

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК-543.51.

МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛАКТОЗИ ТА N-АЦЕТИЛНЕЙРАМІНОВОЇ КИСЛОТИ, АДСОРБОВАНИХ НА ПОВЕРХНІ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ**Л.М. Ушакова, Б.Г. Місчанчук, Н.П. Галаган, В.О. Покровський, О.О. Чуйко**

Інститут хімії поверхні НАН України, вул. Генерала Наумова, 17, 03680, Україна, Київ-164

e-mail: ludomira@ukr.net

Надійшла до редакції 20 лютого 2012 року

Прийнята 13 березня 2012 року

Метою роботи було вивчення наноматеріалу на основі N-ацетилнейрамінової кислоти (NANA), адсорбованої на поверхні модифікованого лактозою кремнезему, а також компонентів одержаного матеріалу, за допомогою методу температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії (ТПД МС). Отримано ізотерму адсорбції NANA на поверхні модифікованого лактозою кремнезему ($A_{\max} \sim 0,6 \cdot 10^{-4}$ моль/г). Методом ТПД МС показано, що термічна деструкція NANA проходить в три стадії. Перша з них відповідає розриву N-C-зв'язку, тобто спостерігається від'єднання $\text{HNCH}_3\text{CO}-$ залишку з наступною його фрагментацією в іонізаційній камері мас-спектрометра. Стосовно другої і третьої стадій, зроблено припущення, що при термолізі іде перебудова шестичленного циклу в п'ятичлений. Термічний розклад отриманого наноматеріалу супроводжується утворенням таких саме фрагментів, як і у випадку лактози, але з відмінною температурною залежністю.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кремнезем, лактоза, N-ацетилнейрамінова кислота, адсорбція, температурно-програмована десорбційна мас-спектрометрія, термоліз, наноматеріали.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАКТОЗЫ И N-АЦЕТИЛНЕЙРАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, АДСОРБИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА**Л.М. Ушакова, Б.Г. Мисчанчук, Н.П. Галаган, В.О. Покровский, О.О. Чуйко***Институт химии поверхности НАН Украины, ул. Генерала Наумова, 17, 03680, Украина, Киев-164*

Целью работы было изучение наноматериала на основании N-ацетилнейраминовой кислоты (NANA), адсорбированной на поверхности модифицированного лактозой кремнезема, а также компонент полученного материала, с помощью метода температурно-программированной десорбционной масс-спектрометрии (ТПД МС). Получено изотерму адсорбции NANA на поверхности модифицированного лактозой кремнезема ($A_{\max} \sim 0,6 \cdot 10^{-4}$ моль/г). Методом ТПД МС показано, что термическая деструкция NANA проходит в три стадии. Первая из них соответствует разрыву NC-связи, то есть наблюдается отщепление $\text{HNCH}_3\text{CO}-$ остатка с дальнейшей его фрагментацией в ионизационной камере масс-спектрометра. Относительно второй и третьей стадии сделано предположение, что при термоллизе идет преобразование шестичленного цикла в пятичленный. Термическое разложение полученного наноматериала сопровождается образованием таких же фрагментов, как и в случае лактозы, но с иной температурной зависимостью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кремнезем, лактоза, N-ацетилнейраминная кислота, адсорбция, температурно-программированная десорбционная масс-спектрометрия, термоллиз, наноматериалы.

MASS SPECTROMETRIC STUDY OF LACTOSE AND N-ACETILNEURAMINIC ACID ADSORBED ON THE ULTRAFINE SILICA SURFACE**L.M. Ushakova, B.G. Mischanchuk, N.P. Galagan, V.O. Pokrovskij, O.O. Chujko***Institute of surface chemistry NASU, 17 Generala Naumova St., Kiev 03680, Ukraine*

The aim of the study was investigation of nanomaterials based on N-acetylneuraminic acid (NANA) adsorbed on ultrafine silica surface modified by lactose and also of components of synthesized nanomaterial by means of temperature programmed desorption mass spectrometry. The isotherm of adsorption of NANA on silica surface modified by lactose was obtained ($A_{\max} \sim 0,6 \cdot 10^{-5}$ mole/g). It was shown by TPD MS method that thermal decomposition of NANA occurred in three stages. The first one starts with rupture of NC bond, resulting in formation of $\text{HNCH}_3\text{CO}-$ fragment, with consequent fragmentation in the ionization chamber of mass spectrometer. As for second and third stages, the assumption is proposed that thermolysis occurs through rearrangement of six-link cycle into five-link one. Thermal decomposition of synthesized nanomaterial results in appearance the same components of mass spectra which are characteristic for lactose, but with different temperature dependencies.

