

УДК 541.183.022

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

Разумникова И.С., Бабич О.О., Солдатова Л.С.

ООО «Инновационно-исследовательский центр», Кемерово, e-mail: irazumnikova@rambler.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. Методом атомной силовой микроскопии показано, что получены однородные и однообразные пленки Ленгмюра-Блоджетт. Показано, что осмотическое давление внутри пленок может увеличивать стабильность α -спиральной структуры.

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

Razumnikova I.S., Babich O.O., Soldatova L.S.

Limited liability company «Innovative and research center»,
Kemerovo, e-mail: irazumnikova@rambler.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. By method of nuclear power microscopy it is shown that homogeneous and homogeneous Langmuir-Blodgett films are received. It is shown that osmotic pressure in films can increase stability α -helices structures.

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 [4].

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 хо-

зяйстве) 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 [5, 6].

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 [1].

Среди тонких пленок в настоящее время особый интерес проявляется к проводящим пленкам Ленгмюра-Блоджетт на основе ква-

зиодномерных комплексов с переносом заряда. Высокая проводимость пленок Ленгмюра-Блоджетт – необходимое условие их использования в качестве материалов в тонкопленочных структурах биосенсорных устройств [2, 3].

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.

Материалы и методы исследования

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 трет-бутильной 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 полированных силиконовых субстратах осуществляли при разрешении 3 см^{-1} под вакуумом на спектрофотометре Bruker IFS66 V/S FT-IR.

Результаты исследования и их обсуждение

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 $(\text{LGK})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ и $(\text{LGK})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$, находящихся на поверхности воды при 20°C , в сравнении с изотермами для ПЛГК и PMLGCLG. Изотерма ПЛГК, находящейся на поверхности чистой воды, похожа на изотерму, опубликованную для натриевой соли ПЛГК при pH 3,0. ПЛГК – 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 ПЛГК- β -PMLGCLG проявляют совершенно другое поведение. При сжатии сначала наблюдается переход, аналогичный изотерме ПЛГК при тех же самых условиях детектирования, а затем происходит линейное увеличение поверхностного давления. Для $(\text{LGK})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$ с более длинным гидрофобным блоком наблюдается другой переход выше 40 мН/м.

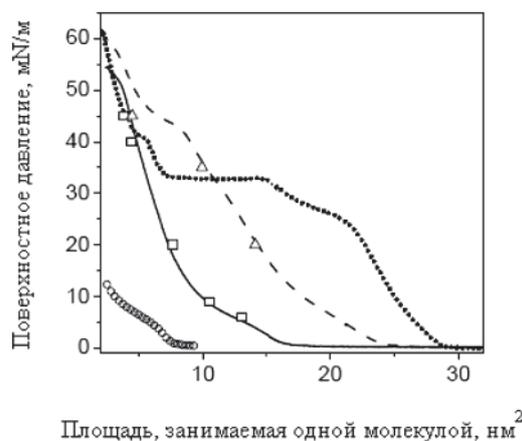


Рис. 1. π -A-изотерма $(\text{LGK})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ (сплошная линия), $(\text{LGK})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$ (сплюснутая линия), $(\text{MLGCLG})_{118}$ (пунктирная линия) и $(\text{LGK})_{63}$ (открытые циклы) на водной поверхности при 20°C

Первый переход при 5–10 мН/м относится к водной иммерсии блока ПЛГК. Следовательно, варьирование рН субфазы может влиять на переход. При высоких значениях рН распространение спиральных конформационных изменений блока ПЛГК приводит к ограничению поверхностного объема, вызванного расширением, что свидетельствует о низком поверхностном давлении даже при большом поверхностном объеме. При сжатии большое снижение по-

верхностного объема с небольшим увеличением поверхностного давления связано с поверхностной водной сольubilизацией блока ПЛГК при высоких значениях рН.

На рис. 2 представлены кривые стабилизации $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ и $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$, полученные при различных величинах поверхностного давления. Устойчивые, трансферабельные монослои были получены с отношением переходов около единицы во всем диапазоне поверхностных давлений.

