионами фонового электролита, образуя внешнесферные комплексы — ионные пары ($\equiv\text{TiOH}_2^+\text{Cl}^-$ и $\equiv\text{TiO}^-\text{Na}^+$). В кислой среде гидроксильные группы в основном протонированы, при pH выше точки нулевого заряда (6.5) преобладают ионизированные группы [13]. Поверхность подразделяется на 2 плоскости, одна из которых обозначается символом 0, в ней непосредственно происходит адсорбция потенциалопределяющих ионов и сильно сорбирующихся веществ. Во второй плоскости, обозначенной символом 1, располагаются противоионы фонового электролита и слабо сорбирующиеся вещества. Частицы, расположенные в этих плоскостях, определяют величину и знак заряда поверхности.

При моделировании кислотно-основных свойств и адсорбционных кривых по программе GRFIT составляется матрица компонентов, взаимодействие которых приводит к образованию всех частиц в системе. К материальным компонентам относятся гидроксильные группы диоксида титана, ионы фонового электролита, адсорбат и протоны. Кроме того, матрица компонентов дополняется электрическими составляющими exr0 и exr1 , которые соответствуют величинам зарядов частиц в плоскостях 0 и 1. Матрица частиц для системы диоксид титана—нуклеотид—хлорид натрия приведена в табл. 2. В матрице представлены реакции протонирования и ионизации функциональных групп поверхности, их взаимодействия с ионами Na^+ и Cl^- , а также реакции ионизации нуклеотидов. Концентрация OH^- -групп задается через ионное произведение воды при данной

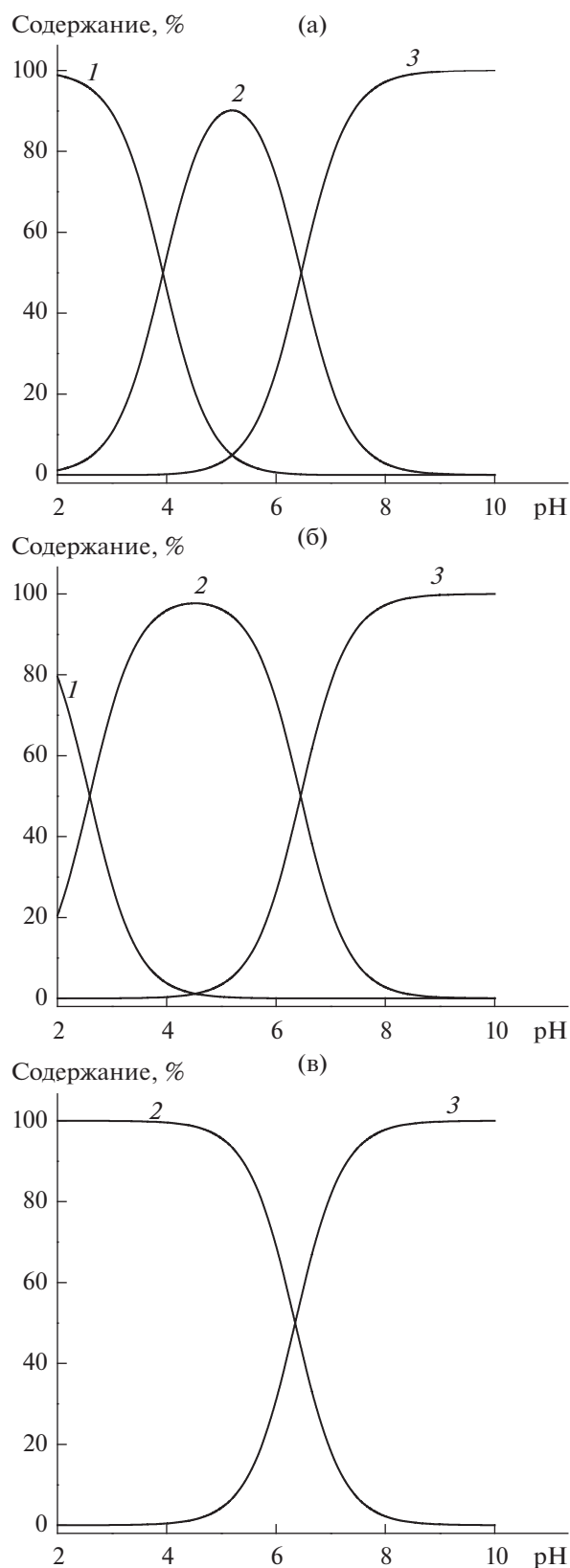
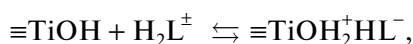


Рис. 1. Диаграммы распределения частиц АМФ (а), ГМФ (б) и ИМФ (в) в растворе в зависимости от pH : цвиттер-ион $\text{H}_2\text{L}^\pm$ (1), моноанион HL^- (2) и дианион L^{2-} (3).