KEY WORDS: silica, lactose, N-acetylneuraminic acid, adsorption, temperature programmed desorption mass spectrometry, thermolysis, nanomaterials.

Створення нових наноматеріалів для біологічних систем базується на вивченні процесів, що відбуваються на межі розділу фаз: наночастка – клітина або біомолекула [1]. Високодисперсний кремнезем, використаний в нашій роботі як вихідний носій при виготовленні наноматеріалів, має цілий ряд переваг перед іншими носіями завдяки своїм фізико-хімічними властивостям та особливостям при взаємодії з клітинами [2]. Поверхня такого кремнезему вкрита гідроксильними групами, що в певних умовах можуть бути заміщені на інші функціональні групи, які можуть служити центрами адсорбції біомолекул [3]. А клітинна поверхня складається, головним чином, із олігосахаридних фрагментів глікопротеїнів або гліколіпідів, які утворюють рецепторну систему клітини [4]. Серед вуглеводів, що є складовими даних фрагментів, особливе місце займає N-ацетилнейрамінова кислота (NANA) [5], яка задає властивості клітинової поверхні [6].

Метою даної роботи було вивчення методом температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії (ТПД МС) [7] особливостей термолізу NANA в конденсованому стані та особливостей термолізу NANA, адсорбованої на поверхні кремнезему, модифікованої лактозою.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Наноматеріал одержували, використовуючи методи адсорбційного модифікування поверхні неорганічного носія біомолекулами [8]. Для проведення адсорбції брали високодисперсний кремнезем ($S_{\text{пит}}=300\text{г/м}^2$) (м. Калуш, Івано-Франківська обл.), розчини лактози (інтервал концентрацій $c=0,25\text{-}2,5$ ммоль/л) (USA, Sigma) та NANA ($c=0,031\text{-}1$ ммоль/л) (USA, Sigma). Відношення адсорбент-адсорбат становило 0,1:10 за масою. Кількість лактози в водному розчині розраховували за допомогою реакції сахарів із молібденовим реактивом [9], кількість NANA – за допомогою періодат-тіобарбітурового методу [10]. Термічну деструкцію адсорбційного шару одержаного наноматеріалу вивчали методом ТПД МС [7, 11]. Обладнання для температурно-програмованої десорбційної мас-спектрометрії включає однополярний квадрупольний мас-аналізатор МХ-7304А (Суми, Україна) з іонізацією електронним ударом, вакуумну систему на основі насосу НМД 0.16-1, точний терморегулятор з підігрівальним елементом РІФ-101, кварцево-молібденову трубку для зразків та комп'ютерну систему реєстрації спектрів. Діапазон мас 1 - 400 а.о.м., чутливість - 10^{-8}г . Швидкість підвищення температури в дослідженнях становила 1°C/хв . Весь процес ТПД МС експерименту відбувався у вакуумі. При дослідженні зразки піддавалися дії температури, що змінювалась за лінійним законом. Леткі продукти термічного розкладу та термічної десорбції, що виділялись із зразку під дією температури, реєструвались та досліджувались за допомогою мас-спектрометра.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що N-ацетилнейрамінова кислота не адсорбується на поверхні високодисперсного кремнезему [12]. Це, ймовірно, пов'язано із особливостями як самої поверхні кремнезему [13], так і молекули NANA [5]. Поверхні кремнезему, в дослідженому інтервалі рН, притаманний негативний заряд, а NANA являється цвітгеріоном і при використаному значенні рН (5,0) також негативно заряджена. Тому була здійснена спроба надати поверхні носія позитивний заряд за допомогою лактози. Структурні формули лактози та NANA наведені на рис. 1. а, б відповідно [13].