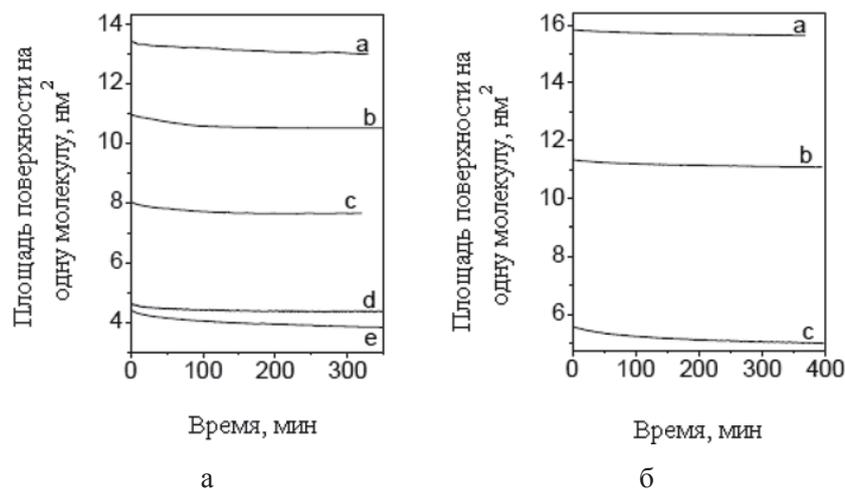


Рис. 2. а – кривые стабилизации $(\text{ЛГК})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ при 6 (а), 9 (б), 20 (с), 40 (д) и 45 (е) мН/м; б – кривые стабилизации $(\text{ЛГК})_{59}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{82}$ при 20 (а), 35 (б) и 45 (с) мН/м

Как следует из точек стабилизации, представленных на рис. 2, площади, занимаемые молекулами, в которых монослой стабилизируются в соответствии с π -А-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 перераспределением цепей, является более медленным процессом. Хотя монослой стабилизируются при 45 мН/м, сдвиг пленки приводит к частичному переходу. Возможно, поэтому монослой в этом состоянии является неподвижным.

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.

Сообщалось для поли (γ -бензил-L-глутамата) (ПБЛГ) молекулы без внешнего давления агрегируются в 2D-островки толщиной в одну молекулу на водной поверхности. По сравнению с PBLG, 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 $\text{DP}_{\text{PMLGSLG}}$, образуется более агрегированный монослой (рис. 4 а, б, 5). Напротив, при высоком значении рН 8,6, когда ПЛГК полностью заряжен, агрегации не наблюдается (рис. 4, с, д). Водная сольubilизация ПЛГК при этом рН приводит к молекулярной реориентации, препятствуя антипараллельным ориентациям спиралей.

