

ПРОЦЕССЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ДИПОЛЬНОЙ РЕЛАКСАЦИИ В СИСТЕМАХ БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН–НАНООКСИД–ВОДА

В.М. Гунько, В.И. Зарко, Е.В. Гончарук, Н.Ю. Клименко, Н.П. Галаган

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова 17, Киев-164, Украина

Методом термостимулированной деполяризации проведены сравнительные исследования процессов низкотемпературной дипольной релаксации в замороженных водных дисперсиях наноксидов, индивидуальных и в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для последних систем характерно увеличение вкладов релаксационных процессов при $T > 160\text{--}170\text{ K}$, в то время как для водных дисперсий оксидов большие токи ТСД наблюдаются при $T < 160\text{--}170\text{ K}$. Это отличие обусловлено участием молекул БСА – полярных связей, групп, фрагментов и целых макромолекул – в релаксационных процессах, особенности которых зависят от природы наноксида и характера взаимодействий БСА с его поверхностью.

Введение

Бычий сывороточный альбумин (БСА) и другие белки используются в качестве модифицирующих агентов для регулирования свойств бионаноккомпозитов, перспективных для получения новых лекарственных форм и других материалов [1–3]. Имобилизация БСА на поверхности оксидов осуществляется посредством адсорбции из водных растворов [1–3]. При этом особенности границ раздела фаз твердое тело – белок – вода зависят от строения твердой поверхности и характера ее взаимодействий с макромолекулами и водой [1–4]. Кроме того, природа и концентрация активных центров на поверхности влияют на строение дисперсии и поведение связанной воды при замораживании [4]. Несмотря на то, что взаимодействию нанокремнезема с различными белками посвящено много работ [1, 2, 5, 6], поведение воды в таких системах при низких температурах исследовано недостаточно, а системы БСА – сложный наноксид (например, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ и $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$) – вода в этих условиях практически не изучены. Однако эти системы могут представлять интерес для разработки новых криоконсервантов, основной принцип действия которых состоит в связывании воды и разупорядочении ее структуры для предотвращения образования протяженных кристаллитов льда при низких температурах [4, 6, 7].

Взаимодействие белков с нанокремнеземом происходит в основном за счет образования водородных связей между О- и N-содержащими группами макромолекул и поверхностными SiOH-группами. Определенный вклад вносят ионные связи ($\text{SiO}^- \cdots \text{H}^+ \text{NR}$, $\text{SiOH}_2^+ \cdots \text{O}^- \text{CR}$ и др.) и дисперсионные взаимодействия между неполярными боковыми группами макромолекул и силоксановыми связями кремнезема. Титанокремнезем (в работе исследован КТ20) и алюмокремнезем (КА1), кроме силанольных групп, содержит на поверхности группы MOH , MO(H)M и MO(H)Si и неполнокоординированные атомы M ($M = \text{Al}, \text{Ti}$) [8–10], которые принимают участие в адсорбции как белков, так и воды, что обуславливает отличия в строении и свойствах адсорбционного слоя по сравнению с системой БСА–кремнезем–вода [1, 11, 12]. Расстояния между соседними адсорбционными центрами (ОН-группами) на поверхности оксидов алюминия, кремния и титана (0,31–0,35 нм) превышают расстояния между