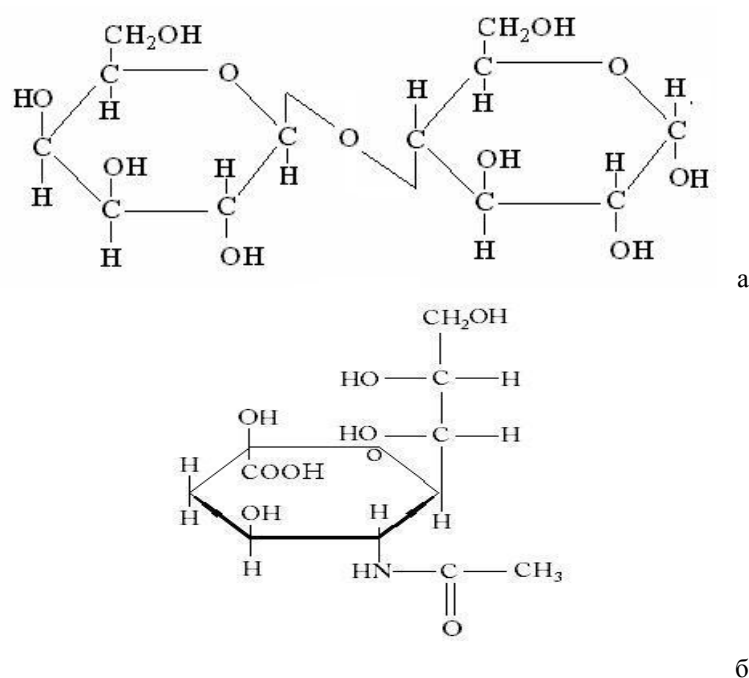


Рис. 1. Структурні формули лактози (а) та NANA (б)

На рис. 2. наведено ізотерму адсорбції лактози на поверхні кремнезему (2.а) та ізотерму поступової адсорбції N-ацетилнейрамінової кислоти на модифікованій лактозою поверхні кремнезему (рН=5,0) (2.б). Згідно класифікації Гільса [14] вони відповідають L- та S-типу, що узгоджується із літературними даними [15]. Значення граничної адсорбції, визначене графічним методом дорівнює $A_{\max} = 0,18 \cdot 10^{-4}$ моль/г для лактози, адсорбованої на поверхні кремнезему, і $A_{\max} \sim 0,6 \cdot 10^{-4}$ моль/г – для NANA на модифікованій поверхні кремнезему.

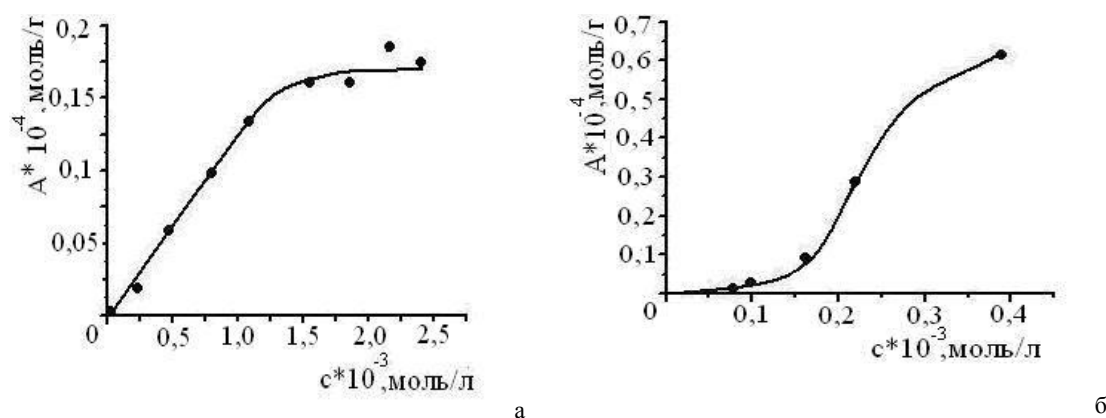


Рис. 2. Ізотерми адсорбції лактози на поверхні кремнезему (а) та N-ацетилнейрамінової кислоти на модифікованій лактозою поверхні кремнезему (б)

Термодеструкцію адсорбційного шару отриманого препарату досліджували за допомогою методу ТПД МС.