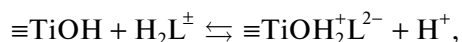
ионной силе. Константы равновесия реакций образования комплексов на поверхности, отмеченные звездочкой, подбираются при обработке экспериментальных данных с помощью программы. В качестве исходного компонента нуклеотида может быть выбрана любая его форма, присутствующая в растворе. В табл. 2 первые 9 частиц одинаковы для всех исходных компонентов — цвиттер-иона, моно- и дианионов. Частицы нуклеотидов 10–12, которые находятся в равновесии в водном растворе, и образующиеся на поверхности (13, 14), различаются стехиометрией по протонам и величинами констант равновесия соответствующих реакций.

Реакции комплексообразования на поверхности и соответствующие им константы равновесия реакций могут быть записаны различным образом в зависимости от выбора исходной частицы.

Исходный компонент цвиттер-ион $H_2L^{\pm}$:



$$K_{IS}^{H_2L} = \frac{[\equiv TiOH_2^+ HL^-]}{[TiOH][H_2L^{\pm}]} \exp(F(\Psi_0 - \Psi_1)/RT), \quad (1)$$

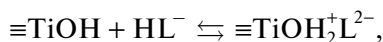


$$K_{2S}^{H_2L} = \frac{[\equiv TiOH_2^+ L^{2-}][H^+]}{[TiOH][H_2L^{\pm}]} \exp(F(\Psi_0 - 2\Psi_1)/RT). \quad (2)$$

Исходный компонент моноанион HL^- :

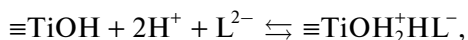


$$K_{IS}^{HL} = \frac{[\equiv TiOH_2^+ HL^-]}{[TiOH][H^+][HL^-]} \exp(F(\Psi_0 - \Psi_1)/RT), \quad (3)$$

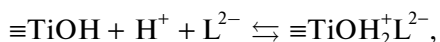


$$K_{2S}^{HL} = \frac{[\equiv TiOH_2^+ L^{2-}]}{[TiOH][HL^-]} \exp(F(\Psi_0 - 2\Psi_1)/RT). \quad (4)$$

Исходный компонент дианион L^{2-} :



$$K_{IS}^L = \frac{[\equiv TiOH_2^+ HL^-]}{[TiOH][H^+]^2[L^{2-}]} \exp(F(\Psi_0 - \Psi_1)/RT), \quad (5)$$



$$K_{2S}^L = \frac{[\equiv TiOH_2^+ L^{2-}]}{[TiOH][H^+][L^{2-}]} \exp(F(\Psi_0 - 2\Psi_1)/RT). \quad (6)$$

В уравнениях констант равновесия коэффициенты при значениях потенциалов (Ψ_0 и Ψ_1) соответствуют величинам зарядов в плоскостях 0 и 1. Заряд протонированной группы $\equiv TiOH_2^+$ в плоскости 0 равен +1, а заряд в плоскости 1 определяется зарядом частицы нуклеотида, которая образует адсорбционный комплекс: –1 или –2.

Так, образование комплекса с однозарядным анионом $\equiv TiOH_2^+ HL^-$ по уравнению (1) не сопровождается выделением или поглощением протона, по уравнению (3) один протон присоединяется к гидроксильной группе TiO_2 . Образование этого же комплекса по уравнению (5) требует присоединения 2 протонов, один из которых необходим для протонирования $TiOH$ -группы, а другой — для образования однозарядного аниона из двухзарядного. Аналогичные рассуждения можно привести для образования комплекса с двухзарядным анионом.

