

УДК 541.183.022

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛЕНОК С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Бабич О.О., Солдатова Л.С., Разумникова И.С., Просеков А.Ю.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, e-mail: irazumnikova@rambel.ru

Оптимизированы параметры получения монослоев с однонаправлено выровненными α -спиралями с содержанием стерильного компонента 30 мол.%. Устойчивые, трансферабельные монослои были получены с отношением переходов около единицы во всем диапазоне поверхностных давлений. При pH субфазы 8,6 протяженная связь C = O водородной связи карбоксильной группы при 1711 см^{-1} исчезает, и появляется полоса ионизированной карбоксильной группы при 1560 см^{-1} , свидетельствуя о том, что происходят изменения α -структуры. Спектры монослоев, приготовленных на чистой воде при pH субфазы 2, идентичны друг другу, проявляя характеристические полосы амида I и амида II при 1653 и 1548 см^{-1} .

Ключевые слова: квазиодномерные комплексы, метод Ленгмюра-Блоджетт, био- и иммуносенсоры, биологически активные соединения, физические и химические воздействия, ИК-спектр, полимеризация, α -спиральный диблок

USING LANGMUIR-BLODGETT FILMS TO GET TO DETERMINE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Babich O.O., Soldatova L.S., Razumnikova I.S., Prosekov A.Y.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo, e-mail: irazumnikova@rambel.ru

Optimized parameters of obtaining monolayers of unidirectionally aligned α -helices containing sterile component of 30 mol.%. Stable, transferable mono-layers were obtained from the ratio of transitions near one in the whole range of surface pressure-making. At pH 8,6 subphase longest bond C = O hydrogen bond of the carboxyl group at 1711 cm^{-1} disappears and a band of the ionized carboxyl group at 1560 cm^{-1} , suggesting that changes occur α -structure. The spectra of monolayers prepared on pure water subphase at pH 2, are identical to each other, showing the characteristic band of amide I and amide II at 1653 and 1548 cm^{-1} .

Keywords: dimensional complexes, Langmuir-Blodgett method, bio-and immunosensors, biologically active compounds, the physical and chemical effects, the IR spectrum, polymerization, α -helical diblock

Разработка экспрессных, точных и чувствительных вариантов определения биологически активных соединений – одна из актуальных задач современной аналитической химии. Исследования в этой области стимулируются потребностями медицины, пищевой промышленности, ветеринарии, необходимостью мониторинга окружающей среды [1].

Определение высоко- и низкомолекулярных биологически активных соединений представляет как практический, так и теоретический интерес для изучения их свойств, содержания в сыворотке крови и других матриксах, влияния на организм человека и животных, структуры синтезированных соединений и биохимических реакций с их участием. Биологически активные соединения, как и многие физиологически активные вещества, способны оказывать положительное или отрицательное воздействие на организм в зависимости от дозы и длительности воздействия. Кроме того, в связи с широким применением высокоэффективных биологически активных соединений в других областях

жизнедеятельности (например, в сельском хозяйстве) в воде и пищевых продуктах могут содержаться остатки этих препаратов в количествах, превышающих безопасный уровень. В связи с требованиями повышения качества жизни и увеличением поступлений фальсифицированной продукции на фармацевтический рынок, в последнее время необходимы разнообразные варианты количественного определения широкого круга биологически активных соединений, для оценки их качества, а также для определения их содержания в организме человека и животных [2].

Новейшие достижения в области создания био- и иммуносенсоров связаны с разработкой и получением новых функциональных материалов для физического трансдьюсера. Развиваются методы хемо- и биоселективного распознавания и связывания, а также эффективные методы микро- и наноструктурирования. Для электрохимических детекторов перспективным материалом являются тонкие пленки [3].

Среди тонких пленок в настоящее время особый интерес проявляется к проводящим пленкам Ленгмюра-Блоджетт на основе квазиодномерных комплексов с переносом заряда. Высокая проводимость пленок Ленгмюра-Блоджетт – необходимое условие их использования в качестве материалов в тонкопленочных структурах биосенсорных устройств [1].

В связи со всем вышесказанным настоящие исследования направлены на конструирование полипептидных монослоев с ориентированными α -спиралями, главным образом, с применением поверхностной графт-сополимеризации и техники Ленгмюра-Блоджетт. Метод Ленгмюра-Блоджетт позволяет получать монослой молекул на поверхности раздела фаз воздух-жидкость и жидкость-жидкость перед переходом на твердый субстрат.