атомами кислорода соседних молекул воды (0,27–0,28 нм) в сетке Н-связей. Кроме того, ориентация молекул воды в кластерах, взаимодействующих с ОН-группами поверхности, отличается от ориентации соседних молекул воды во льду. Эти факторы обуславливают разупорядочение слоя воды, связанной с поверхностью оксидов, по сравнению со структурой как жидкой воды в объеме, так и со структурой льда, и связанная вода остается подвижной при $T < 273$ К, хотя многие процессы в ней протекают более медленно, чем в обычной жидкой воде, и ее активность, например сольватационная, падает [4, 12, 13]. Разупорядочивающее действие молекул БСА на связанную воду также обусловлено изменением строения сетки Н-связей молекул воды при взаимодействии с полярными группами макромолекул [4, 6, 13]. В целом строение кластеров (< 1 нм) и нанодоменов (1–10 нм) воды [4, 6] на границах раздела в дисперсиях наноксидов зависит от многих факторов: концентрации оксида, его дисперсности и пористости, природы поверхности, характера взаимодействия частиц друг с другом и с водой, pH, концентрации растворенных солей и других соединений и температуры [4, 12–16]. Эти факторы влияют на соотношение количества свободной (замерзающей при 273 К) и связанной (незамерзающей при $200–220 < T < 273$ К) воды, распределение по размерам кластеров и доменов связанной воды [6], и на структуру дисперсии в целом [11–16]. Очевидно, что при переходе от систем оксид – вода к системам оксид – полимер (белок) – вода возможно существенное изменение строения кластеров и доменов связанной воды [4, 6, 13], которое будет зависеть от полярности полимера, природы оксида и изменений в строении и агрегированности дисперсной фазы [11–16], что может влиять на криопротекторные и другие свойства и полимера, и системы в целом [13].

Структурные и энергетические особенности связанной воды [6, 13] отражаются в температурной зависимости процессов ее дипольной релаксации ($T < 200–220$ К, замороженные системы) и сквозной проводимости ($T > 220–240$ К, частично размороженные структуры воды в области границ раздела), наблюдаемых с помощью метода термостимулированной деполяризации (ТСД) [12]. ТСД термограммы замороженных водных систем отражают ряд процессов дипольной релаксации, в которых принимают участие полярные связи, группы, фрагменты, молекулы и макромолекулы, релаксирующие последовательно в указанном ряду с повышением температуры [12]. Эти процессы проявляются в виде пиков на зависимостях тока деполяризации от температуры, а также сквозной (ионной) проводимости при более высоких температурах, когда появляются протяженные слои незамерзшей воды на границах раздела с твердой фазой, обеспечивающие перколяцию для ионов [12, 13].

Целью данного исследования было изучение методом ТСД релаксационных процессов вблизи поверхности наноксидов с разной структурой поверхности (А-300, КТ20 и КА1), как исходных, так и с адсорбированным БСА в водной среде.

Экспериментальная часть

В работе использовали бычий сывороточный альбумин БСА (Fluka, фракция V) и пирогенные оксиды (наноксиды): кремнезем А-300 (удельная поверхность $S_{уд} = 285$ м²/г), алюмокремнезем (КА1, содержание Al_2O_3 $C_{Al_2O_3} = 1$ % мас., $S_{уд} = 203$ м²/г) и титанокремнезем (КТ20, $C_{TiO_2} = 20$ % мас., $S_{уд} = 84$ м²/г) (Калушский опытно-экспериментальный завод ИХП НАН Украины). А-300 предварительно прокаливали 2 ч при 400 °С, а КТ20 и КА1 – при 450 °С в течение 1 ч. Свойства наноксидов и их водных дисперсий подробно описаны ранее [5, 6, 8–10, 13–15].

Адсорбцию БСА на наноксидах проводили в статических условиях при 20–23 °С из водного раствора в изoeлектрической точке (ИЭТ) альбумина (pH 4,8) в течение 2 ч при постоянном перемешивании. После проведения адсорбции твердую фазу

(БСА/оксид) отделяли центрифугированием в течение 10 мин при скорости 4000 об/мин. Величину адсорбции БСА определяли по разности исходной и равновесной концентрации белка с помощью микробиуретового метода и фотоэлектроколориметра КФК-2. Адсорбционные исследования БСА описаны ранее [17].

Для получения спектров ТСД использовали 1 % мас. водные дисперсии оксидов, исходные и с адсорбированным БСА при pH 4,8: 0,162, 0,146 и 0,136 г белка на грамм А-300, КА1 и КТ20 соответственно. Это количество БСА соответствовало монослойному покрытию, рассчитанному из адсорбционных данных по уравнению Лэнгмюра. Концентрация индивидуального БСА в растворе составляла 0,146 % мас.