На рис. 2 приведены кривые зависимости адсорбции пуриновых нуклеотидов из водных растворов на поверхности TiO_2 от pH. Адсорбционные кривые исследованных пуриновых нуклеотидов различаются только в кислой области, выше pH 5 они практически совпадают. Это, по-видимому, связано с разной основностью атомов азота пуринового кольца и зарядом исходной частицы. Так, для ИМФ исходная частица — моноанион, для АМФ и ГМФ — цвиттер-ионные формы, различающиеся величинами констант депротонирования азотистых оснований. Наличие максимумов на адсорбционных кривых АМФ и ГМФ свидетельствует о том, что частицы с положительным зарядом на атоме азота пуринового кольца не адсорбируются на поверхности диоксида титана. Рост адсорбции наблюдается после значения pH, примерно соответствующего константе депротонирования. Уменьшение адсорбции всех нуклеотидов при pH > 6–7 можно объяснить отталкиванием одноименно заряженных анионов и ионизированных поверхностных групп. Вероятно, анионные формы нуклеотидов взаимодействуют с протонированными гидроксильными группами диоксида титана. При этом образуются внешнесферные комплексы, компоненты которых связаны электростатическими связями. Подтверждением этому может служить зависимость адсорбции ИМФ от ионной силы раствора (рис. 3). В кислой области проявляется конкуренция фосфат-анионов с анионами фонового электролита: чем больше концентрация последнего, тем меньше адсорбция фосфатных анионов. При увеличении pH адсорбция из растворов с высокой ионной силой становится больше по сравнению с адсорбцией из менее концентрированных растворов. По-видимому, это является следствием повышения концентрации протонированных групп с увеличением ионной силы раствора.

Константы равновесия всех реакций комплексообразования были определены по программе GRFIT, при работе которой эти величины подбираются таким образом, чтобы разница между экспериментальными и рассчитанными значениями была минимальной. В табл. 3 приведены констан-

Таблица 2. Матрица частиц, образующихся в системе $\text{TiO}_2\text{--AMФ--NaCl}$ (0.01 М)

	Частица	Компоненты							
		TiOH	exp0	exp1	Na^+	Cl^-	$\text{H}_2\text{L}^\pm$	H^+	$\lg K$
1	TiOH	1	0	0	0	0	0	0	0
2	TiOH_2^+	1	1	0	0	0	0	1	5.2
3	TiO^-	1	-1	0	0	0	0	-1	-7.8
4	$\text{TiOH}_2^+\text{Cl}^-$	1	1	-1	0	1	0	1	6.2
5	TiO^-Na^+	1	-1	1	1	0	0	-1	-6.8
6	Na^+	0	0	0	1	0	0	0	0
7	Cl^-	0	0	0	0	1	0	0	0
8	H^+	0	0	0	0	0	0	1	0
9	OH^-	0	0	0	0	0	0	-1	-13.92

Исходный компонент – цвиттер-ион $\text{H}_2\text{L}^\pm$

10	$\text{H}_2\text{L}^\pm$	0	0	0	0	0	1	0	0
11	HL^-	0	0	0	0	0	1	-1	-3.95
12	L^{2-}	0	0	0	0	0	1	-2	-10.42
13	$\text{TiOH}_2^+\text{HL}^-$	1	1	-1	0	0	1	0	
14	$\text{TiOH}_2^+\text{L}^{2-}$	1	1	-2	0	0	1	-1	

Исходный компонент – анион HL^-

		TiOH	exp0	exp1	Na^+	Cl^-	HL^-	H^+	$\lg K$
10	HL^-	0	0	0	0	0	1	0	0
11	$\text{H}_2\text{L}^\pm$	0	0	0	0	0	1	1	3.95
12	L^{2-}	0	0	0	0	0	1	-1	-6.47
13	$\text{TiOH}_2^+\text{HL}^-$	1	1	-1	0	0	1	1	
14	$\text{TiOH}_2^+\text{L}^{2-}$	1	1	-2	0	0	1	0	

Исходный компонент – дианион L^{2-}

		TiOH	exp0	exp1	Na^+	Cl^-	L^{2-}	H^+	$\lg K$
10	L^{2-}	0	0	0	0	0	1	0	0
11	HL^-	0	0	0	0	0	1	1	6.47
12	$\text{H}_2\text{L}^\pm$	0	0	0	0	0	1	2	10.42
13	$\text{TiOH}_2^+\text{HL}^-$	1	1	-1	0	0	1	2	
14	$\text{TiOH}_2^+\text{L}^{2-}$	1	1	-2	0	0	1	1	