При выполнении работы использовали общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследования биохимического и физико-химического анализа с использованием последних достижений науки и техники. Учет и обработку результатов проводили методами статистического и регрессионного анализа.

Термогравиметрический анализ

Термогравиметрический анализ проводили с использованием термогравиметрического анализатора Перкина-Эльмера при скорости нагревания $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ в атмосфере азота. Соотношение длин блоков (tBuLG)m-b-(MLGSLG)n определяется по формуле:

$$\frac{n}{m} = \frac{185,2 \cdot (30,27 - WL)}{214,1 \cdot WL},$$

с потерями массы на первом этапе WL , вызванных выделением изобутилена, начинающихся при 180°C и заканчивающихся при 250°C .

Элементный анализ

Элементный анализ осуществляли на анализаторе HEKAtech GmbH Euro-EA CHN. Соотношение длин блоков сополимера можно рассчитать по формуле:

$$\frac{\%C}{\%N}(1) - \frac{\%C}{\%N}(2) = \frac{24m}{7(m+n)},$$

(1): (tBuLG)m-b-(MLGSLG)n, (2): (LGA)m-b-(MLGSLG)n – после удаления третьютильной защитной группы TFA.

ИК-спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения с Фурье-преобразованием

ИК-спектроскопию нарушенного полного внутреннего отражения с Фурье-преобразованием осуществляли на спектрофотометре Bruker IFS88 FT-IR при разрешении 4 см^{-1} .

ИК-Фурье спектроскопия. ИК-Фурье спектроскопию на двусторонних поляризованных силиконовых субстратах осуществляли при разрешении 3 см^{-1} под вакуумом на спектрофотометре Bruker IFS66 V/S FT-IR.

В настоящем исследовании ставилась цель получить монослой с односторонне выровненными α -спиралями поли(γ -метил-L-глутамат-транс- γ -стерил-L-глутамата) с содержанием стерильного компонента 30 мол. % (PMLGCLG). Гидрофобное соединение PMLGCLG с жесткой структурой позволяет получить прочные пленки Ленгмюра-Блоджетт с высоко ориентированными α -спиралями, расположенными параллельно субстрату, с гибкими стерил-цепочками. Полиглутаматы проявляют лиотропные и термотропные свойства и получили широкое распространение в последние годы.

На рис. 1 представлены π -A-изотермы для (LGK)₆₃- β -(MLGCLG)₃₉ и (LGK)₅₉- β -(MLGCLG)₈₂, находящихся на поверхности воды при 20°C в сравнении с изотермами для PLLGK и PMLGCLG. Изотерма PLLGK, находящейся на поверхности чистой воды, похожа на изотерму, опубликованную для натриевой соли PLLGK при pH 3,0. PLLGK – это в некоторой степени активная поверхность, проявляющая переход при низком поверхностном давлении 5–7 мН/м. Как известно из литературных данных, изотерма PMLGCLG имеет крутой подъем давления вследствие упаковки α -спиралей на поверхности за счет жидко-конденсированной фазы. При последующем сжатии монослоя PMLGCLG наблюдается коллапс с переходом на плато при 33 мН/м. Изотермы диблок сополимеров PLLGK- β -PMLGCLG проявляют совершенно другое поведение. При сжатии сначала наблюдается переход, аналогичный изотерме PLLGK при тех же самых условиях детектирования, а затем происходит линейное увеличение поверхностного давления. Для (LGK)₅₉- β -(MLGCLG)₈₂ с более длинным гидрофобным блоком наблюдается другой переход выше 40 мН/м.

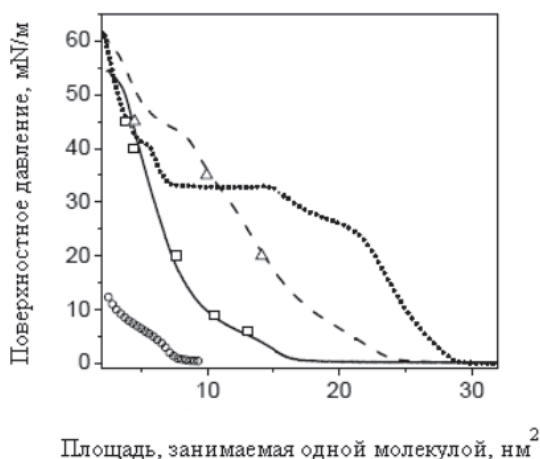


Рис. 1. π -A-изотерма $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ (сплошная линия), $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$ (сплюснутая линия), $(\text{MLGCLG})_{118}$ (пунктирная линия) и $(\text{ЛГК})_{63}$ (открытые циклы) на водной поверхности при 20°C