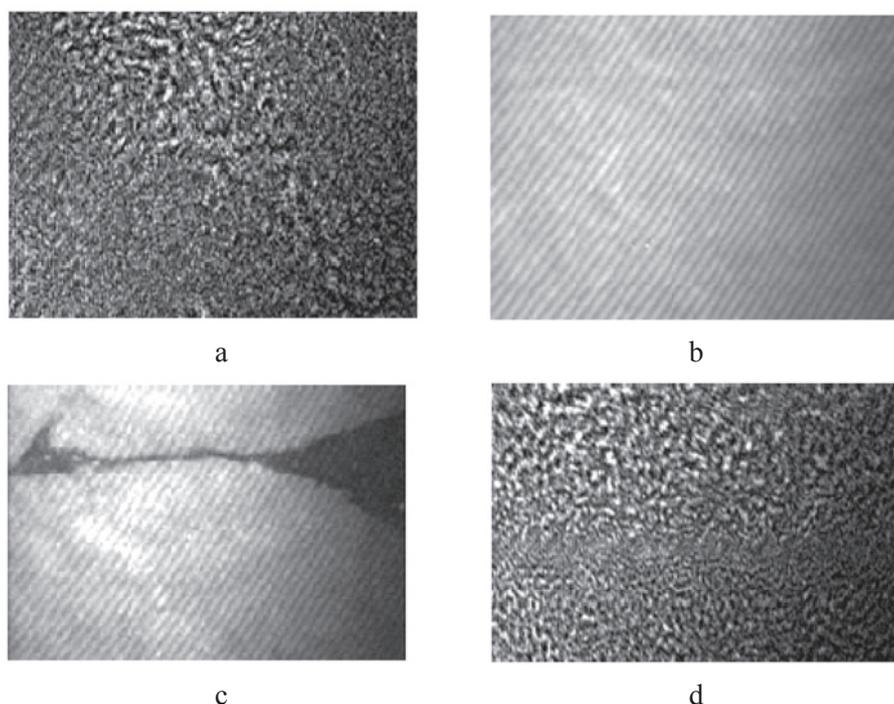


Рис. 3. Результаты угловой микроскопии Брюстера (420×522 мкм) $(LГК)_{63}\text{-}\beta\text{-(MLГСLГ)}_{39}$ при сжатии до 45 мН/м на чистой водной поверхности при 20°C , полученные при $A = 32$ (a) и 17 (b) $\text{нм}^2/\text{молекула}$. При соответствующем расширении изображения получали при $A = 17$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

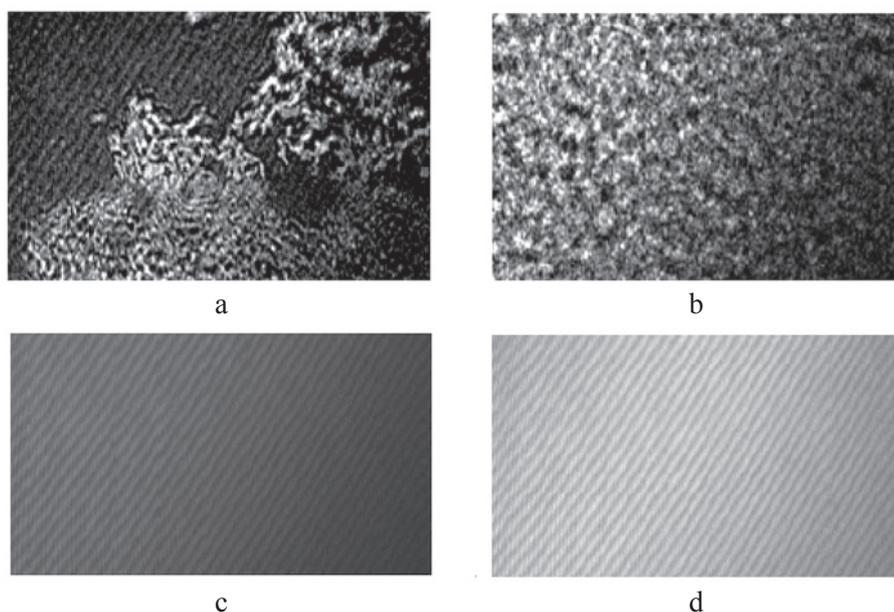


Рис. 4. Результаты угловой микроскопии Брюстера (420×522 мкм) $(LГК)_{63}\text{-}\beta\text{-(MLГСLГ)}_{39}$ при сжатии до 45 мН/м на чистой водной поверхности при 20°C , pH субфазы 2, полученные при $A = 32$ (a) и 25 (b) $\text{нм}^2/\text{молекула}$. При pH 8,6 изображения получены при $A = 30$ (a)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

Методом атомной силовой микроскопии показано, что получены гомогенные и однородные пленки Ленгмюра-Блоджетт. На рис. 6 представлены типичные спектры,

скорректированные с учетом линейного дихроизма, зарегистрированные в разных направлениях спектрополяриметра, для многослойных пленок Ленгмюра-Блоджетт

ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ. Эффект Ленгмюра-Блоджетт вызван предпочтительной ориентацией 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.