Спектры ТСД записывали в диапазоне 90 – 270 К при напряжении поляризации 200 В (напряженность $F_p \approx 2 \cdot 10^5$ В/м), температуре поляризации 265 К и скорости нагрева $b = 3$ град/мин (без поля) от 90 К [12]. Энергия активации деполяризации была рассчитана, с использованием уравнения для тока ТСД [12]

$$I(T) = \frac{S_{el}\Pi_0}{\tau_0} \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \exp\left(-\frac{1}{b\tau_0} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) dT\right), \quad (1)$$

преобразованное в интегральное уравнение для ТСД спектра с несколькими пиками [12]

$$I(T) = S_{el}\Pi_0 \int_{E_{min}}^{E_{max}} \sum_{i=1}^N w'_i \exp\left\{-\frac{E}{k_B T} - \frac{w'_i k_B T^3}{Eb} \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) + \frac{w'_i k_B T_0^3}{Eb} \exp\left(-\frac{E}{k_B T_0}\right)\right\} f(E) dE, \quad (2)$$

где

$$w'_i = \frac{b}{k_B T_i^3} (E + k_B T_i) \exp\left(\frac{E}{k_B T_i}\right), \quad (3)$$

S_{el} – площадь поверхности электродов, Π_0 – замороженная поляризация ($\Pi_0 = N\alpha_p F_p$, N – объемная плотность ловушек зарядов, α_p – поляризуемость), k_B – постоянная Больцмана, $1/\tau_0$ – натуральная частота; T_0 – начальная температура деполяризации, T_i – температура i -го ТСД максимума и $f(E)$ – функция распределения энергии активации дипольной релаксации. Вероятность перехода диполей

$$w_i = \frac{w_0}{4\pi} T \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right), \quad (4)$$

время релаксации диполей

$$\tau = \frac{1}{4\pi w_i}, \quad (5)$$

восприимчивость

$$\chi = \frac{mA_i}{S_{el}F_p}, \quad (6)$$

диэлектрическую постоянную

$$\varepsilon = 1 + 4\pi\chi, \quad (7)$$

эффективный дипольный момент

$$\mu_{eff} = \sqrt{\frac{2mA_i k_B T}{N_0 F_p S_{el}}}, \quad (8)$$

и свободную энергию активации деполяризации

$$\Delta G_i^* = R_g T_i \ln(a\tau_i T_i), \quad (9)$$

(где m – нормировочный множитель, A_i – площадь i -пика, N_0 – число молекул в см^3 и T – температура, при которой время релаксации еще достаточно короткое для поляризации, R_g – газовая постоянная и a – константа уравнения) рассчитывали на основании ТСД

спектров. T рассчитывали по уравнениям (3) и (5). Эффективный дипольный момент μ_{eff} связан с дипольным моментом (μ) свободной молекулы уравнением

$$\mu = \frac{3\mu_{\text{eff}}}{(n^2 + 2)\sqrt{1 + z\langle\cos\theta\rangle}}, \quad (10)$$

где n – коэффициент преломления, z – число ближайших соседей молекулы и $\langle\cos\theta\rangle$ – средний косинус угла между двумя соседними диполями. Расчеты функций распределения $f(E)$ были выполнены методом регуляризации [12], используя интегральное уравнение (2), определяющее достаточно сложную зависимость тока ТСД от температуры [12,13]. Приведенные выше релаксационные параметры рассчитывали для 4–5 основных пиков ТСД термограмм [12,13].

Результаты и обсуждение

Как известно [5, 17], максимальная величина адсорбции БСА на поверхности наноксидов наблюдается при pH 4,8–5,0, т.е. вблизи точки нулевого заряда (ТНЗ) БСА [1]. При этих значениях pH степень покрытия поверхности оксидов молекулами БСА наибольшая, поскольку макромолекулы имеют наиболее компактную форму и латеральное электростатическое отталкивание между ними минимально [3]. Поэтому системы оксид – БСА – вода исследовали методом ТСД при $\text{pH}_{\text{ТНЗ}} = 4,8$ (рис. 1).