На рис. 2 представлены кривые стабилизации $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ и $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta$

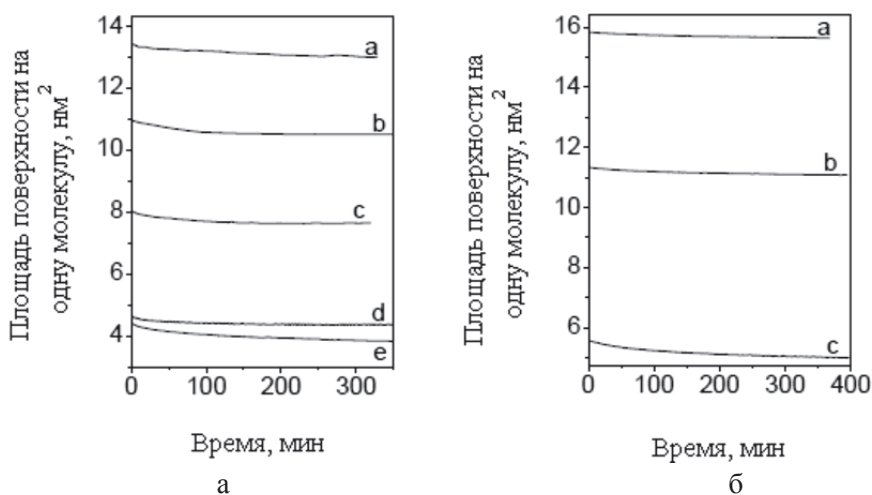


Рис. 2. а – кривые стабилизации $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ при 6 (а), 9 (b), 20 (c), 40 (d) и 45 (e) мН/м; б – кривые стабилизации $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$ при 20 (а), 35 (b) и 45 (c) мН/м

Результаты угловой микроскопии Брюстера получали в процессе сжатия-расширения на чистой водной поверхности при различных значениях рН субфазы (рис. 3–5). При распределении по чистой водной поверхности образуется монослойная область с водными промежутками. Давление уменьшает водные промежутки, и, как только возникает поверхностное давление, образуется гомогенный монослой. Для обоих ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ при величине давления 45–50 мН/м не зарегистрирован монослойный коллапс. При расширении монослой сначала разрушается, а затем возвращается в исходное состояние.

$(\text{MLGCLG})_{82}$, полученные при различных величинах поверхностного давления. Устойчивые, трансферабельные монослои были получены с отношением переходов около единицы во всем диапазоне поверхностных давлений.

Как следует из точек стабилизации, представленных на рис. 2, площади, занимаемые молекулами, в которых монослои стабилизируются в соответствии с π -A-изотермой, что свидетельствует об отсутствии эффектов релаксации. Только выше второго перехода на изотерме, записанной для $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$, т.е. при 45 мН/м, точка стабилизации сдвигается в область низких площадей. Это подразумевает, что переход, который может быть связан с перераспределениями цепей, является более медленным процессом. Хотя монослои стабилизируются при 45 мН/м, сдвиг пленки приводит к частичному переходу. Возможно, поэтому монослой в этом состоянии является неподвижным.

Сообщалось для поли (γ -бензил-Л-глутамата) (ПБЛГ) молекулы без внешнего давления агрегируются в 2D-островки толщиной в одну молекулу на водной поверхности. По сравнению с ПБЛГ, на чистой водной поверхности $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ образует намного более мелкие агрегаты (рис. 3). Это, вероятно, связано, с взаимодействиями между длинными гидрофильными блоками ПЛГК и водной поверхностью, что ограничивает множественные антипараллельные связи между молекулами. Таким образом, при увеличении активной поверхности диблок сополимеров либо снижением рН субфазы, либо повышением

DP_{PMLGSLG} образуется более агрегированный монослой (рис. 4 а, b, 5). Напротив, при высоком значении рН 8,6, когда ПЛГК полностью заряжен, агрегации не наблюдается

(рис. 4, с, d). Водная сольubilизация ПЛГК при этом рН приводит к молекулярной реориентации, препятствуя антипараллельным ориентациям спиралей.