На рис. 3 представлені результати термолізу NANA в конденсованому (кристалічному) стані, який проходить в три стадії за температурним інтервалом.

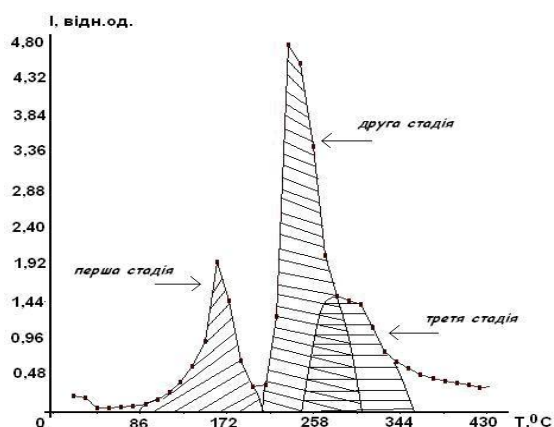


Рис. 3. Три стадії термолізу NANA в конденсованому (кристалічному) стані за температурним інтервалом.

Перша з них відповідає від'єднанню HNCH_3CO -залишку (58 а.о.м) (на рисунках тут і далі в тексті надписи над лініями – маси іонів) від піранозного кільця (розривається $\text{HN} - \text{C}$ - зв'язок) (рис. 4.а), про що свідчить поява лінії 15 а.о.м, (температурний інтервал $\sim 170^\circ\text{C}$). Подальша його фрагментація в іонізаційній камері мас-спектрометра, здійснюється в три етапи. На першому спостерігаємо від'єднання карбонільної групи ($\text{C}=\text{O}$) (28 а.о.м), що викликає глибоку деструкцію фрагменту, який містить CH_3 -групу (43 а.о.м.) (рис. 4.б), (температурний інтервал $\sim 170 \div 250^\circ\text{C}$).