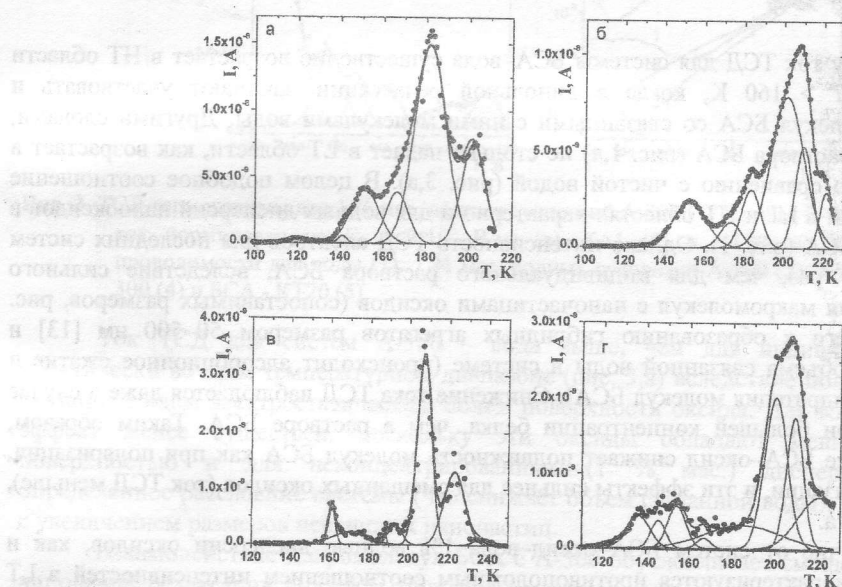


Рис. 1. ТСД спектры: растворов БСА (0,146 % мас.) (а), водные дисперсии БСА(0,162 % мас.) – А300 (б), БСА(0,146 м% ас.) – КА1 (в), БСА(0,136% % мас.) – КТ20 (г) при содержании оксидов 1 % мас. и $T < T_{\text{сп}}$.

ТСД термограмма замороженного водного раствора БСА (рис. 1,а) характеризуется меньшими токами смещения (эффективная частота $\sim 0,01$ Гц) в низкотемпературной области (ЛТ) при $T < 160$ К (в которой обычно наблюдаются процессы дипольной релаксации ОН-групп, молекул воды, других полярных связей, групп и малых молекул [12]), чем в высокотемпературной области (НТ) при $T > 160$ К. Относительно низкий уровень тока ТСД в ЛТ области обусловлен тем, что значительная часть воды является связанной Н-связями с молекулами БСА, поскольку удельная

поверхность белков составляет для разбавленных растворов более $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ (по оценкам методом ЯМР-криопорометрии), а толщина слоя связанной воды вблизи полярной поверхности может достигать 10 нм и более [12,13]. Подвижность молекул воды, связанных с молекулами БСА, в значительной степени определяется подвижностью различных фрагментов сложных макромолекул (рис. 2), которая проявляется в спектрах ТСД при большей температуре ($T > 160 \text{ К}$), чем подвижность индивидуальных молекул воды, вращательная или обусловленная туннельными H^+ -переносами при $T < 160 \text{ К}$.

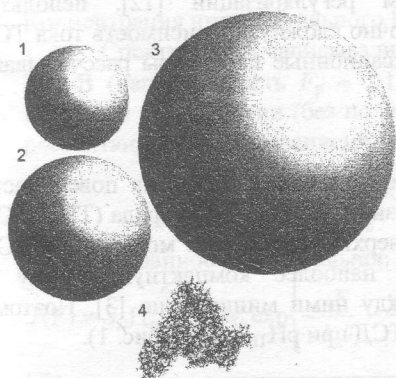


Рис. 2. Относительные размеры первичных частиц А-300 (1, средний диаметр 9,6 нм), КА1 (2, 13,3 нм), КТ20 (3, 27,7 нм) и молекулы альбумина (4).