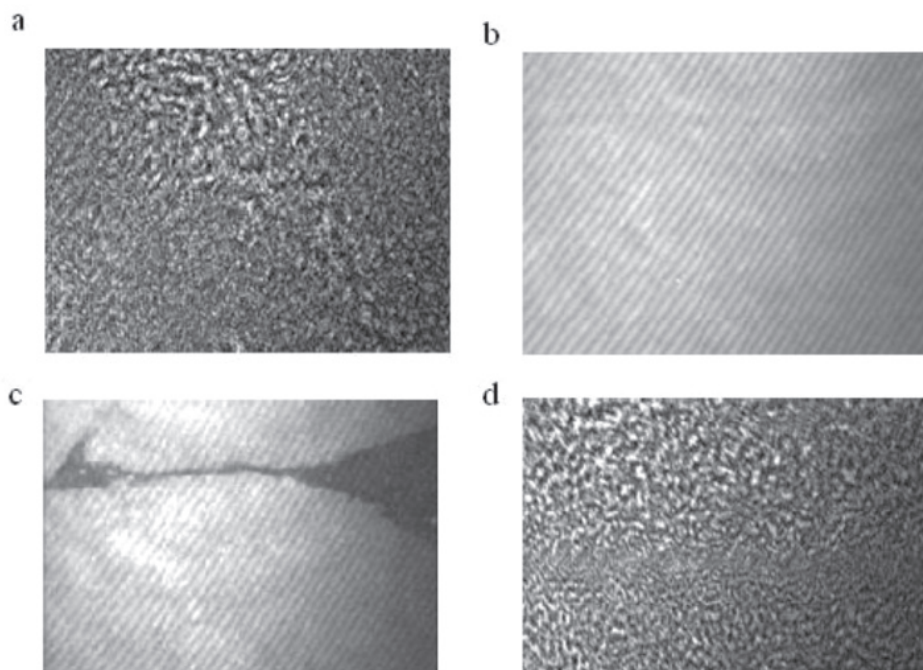


Рис. 3. Результаты угловой микроскопии Брюстера (420×522 мкм) $(LFG)_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLF)}_{39}$ при сжатии до 45 мН/м на чистой водной поверхности при 20°C , полученные при $A = 32$ (a) и 17 (b) $\text{нм}^2/\text{молекула}$. При соответствующем расширении изображения получали при $A = 17$ (a) и 32 (b) $\text{нм}^2/\text{молекула}$

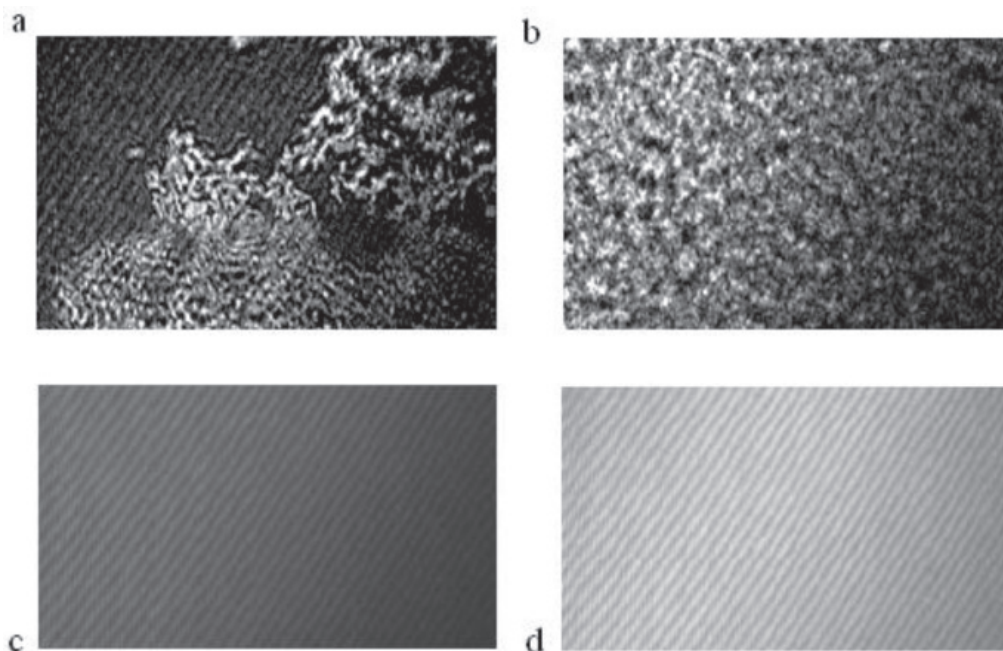


Рис. 4. Результаты угловой микроскопии Брюстера (420×522 мкм) $(LFG)_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLF)}_{39}$ при сжатии до 45 мН/м на чистой водной поверхности при 20°C , рН субфазы 2, полученные при $A = 32$ (a) и 25 (b) $\text{нм}^2/\text{молекула}$. При рН 8,6 изображения получены при $A = 30$ (a) и 12 (b) $\text{нм}^2/\text{молекула}$ во время сжатия