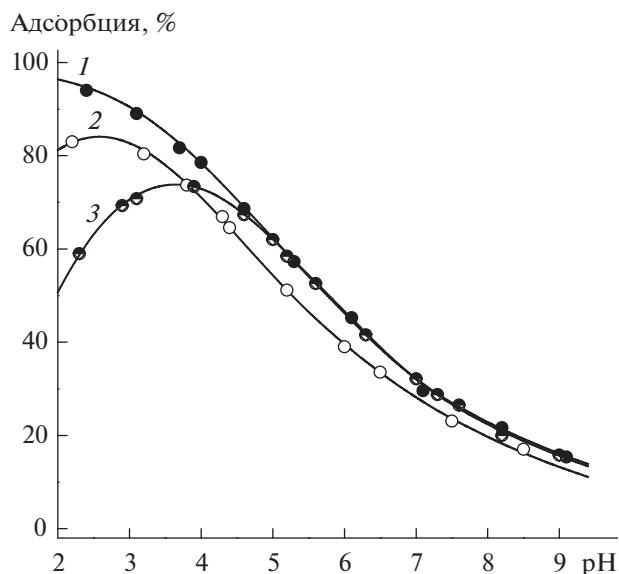
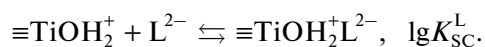
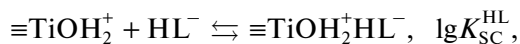


Рис. 2. Адсорбция ИМФ (1), ГМФ (2) и АМФ (3) на поверхности диоксида титана в зависимости от pH; $C_{\text{ПМФ}} = 0.1$ ммоль/л, $C_{\text{TiO}_2} = 1$ г/л, 0.01 M NaCl.

ты равновесия реакций образования комплексов АМФ по всем шести уравнениям реакций. Оказалось, что все эти константы могут быть пересчитаны в константы устойчивости комплексов с учетом констант равновесия реакций протонирования TiOH-групп диоксида титана и реакций ионизации/протонирования нуклеотида:



Константы устойчивости одного и того же комплекса, как и ожидалось, оказались одинаковыми: для однозарядного аниона АМФ $\lg K_{\text{SC}}^{\text{HL}} = 5.43 \pm 0.04$, для двухзарядного аниона $\lg K_{\text{SC}}^{\text{L}} = 6.60 \pm 0.02$, — поскольку они определяют

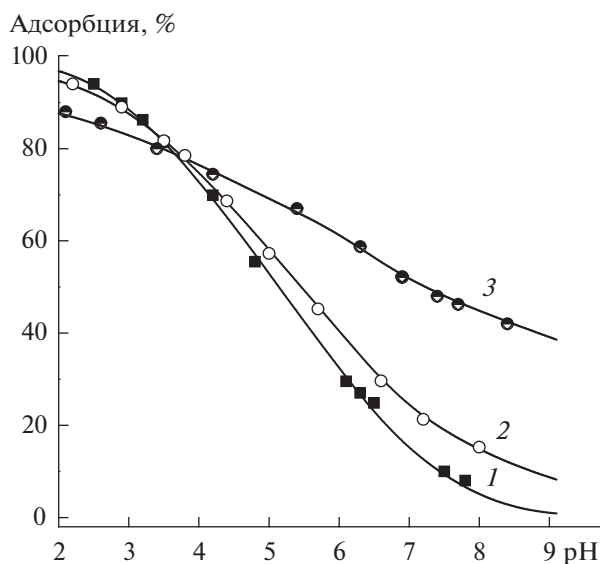


Рис. 3. Адсорбция ИМФ на поверхности диоксида титана в зависимости от pH при разной ионной силе раствора: 0.001 (1), 0.01 (2) и 0.1 M NaCl (3); $C_{\text{ИМФ}} = 0.1$ ммоль/л, $C_{\text{TiO}_2} = 1$ г/л.