Поэтому ток ТСД для системы БСА–вода существенно возрастает в НТ области спектра при $T > 160 \text{ К}$, когда в дипольной релаксации начинают участвовать и фрагменты молекул БСА со связанными с ними молекулами воды. Другими словами, ток ТСД для раствора БСА (рис. 1,а) не столько падает в ЛТ области, как возрастает в НТ области по сравнению с чистой водой (рис. 3,а). В целом подобное соотношение интенсивностей в ЛТ и НТ областях характерно и для водных дисперсий наноксидов в присутствии БСА (рис. 1). Однако интенсивность ТСД спектров для последних систем ниже в 1,5–5 раз, чем для индивидуального раствора БСА, вследствие сильного взаимодействия макромолекул с наночастицами оксидов (сопоставимых размеров, рис. 2), приводящего к образованию гибридных агрегатов размером 50–500 нм [13] и уменьшению объема связанной воды в системе (происходит адсорбционное сжатие и частичная дегидратация молекул БСА). Снижение тока ТСД наблюдается даже в случае БСА/А-300 при большей концентрации белка, чем в растворе БСА. Таким образом, взаимодействие БСА–оксид снижает подвижность молекул БСА как при поляризации, так и деполяризации, и эти эффекты сильнее для смешанных оксидов (ток ТСД меньше), чем кремнезема.

В отличие от систем БСА–оксид–вода 1% водные дисперсии оксидов, как и чистая вода, характеризуются противоположным соотношением интенсивностей в ЛТ ($100 < T < 160 \dots 170 \text{ К}$) и НТ ($160 \dots 170 < T < T_{\text{сп}}$, где $T_{\text{сп}}$ – температура начала сквозной проводимости, отмеченная вертикальными черточками на рис. 3,г) областях (рис. 3). Это обусловлено тем обстоятельством, что в суспензиях оксидов отсутствуют подвижные протяженные полярные структуры с химическими связями, характеризующиеся кооперативными поляризационными и релаксационными модами (как в случае макромолекул БСА и связанных с ними молекул воды). В воде присутствуют собственные протяженные структуры (нано- и микродомены) [4, 6, 13], однако они образованы сетками H -связей, более слабыми, чем химические связи в макромолекулах. Поэтому кооперативная дипольная релаксация таких водных структур в НТ области дает относительно малый вклад в ток ТСД, поскольку частичная релаксация меньших структур (OH -групп, молекул H_2O и малых кластеров воды, входящих в состав доменов)

происходит при более низких температурах в ЛТ области [12, 13]. Релаксация в дисперсиях оксидов характеризуется в верхней части ЛТ полосы меньшими токами ТСД, чем системы БСА-вода или БСА-оксид-вода, вследствие высокой полярности и поляризуемости молекул белка. Последние обуславливают рост электрической емкости системы, увеличение полярности связанных молекул воды (ϵ растет, табл. 1) и рост тока ТСД даже в ЛТ области по сравнению с индивидуальными дисперсиями оксидов.

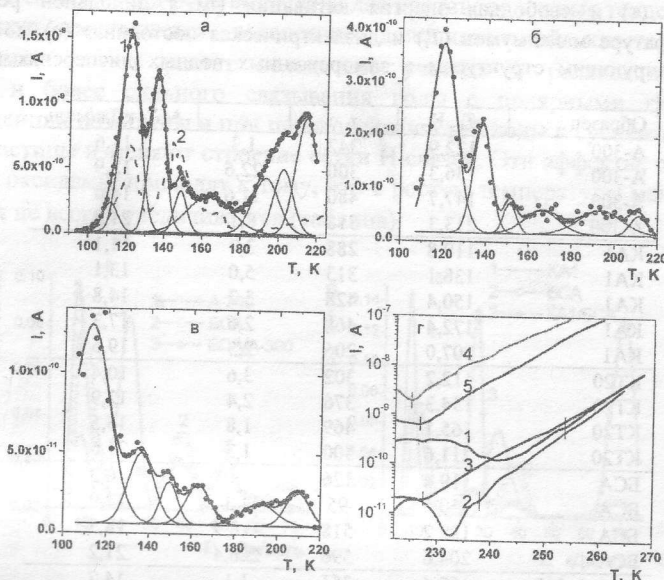


Рис. 3. ТСД термограммы для 1 % мас. водных суспензий А-300 (1) (кривая 2 – чистая вода, ТСД ток нормирован на $F_p = 2 \cdot 10^5$ В/м) (а), КА1 (б) и КТ20 (в); область сквозной проводимости для воды (1), 1 % мас. водных суспензий А-300 (2), КТ20 (3), БСА - А-300 (4) и БСА - КТ20 (5).