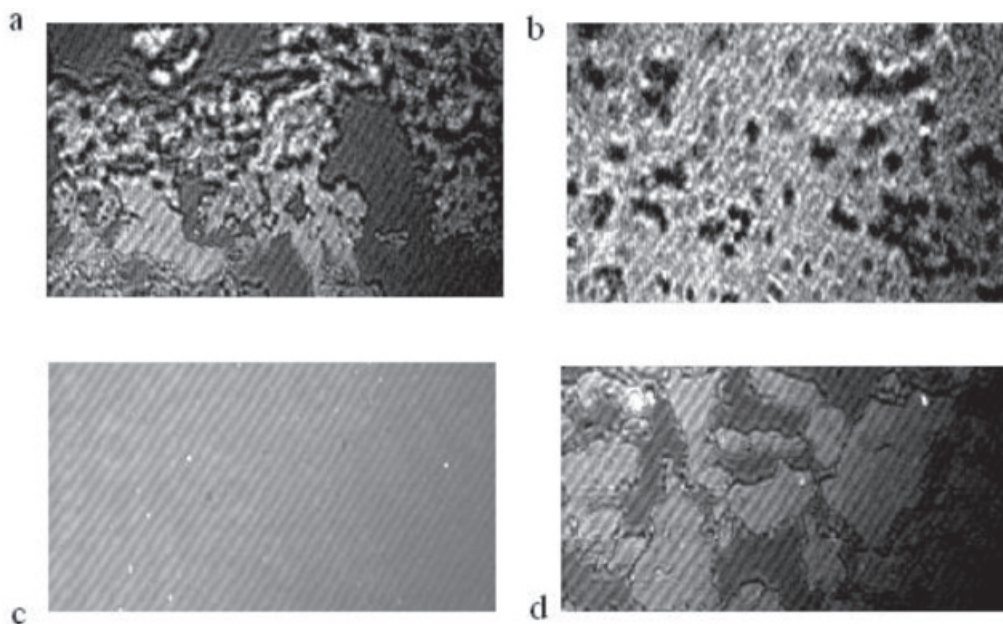


Рис. 5. Результаты угловой микроскопии Брюстера (420×522 мкм) $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta$ $(\text{МЛГСЛГ})_{82}$ при сжатии до 50 мН/м на чистой водной поверхности при 20°C , полученные при $A = 39$ (a) и 27 (b) и 23 (c) $\text{нм}^2/\text{молекула}$. При соответствующем расширении изображения получали при $A = 29$ (d) $\text{нм}^2/\text{молекула}$

Методом атомной силовой микроскопии показано, что получены гомогенные и однородные пленки Лэнгмюра-Блоджетт. На рис. 6 представлены типичные спектры, скорректированные с учетом линейного дихроизма, зарегистрированные в разных направлениях спектрополяриметра, для многослойных пленок Лэнгмюра-Блоджетт ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ. Эффект Лэнгмюра-Блоджетт вызван предпочтительной ори-

ентацией α -спиралей вдоль поверхности погружения. Скорректированные спектры анализировали в различных направлениях, сопоставляя друг с другом. В результате показано, что наблюдается один максимум при 191 нм и два минимума при 208 и 222 нм. Это свидетельствует о том, что полученные пленки ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ имеют правостороннюю α -спиральную структуру.