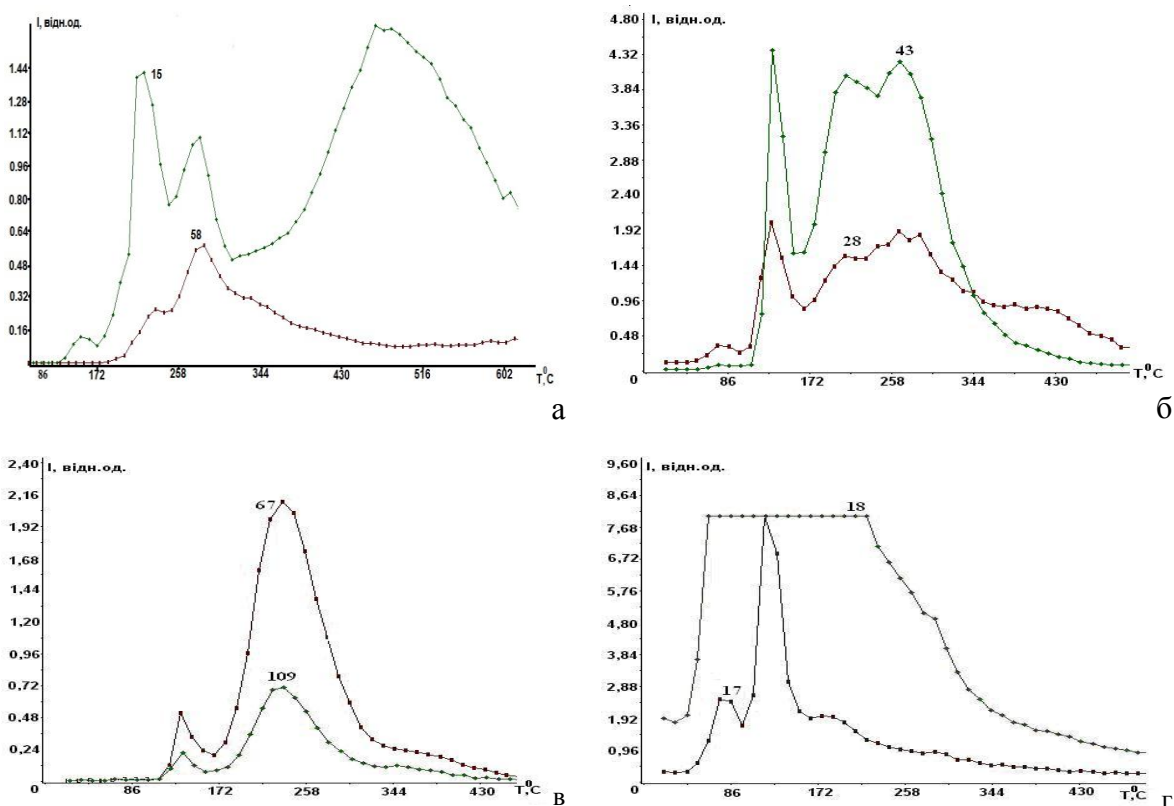


Рис. 4. Термоліз NANA за даними ТПД МС. Від'єднання HNCH_3CO -залишку від піранозного кільця (а), від'єднання та деструкція фрагменту, що містить CH_3 -групу (б), від'єднання залишку, що містить CH_2OH -групу та перебудова шестичленного циклу в п'ятичленний (в) та видалення, іонізація та фрагментація води (г)

Стосовно другої і третьої стадій, слід припустити, що спочатку від'єднується залишок, який містить CH_2OH -групу, захоплюючи разом з собою молекулу води (рис. 4.г), а фрагмент з 67 а.о.м відповідає ймовірному від'єднанню кільця у високотемпературній області (рис. 4.в). Ми припускаємо, що в процесі термолізу відбувається перебудова шестичленного циклу в п'ятичлений. Можливо, що 67 а.о.м. є фрагментом 109 а.о.м., (температурний інтервал $\sim 250^\circ\text{C}$). Схематично продукти термолізу NANA приведено на рис. 5.



Рис. 5. Фрагменти NANA, які утворюються на трьох етапах її термічного розкладу

Відносно ліній 17, 18 а.о.м. немає сумніву щодо видалення води із зразку, її подальшої іонізації і фрагментації згідно схеми $\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{H} + \text{OH}^+$ (рис. 4.г). Це пояснює аналогічну температурну залежність цих термодесорбційних кривих.

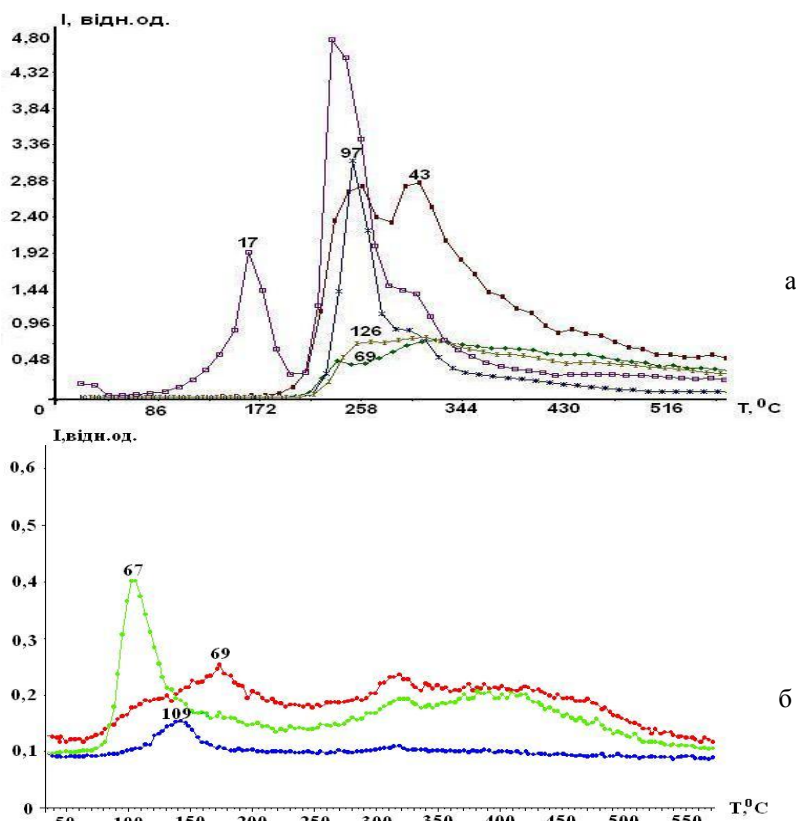


Рис. 6. Термограми розкладу лактози в конденсованому стані (а); наноматеріалу, одержаного за допомогою послідовної адсорбції компонентів (б)