Ток ТСД для систем А-300 – вода выше, чем для индивидуальной воды практически во всем температурном диапазоне (рис. 3,а) вследствие поляризации слоев связанной воды электростатическим полем поверхности оксида. Для КА1 и КТ20 этот эффект менее существен, поскольку эти оксиды обладают меньшей удельной поверхностью и для неконцентрированных (1 % мас.) дисперсий возможно определенное расслоение системы (что снижает объем связанной воды), усиливающееся с увеличением размеров первичных наночастиц.

Взаимодействие макромолекул БСА с А-300 обуславливает смещение процессов дипольной релаксации в область больших температур по сравнению с раствором БСА. Так, основной максимум в НТ области смещается на 26 К (рис. 1). Этот эффект сопровождается ростом свободной энергии активации релаксации (таблица, $\Delta G^\ddagger$) как связанных с кремнеземом фрагментов БСА, так и связанной воды, ростом эффективной диэлектрической постоянной (ϵ), времени релаксации (τ) и энергии активации деполяризации (рис. 4). Можно предположить, что размер релаксирующих структур увеличивается, поскольку происходит агглютинация наночастиц оксида и макромолекул белка [13]. Поэтому подвижность макромолекул падает, величины $\Delta G^\ddagger$ и E растут, так как релаксация происходит при больших температурах, и величина тока ТСД уменьшается. Хорошо видно, что пики $f(E)$ в области 20–45 кДж/моль (БСА) смещаются в область 30–55 кДж/моль (БСА – А-300) (рис. 4,а). Для БСА – КТ20 подобное смещение

наблюдается для одного из пиков $f(E)$ в этой области ($40 \rightarrow 55$ кДж/моль), хотя второй пик смещается в противоположную сторону ($25 \rightarrow 15$ кДж/моль) (рис. 4,в). Для БСА – КА1 положение этих максимумов почти не изменяется (рис. 4,б), хотя интенсивность низкоэнергетического пика (10 кДж/моль) падает, а высокоэнергетического пика (70 кДж/моль) и пика при 25 кДж/моль – растет.

Таблица Время (τ) и свободная энергия активации ($\Delta G^\ddagger$) дипольной релаксации при температуре максимумов (T_i) и диэлектрическая постоянная (ϵ), соответствующая релаксирующим структурам в замороженных водных дисперсиях (для основных пиков)

Образец	T_i , К	τ , с	ϵ	$\Delta G^\ddagger$, кДж/моль
A-300	122,9	342	1,3	11,6
A-300	136,3	300	22,6	12,9
A-300	147,7	480	11,6	14,6
A-300	213,3	318	8,1	21,0
КА1	119,8	288	3,7	11,1
КА1	138,1	313	5,0	13,1
КА1	150,4	428	3,2	14,8
КА1	172,4	468	2,6	17,3
КА1	207,0	206	2,3	19,6
КТ20	112,2	302	3,6	10,4
КТ20	134,3	376	2,4	12,9
КТ20	165,1	469	1,8	16,5
КТ20	211,6	500	1,3	21,6
БСА	119,4	126	1,0	10,3
БСА	150,5	95	4,3	12,9
БСА	182,2	518	118,9	18,5
БСА	204,6	596	228,4	21,2
БСА-А-300	152,4	351	1,1	14,7
БСА-А-300	184,1	633	40,0	19,0
БСА-А-300	208,0	614	139,6	21,6
БСА-А-300	216,8	172	151,6	20,3
БСА-КА1	161,0	587	1,0	16,3
БСА-КА1	188,6	439	3,5	18,9
БСА-КА1	206,0	99	8,7	18,2
БСА-КА1	222,3	284	28,4	21,8
БСА-КТ20	137,3	177	1,3	12,4
БСА-КТ20	152,8	324	14,1	14,7
БСА-КТ20	165,0	130	7,3	14,7
БСА-КТ20	207,2	730	101,5	21,9