Таблица 3. Константы равновесия реакций ($\lg K_{nS}$), рассчитанные для различных исходных компонентов (АМР), и константы устойчивости комплексов на поверхности ($\lg K_{SC}$)

Комплекс АМР на поверхности	Исходный компонент					
	$H_2L^{\pm}$		HL^{-}		L^{2-}	
	$\lg K_{nS}$	$\lg K_{SC}$	$\lg K_{nS}$	$\lg K_{SC}$	$\lg K_{nS}$	$\lg K_{SC}$
$TiOH_2^+HL^{-} (n = 1)$	6.67	5.43	10.60	5.40	17.13	5.47
$TiOH_2^+L^{2-} (n = 2)$	1.37	6.59	5.36	6.62	11.78	6.58

прочность связывания между одними и теми же частицами.

Выбранные реакции комплексообразования и рассчитанные для них константы равновесия позволяют воспроизвести адсорбционные кривые всех исследованных нуклеотидов (табл. 4). Константы устойчивости комплексов одного и того же типа для разных нуклеотидов примерно одинаковы: $\lg K_{SC}^{HL}$ комплексов с однозарядным анионом изменяется от 5.11 до 5.40, $\lg K_{SC}^L$ комплексов с двухзарядным анионом — от 6.18 до 6.60. Комплексы с двухзарядным анионом более устойчивы, чем комплексы с однозарядным анионом. Такая же закономерность наблюдается и для комплексных соединений неорганического фосфата с ионами некоторых переходных металлов: константы устойчивости комплексов ионов

меди $Cu(H_2PO_4)^+$ и $Cu(HPO_4)$ различаются на 2 порядка [14], а для ионов Fe(III) даже больше [15]. Влияние пуриновых оснований на устойчивость комплексов на поверхности невелико, что, по-видимому, связано с участием в адсорбционных взаимодействиях одинаковых для всех нуклеотидов фосфат-анионов. Сходство адсорбционных кривых пуриновых нуклеотидов и неорганического фосфата [9] служит подтверждением этого предположения.

На основании рассчитанных констант равновесия реакций были построены диаграммы распределения адсорбционных комплексов нуклеотидов на поверхности диоксида титана в зависимости от pH. На рис. 4 в качестве примера приведены диаграммы распределения комплексов ИМФ, образующихся на поверхности TiO_2 при адсорбции из растворов с различной концен-

Таблица 4. Константы равновесия реакций комплексообразования и константы устойчивости комплексов ИМФ и ГМФ

Ионная сила (NaCl, M)	ИМФ				ГМФ			
	$TiOH_2^+HL^{-}$		$TiOH_2^+L^{2-}$		$TiOH_2^+HL^{-}$		$TiOH_2^+L^{2-}$	
	$\lg K_{1S}$	$\lg K_{SC}$	$\lg K_{2S}$	$\lg K_{SC}$	$\lg K_{1S}$	$\lg K_{SC}$	$\lg K_{1S}$	$\lg K_{SC}$
0.1	10.38	5.18	5.20	6.19				
0.01	10.37	5.17	4.91	6.18	7.84	5.11	2.71	6.46
0.001	10.35	5.15	4.81	6.20				