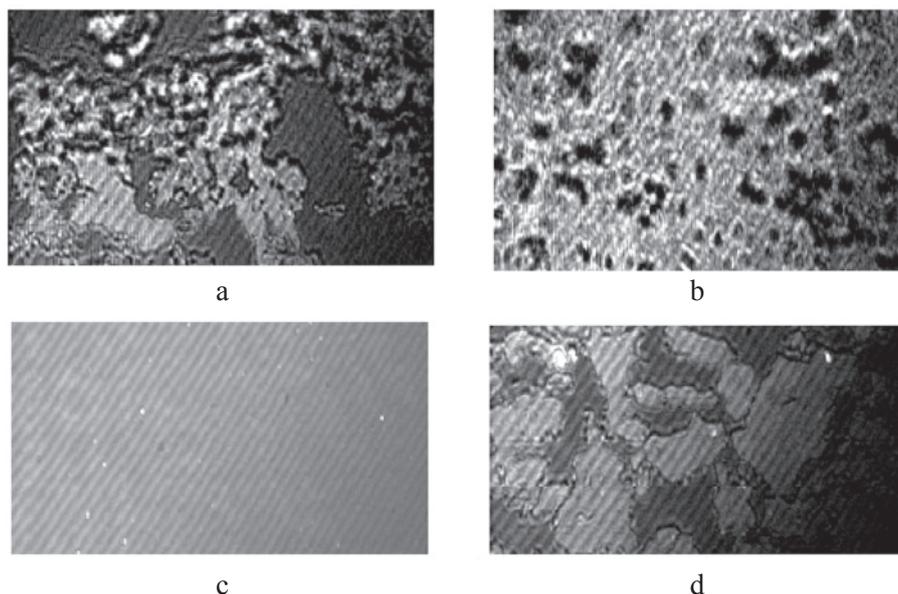


Рис. 5. Результаты угловой микроскопии Брюстера (420×522 мкм) (ЛГК) $_{59}$ - β (МЛГСЛГ) $_{82}$ при сжатии до 50 мН/м на чистой водной поверхности при 20 °С, полученные при $A = 39$ (a) и 27 (b) и 23 (c) нм²/молекула. При соответствующем расширении изображения получали при $A = 29$ (d) нм²/молекула

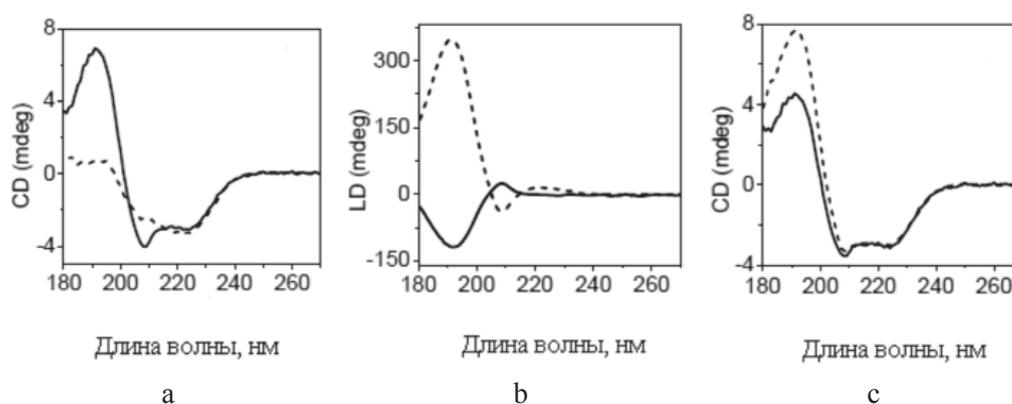


Рис. 6. CD-спектры, LD- спектры и скорректированные CD-спектры многослойной пленки Ленгмюра-Блоджетт (ЛГК) $_{63}$ - β -(МЛГСЛГ) $_{39}$, записанные при 40 мН/м. Образец анализировался в двух разных направлениях: горизонтальном (сплошная линия) и вертикальном (пунктирная линия)

На рис. 7 представлены ИК-спектры монослоев Ленгмюра-Блоджетт (ЛГК) $_{63}$ - β -(МЛГСЛГ) $_{39}$, полученные на чистой воде при различных значениях pH. 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 про-

исходят 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 см⁻¹. Отсюда следует, что даже когда ПЛГК- β -ПМЛГСЛГ расположен на поверхности чистой воды, преобладающей является α -структура.