Последнее можно объяснить наличием более сильных брэнстедовских кислотных центров на поверхности КА1 (ответственных за сильное взаимодействие с молекулами БСА и водой) по сравнению с КТ20 или А-300. Таким образом, строение адсорбционного слоя БСА–вода различно для исследованных оксидов, поскольку ТСД термограммы (рис. 1 и 3), функции распределения $f(E)$ (рис. 4) и активационные параметры (таблица) для систем БСА–оксид–вода существенно отличаются для А-300, КА1 и КТ20. Следует отметить, что величина ϵ для систем БСА–оксид–вода может быть больше (таблица, $\epsilon = 100 \dots 230$), чем для объемной воды ($\epsilon = 78$). Однако для систем оксид – вода $\epsilon < 23$, что соответствует релаксационным процессам с участием кластеров воды, а не больших протяженных структур, поскольку наночастицы оксида разупорядочивают структуру доменов воды [12, 13]. Время релаксации структур связанной воды (таблица, $\tau = 300 \dots 500$ с) значительно больше времени релаксации ОН-групп или индивидуальных молекул воды [12, 18]. Это различие обусловлено не только размерами релаксирующих структур, но и сильными электростатическими полями

вблизи поверхности оксидов, сильнее тормозящими реориентационные процессы в слое связанной воды при деполяризации больших структур, т.е. с большим средним числом Н-связей на молекулу воды. При наличии БСА в системе время релаксации изменяется не столь существенно (не более чем на 50%), как величина ϵ , которая возрастает на порядок (таблица), поскольку количество связанных зарядов (полярных групп) в системе сильно возрастает за счет БСА. Для времени релаксации в системах БСА-оксид-вода в сравнении с системами оксид-вода возможны две противоположные тенденции: 1 - τ для водных структур уменьшается вследствие дополнительной кластеризации воды макромолекулами; 2 - τ растет вследствие участия в релаксации фрагментов макромолекул и более сильного связывания воды с полярными группами БСА. Подобные тенденции возможны и при переходе от чистой воды к суспензиям оксидов, в которых наночастицы изменяют строение сетки Н-связей. Эти эффекты, обусловленные как БСА, так и оксидами, приводят к тому, что с ростом температуры максимумов тока ТСД величина τ не всегда увеличивается (таблица).

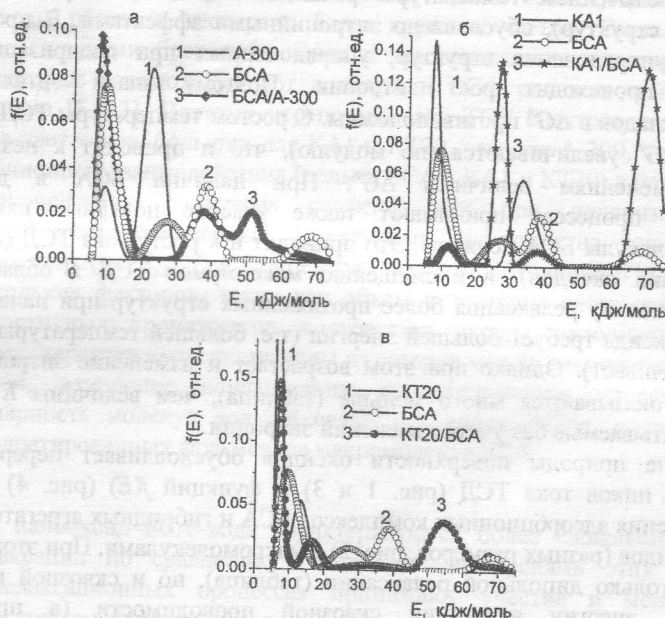


Рис. 4. Функции распределения энергии активации дипольной релаксации для замороженных 1% водных суспензий оксидов (1), 0,146 % мас. раствора БСА (2) и суспензий оксид-БСА (3) для А-300 (а), КА1 (б), КТ20 (в) при рН 4,8, рассчитанные по данным ТСД метода.