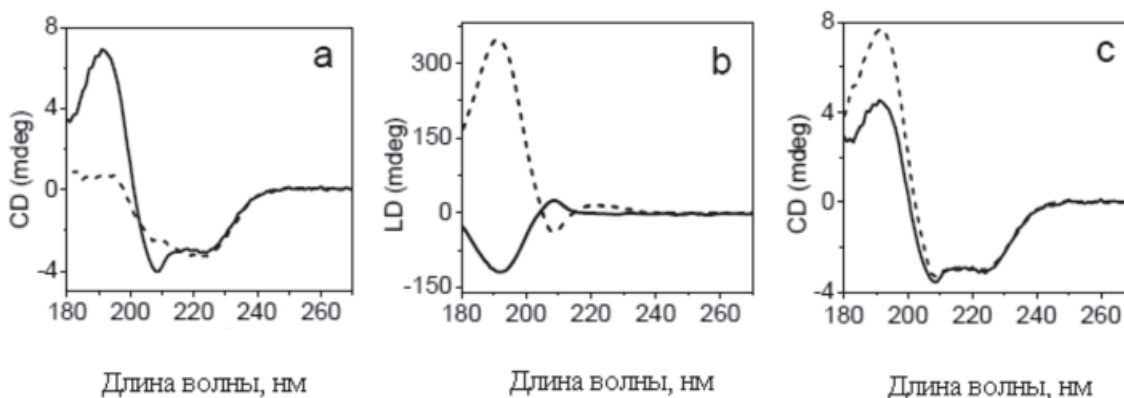


Рис. 6. CD-спектры, LD- спектры и скорректированные CD-спектры многослойной пленки Лэнгмюра-Блоджетт $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta$ - $(\text{МЛГСЛГ})_{39}$, записанные при 40 мН/м. Образец анализировался в двух разных направлениях: горизонтальном (сплошная линия) и вертикальном (пунктирная линия)

На рис. 7 представлены ИК-спектры монослоев Лэнгмюра-Блоджетт $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta$ - $(\text{МЛГСЛГ})_{39}$, полученные на чистой воде

при различных значениях pH. При pH суб-фазы $8,6$ протяженная связь $\text{C}=\text{O}$ водородной связи карбоксильной группы при

1711 cm^{-1} исчезает, и появляется полоса ионизованной карбоксильной группы при 1560 cm^{-1} , свидетельствуя о том, что происходят изменения α -структуры в блоке ПЛГК. Спектры монослоев, приготовленных на чистой воде при pH субфазы 2, идентичны друг другу, проявляя характеристические полосы амида I и амида II при 1653 и 1548 cm^{-1} . Отсюда следует, что, даже когда ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ расположен на поверхности чистой воды, преобладающей является α -структура.

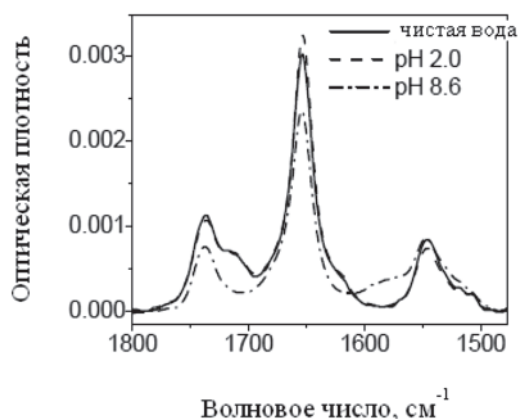


Рис. 7. ИК-спектр монослоев Лэнгмюра-Блоджетт (с обеих сторон силиконового субстрата) $(\text{PLGA})_{63}\text{-}\beta\text{-(PMLGLG)}_{39}$ записанный при 40 мН/м

Известно, что ПЛГК образует полностью α -спиральную структуру в водных

растворах при pH ниже 5,0. Его переход между α -спиральной и случайной конформациями происходит в области pH от 5,0 до 6,0, где содержание α -структуры составляет 80–70%. Преобладающая α -спиральная структура монослоя ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ на поверхности чистой воды частично является следствием того, что поверхность воды имеет более кислое значение pH (около 5,5), увеличиваясь при повышении содержания атмосферного CO_2 , диссоциируемого в субфазе. Исследования α -спиральных переходов ПЛГК в водных растворах, содержащих осмолиты, показали увеличение осмотического давления с преобладанием α -спиральных форм.

Таким образом, осмотическое давление внутри ПЛГК может увеличивать стабильность α -спиральной структуры.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», государственный контракт № 16.512.11.2220.

Список литературы

1. Карякин А.А. Биосенсоры: Устройство, классификация и функциональные характеристики // Сенсор. – 2002. – № 1. – С. 16–23.
2. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевые иммуносенсоры. Аналитические возможности и перспективы // Успехи химии. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 445–459.
3. Петрухин О.М. Сенсоры в аналитической химии // Российский Химический Журнал (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. 52. – № 2. – С. 3–6.