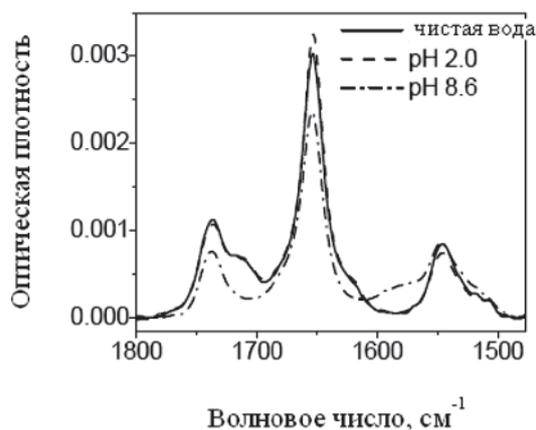


Рис. 7. ИК-спектр монослоев Ленгмюра-Блоджетт (с обеих сторон силиконового субстрата) $(\text{PLG})_{63}\text{-}\beta\text{-(MLGCLG)}_{39}$ записанный при 40 мН/м

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 «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (государственный контракт №16.512.11.2220).

Список литературы

1. Беляев В.В. Влияние заряженных поверхностных электронных состояний на структуру тонких пленок Ленг-

мюра-Блоджетт на поверхности полупроводников // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2002. – № 1. – С. 44–48.

2. Ермолаева Т.Н. Пьезокварцевые иммуносенсоры. Аналитические возможности и перспективы / Т.Н. Ермолаева, Е.Н. Калмыкова // Успехи химии. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 445–459.

3. Жавнерко Г.К. Пленки Ленгмюра-Блоджетт амфифильных полимеров // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии. VIII Международный семинар. Сборник докладов. – Минск: ИТМО НАН Беларуси, 2008. – С. 43–46.

4. Карякин А.А. Биосенсоры: Устройство, классификация и функциональные характеристики // Сенсор. – 2002. – №1. – С. 16–23.

5. Петрухин О. М. Сенсоры в аналитической химии // Российский химический журнал (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. 52, № 2. – С. 3–6.

6. Савин С.Б. Оптические химические сенсоры (микро и наносистемы) для анализа жидкостей // Российский химический журнал (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. 52, №2. – С. 7–16.

References

1. Belyaev, V.V. Influence of the charged superficial electronic conditions on structure of thin Langmuir-Blodgett films on a surface of semiconductors // the Messenger of the Moscow university. Series 3. Physics. Astronomy. 2002. no.1. pp. 44–48.

2. Yermolaeva, T.N. Pyezokvartsevye immunosensors. Analytical possibilities and prospects / T.N. Yermolaeva, E.N. Kalmykova // Successes of chemistry. 2006. T. 75. no.5. pp. 445–459.

3. Zhavnerko, G.K. Langmuir-Blodgett films of amfifilny polymers // Methodological aspects of scanning zondovy microscopy. VIII International seminar. Collection of reports. Minsk: ITMO NAN of Belarus, 2008. pp. 43–46.

4. Karyakin, A.A. Biosensor: Device, classification and functional characteristics // Sensor. no.1. 2002. pp. 16–23.

5. Petrukhin, O.M. Sensory in analytical chemistry // the Russian Chemical Magazine (ZhRHO of D.I.Mendelev). 2008. T. 52. no.2. pp. 3–6.

6. Savin, S.B. Optical chemical sensors (micro and nano-systems) for the analysis of liquids // the Russian Chemical Magazine (ZhRHO of D.I.Mendelev). 2008. T. 52. no.2. pp. 7–16.

Рецензенты:

Просеков А.Ю., д.т.н., профессор, проректор по НИР ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово;

Майоров А.А., д.т.н., профессор, директор ГНУ СибНИИС СО Россельхозакадемии, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 07.06.2012.