Що стосується лактози в конденсованому стані (рис. 6.а), то перший максимум 17 а.о.м при 170⁰С характеризує процес її дегідратації, що узгоджується з літературними даними [15]. Для композиту з участю лактози цей максимум дещо згладжується і зміщується в бік високих температур, вірогідно за рахунок адсорбційної взаємодії молекул води з поверхнею носія. Другий і третій максимуми 17 а.о.м ми інтерпретуємо як термоліз залишків лактози на поверхні.

Порівняння термограм нанокompозиту лактоза-NANA (рис. 6.б) з результатами, наведеними на рис. 4 для термолізу NANA, введеної в склад нанокompозиту, вказують на те, що механізм термолізу радикально змінюється за рахунок взаємодії з лактозою.

Нажаль, мас-спектрометричних даних недостатньо для встановлення деталей термічної деструкції одержаних нанокompозитів на основі лактози і NANA. Втім, ми маємо надію що подальші дослідження дозволять оптимізувати склад і структуру нанокompозитів на основі сахарів та кремнезему, оскільки в нашому випадку вони продемонстрували багатообіцяючі властивості при визначенні біологічної активності синтезованих нанокompозитів [16].

ВИСНОВКИ

- Здійснено модифікування поверхні високодисперсного кремнезему молекулами лактози та N-ацетилнейрамінової кислоти з використанням методу рівноважної адсорбції.
- Вивчено процес термічного розкладу одержаного наноматеріалу методом ТПД МС.
- Встановлено, що при термічній деструкції наноматеріалу, одержаного за допомогою попередньої модифікації поверхні кремнезему лактозою, спостерігаються термодесорбційні лінії 67, 69 та 109 а.о.м, які характерні для лактози та NANA в конденсованому стані.
- Встановлено, що термічний розклад досліджуваних препаратів в конденсованому стані проходить в три стадії та супроводжується утворенням п'ятичленного циклу у випадку NANA.

Автори висловлюють подяку Українському науково-технологічному центру за фінансову підтримку (проект №3103).

ЛІТЕРАТУРА

1. Kasemo B. Biological surface science / B. Kasemo // Surface Science. – 2002. – V. 500. – P. 656–677.
2. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наукова думка, 2003. – 415 с. /Medicinskaja himija i klinicheskoe primenenie dioksida kremnija / Pod red. A.A. Chujko. – K.: Naukova dumka, 2003. – 415 s./
3. Кремнеземы в биологии и медицине / Сборник научных трудов под редакцией академика АН Украины А.А. Чуйко. – Киев – Ставрополь. – 1993. – 259 с. /Kremnezemy v biologii i medicine // Sbornik nauchnyh trudov pod redakciej akademika AN Ukrainy A. A. Chujko. – Kiev – Stavropol'. – 1993. – 259 s./
4. Галаган Н. П. Клеточная поверхность и ее роль в контактных взаимодействиях с высокодисперсным кремнеземом // В сб. “Кремнеземы в медицине и биологии”/ Под редакцией А. А. Чуйко. – Киев – Ставрополь. – 1993. – С. 212-233. /Galagan N. P. Kletocchnaja poverhnost' i ee rol' v kontaktnyh vzaimodejstvijah s vysokodispersnym kremnezemom // V sb. “Kremnezemy v medicine i biologii”/ Pod redakciej A. A. Chujko. – Kiev – Stavropol'. – 1993. – S. 212-233./
5. Rozenberg A. Biology of the Sialic Acid / A. Rozenberg // Plenum: New York. – 1995. – P. 7-50.
6. Овчинников Ю.Н. Биоорганическая химия / Ю.Н. Овчинников – М.: Просвещение. – 1987. – 815 с. /Ovchinnikov Ju.N. Bioorganicheskaja himija / Ju.N. Ovchinnikov – M.: Prosveshhenie. – 1987. – 815 s./
7. Покровский В.А. Температурно-программированная десорбционная масс-спектрометрия и особенности неизотермических реакций на поверхности дисперсных твердых тел // Химия поверхности кремнезема / В.А. Покровский, А.А. Чуйко; [Под ред. Чуйко А.А.]. – Киев. – 2001. – Ч. 1. – С. 79-116. /Pokrovskij V.A. Temperaturno-programmirovannaja desorbcionnaja mass-spektrometrija i