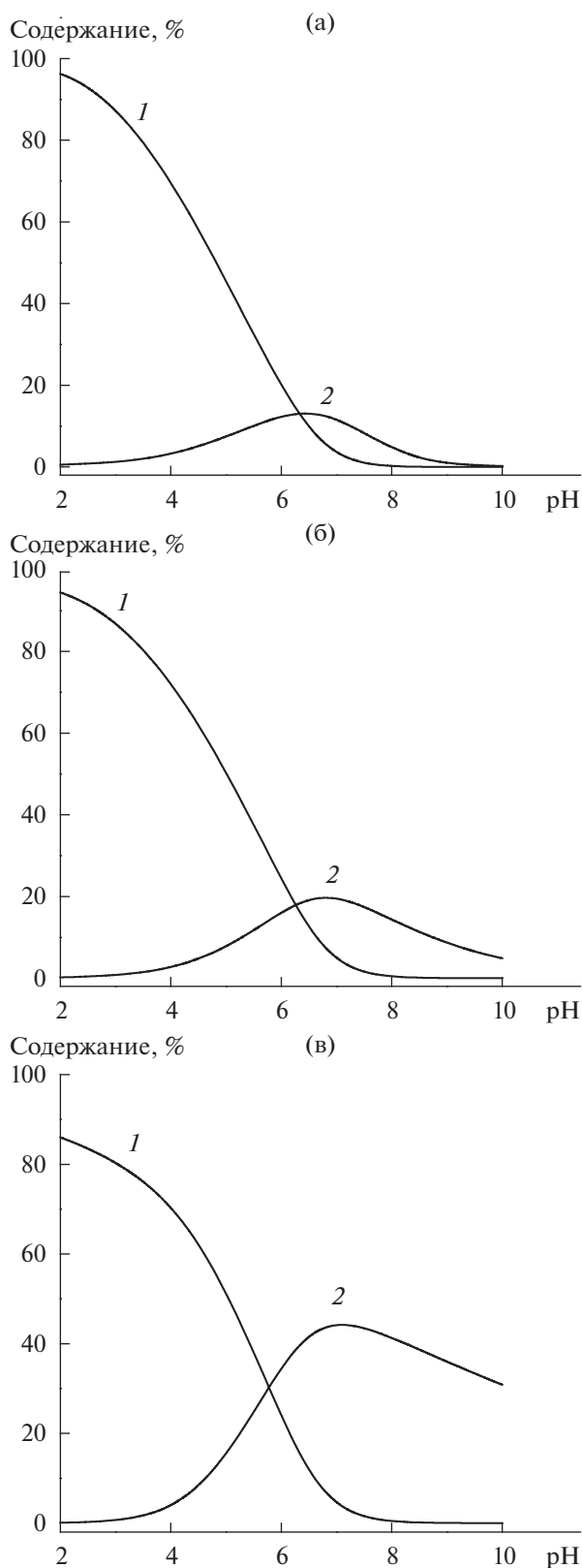


Рис. 4. Диаграммы распределения адсорбционных комплексов ИМФ $\equiv\text{TiOH}_2^+\text{HL}^-$ (1) и $\equiv\text{TiOH}_2^+\text{L}^{2-}$ (2) на поверхности диоксида титана в зависимости от pH при разной ионной силе раствора: 0.001 (а), 0.01 (б) и 0.1 М NaCl (в).

трацией фонового электролита. Следует отметить, что кривые, отражающие содержание различных комплексов, пересекаются при $\text{pH} > 6$. Эта величина соответствует константе ионизации однозарядного аниона, т.е. ионизация адсорбированного однозарядного аниона на поверхности происходит примерно при тех же значениях pH, что и в растворе.

Таким образом, установлено, что пуриновые нуклеотиды адсорбируются из водных растворов на поверхности диоксида титана с образованием устойчивых комплексов одно- и двухзарядных анионов. Можно предположить, что и нуклеиновые кислоты, в составе которых активные группы оснований заняты в образовании водородных связей, а фосфатные группы свободны, взаимодействуют с поверхностью диоксида титана с формированием подобных комплексов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moyano D.F., Rotello V.M. // *Langmuir*. 2011. V. 27. P. 10376.
2. Lee J., Mahendra S., Alvarez P.J.J. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 3580.
3. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. // *FASEB J*. 2005. V. 19. P. 311.
4. Fishre J., Egerton T.A. Titanium Compounds. In: *Inorganic Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: Wiley-Interscience, 2001.
5. Ai J., Biazar E., Jafarpour M. et al. // *Int. J. Nanomed*. 2011. V. 6. P. 1117.
6. Stark W.J. // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2011. V. 50. P. 1242.
7. Shemetov A.A., Nabiev I., Sukhanova A. // *ACS Nano*. 2012. V. 6. P. 5668.
8. Gagner J.E., Shrivastava S., Qian X. et al. // *J. Phys. Chem. Lett*. 2012. V. 3. P. 3149.
9. Власова Н.Н., Маркитан О.В. // *Коллоид. журн*. 2018. Т. 80. С. 379.
10. Smith R.M., Martell A.E., Chen Y. // *Pure Appl. Chem*. 1991. V. 63. P. 1015.
11. Westall J.C., Hohl H. // *Adv. Colloid Interface Sci*. 1980. V. 12. P. 265.
12. 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.
13. Власова Н.Н., Маркитан О.В., Головкова Л.П. // *Коллоид. журн*. 2015. Т. 77. С. 441.
14. Childs C.W. // *Inorg. Chem*. 1970. V. 9. P. 2465.
15. Galal-Gorchev H., Stumm W. // *J. Inorg. Nucl. Chem*. 1963. V. 25. P. 567.