- osobnosti neizotermicheskikh reakcij na poverznosti dispersnyh tverdyh tel // Himija poverhnosti kremnezema / V.A. Pokrovskij, A.A. Chujko; [Pod red. Chujko A.A.]. – Kiev. – 2001. – Ch. 1. – S. 79-116./
8. Айвазов Б.В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции / Б.В. Айвазов. – Москва: Высшая школа. – 1973. – 206 с. /Ajvazov B.V. Praktikum po himii poverhnostnyh javlenij i adsorbicii / B.V. Ajvazov. – Moskva: Vysshaja shkola. – 1973. – 206 s./
 9. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починок. – Киев: Наукова думка. – 1976. – 334 с. /Pochinok H.N. Metody biohimicheskogo analiza rastenij / H.N. Pochinok. – Kiev: Naukova dumka. – 1976. – 334 s./
 10. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград: изд-во ЛГУ. – 1982. – 272 с. /Metody biohimicheskij issledovanij (lipidnyj i jenergeticheskij obmen) / Pod red. M. I. Prohorovoj. – Leningrad: izd-vo LGU. – 1982. – 272 s./
 11. Кулик Т.В. Молекулярна самоорганізація в системах нанорозмірні частинки-вуглеводи / Т.В. Кулик, Б.Б. Паляниця, Н.П. Галаган // Сб. Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології. – К.: – 2003. – Т.1. – №2. – С. 681-690. /Kulik T.V. Molekuljarna samoorganizacija v sistemah nanorozmirmi chastinki-vuglevodi / T.V. Kulik, B.B. Paljanicja, N.P. Galagan // Sb. Nanosistemi, nanomateriali, nanotehnologii. – K.: – 2003. – T.1. – №2. – S. 681-690./
 12. Химия поверхности кремнезема / Под редакцией Чуйко А.А. – Киев. – 2001. – Т.1. – Ч.1. – 735 с. /Himija poverhnosti kremnezema / Pod redakciej Chujko A.A. – Kiev. – 2001. – T.1. – Ch.1. – 735 s./
 13. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём. – *Пер. с нем.* – М: Мир. – 2000. – 469с. /Kol'man Ja. Nagljadnaja biohimija / Ja. Kol'man, K.-G. Rjom. – Per. s nem. – M: Mir. – 2000. – 469s./
 14. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / Под ред. Парфита Г., Рочестера К. – М.: Мир. – 1986. – 227 с. /Adsorbicija iz rastvorov na poverhnosti tverdyh tel / Pod red. Parfita G., Rochester K. – M: Mir. – 1986. – 227 s./
 15. Adsorption and Mass spectrometry of thermal decomposition of Lactose on silica surface / T.V. Kulik, B.B. Palyanutsya, I.I. Petrusyevych, [et al.] // VIII Polish-Ukrainian Symposium on Theoretical and Experimental Studies of Interfacial Phenomena and their Technological Applications. Odessa. – September 19-24. – 2004. – P. 170-172.
 16. Leavell M.D. Stabilization and linkage analysis of metal-ligated Sialic Acid containing oligosaccharides / M.D. Leavell, J.A. Leary // Journal of the mass spectrometry. – V 12., № 5. – P. 528-536.
 17. Нанокompозити на основі високодисперсного кремнезему і біомолекул та їх термічні перетворення / Н.П. Галаган, Л.М. Патеї, Н.С. Настасієнко, [та ін.] // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології : Зб. наук. пр. — 2006. — № 4, вип. 3. — С. 599-612. /Nanokompoziti na osnovi visokodispersnogo kremnezemu i biomolekul ta ih termichni peretvorennya / N.P. Galagan, L.M. Patej, N.S. Nastasienko, [ta in.] // Nanosistemi, nanomateriali, nanotehnologii : Zb. nauk. pr. — 2006. — № 4, vip. 3. — S. 599-612./