В результате взаимодействия БСА - оксид количество связанной воды уменьшается, поскольку часть воды вытесняется из промежутков между макромолекулами белка и наночастицами оксида [12, 13, 19], имеющими сопоставимые размеры (рис. 2). Происходит дегидратация макромолекул белка и их сжатие. Так, по данным ЯМР-криопорометрии удельная поверхность молекул белка, контактирующая со связанной водой, может уменьшиться в несколько раз [13]. Это приводит к снижению пластифицирующего действия воды на релаксационные процессы с участием БСА (температура релаксационных максимумов растет, а ток ТСД падает) и к изменениям соответствующих релаксационных характеристик (таблица). Поэтому ряд ТСД пиков для систем БСА-оксид-вода, несмотря на рост температуры релаксации, характеризуется уменьшением величин ϵ , τ и $\Delta G^\ddagger$, что можно объяснить снижением

объема связанной воды в соответствующих релаксирующих структурах при одновременном увеличении искажений в структуре Н-связей в этих структурах, т.е. ассоциированность связанной воды снижается [13]. Наличие нескольких пиков ТСД для суспензий оксидов (рис. 3) и, соответственно, пиков функций распределения энергии активации дипольной релаксации $f(E)$ (рис. 4) обусловлено процессами с участием ОН-групп поверхности и индивидуальных молекул воды, например, так называемых внеструктурных молекул при расстоянии до ближайших атомов кислорода $r_{\text{ОО}} \approx 0,37$ нм [13] (первый максимум $f(E)$ при 8–12 кДж/моль), молекул воды в малых кластерах (20–30 кДж/моль), в больших водных структурах с большим средним числом Н-связей на молекулу (30–45 кДж/моль) и наиболее сильно связанных молекул воды (60–70 кДж/моль), взаимодействующих, например, с активными центрами поверхности или заряженными структурами, т.е. находящимися в области максимальных электростатических полей [12, 13]. Однако интервал изменений $\Delta G^\ddagger$ значительно меньше (таблица), чем величин E (рис. 4). Столь значительное различие, которое возрастает с увеличением температуры релаксационных максимумов (и размеров релаксирующих структур), обусловлено энтропийными эффектами. В процессах ТСД происходит разупорядочение структур, упорядоченных при поляризации, т.е. при деполяризации происходит рост энтропии. Поэтому знаки энтальпийного и энтропийного вкладов в $\Delta G^\ddagger$ противоположны. С ростом температуры ТСД максимумов оба вклада в $\Delta G^\ddagger$ увеличиваются (по модулю), что и приводит к незначительным суммарным изменениям величины $\Delta G^\ddagger$. При наличии БСА в дисперсии в релаксационных процессах принимают также участие полярные связи, группы, фрагменты и молекулы БСА целиком. Это приводит и к росту тока ТСД (относительно водных суспензий оксидов), и к смещению максимумов ТСД в область больших температур, поскольку релаксация более протяженных структур при наличии связей с поверхностью оксида требует большей энергии (т.е. большей температуры, которая эту энергию обеспечивает). Однако при этом возрастает и изменение энтропии, поэтому величины $\Delta G^\ddagger$ оказываются много меньше (таблица), чем величины E (рис. 4, НТ область), рассчитываемые без учета изменений энтропии.

Изменение природы поверхности оксидов обуславливает перераспределение интенсивностей пиков тока ТСД (рис. 1 и 3) и функций $f(E)$ (рис. 4) в результате изменений строения адсорбционных комплексов БСА и гибридных агрегатов первичных наночастиц оксидов (разных размеров, рис. 2) с макромолекулами. При этом изменяются параметры не только дипольной релаксации (таблица), но и сквозной проводимости (рис. 3, г). Так, энергии активации сквозной проводимости (в предположении аррениусовского характера процесса) воды и 1 % суспензии А-300 примерно равны ($E_{\text{сп}} = 99,9$ и $98,7$ кДж/моль соответственно), но для суспензии КТ20 она уменьшается до $72,9$ кДж/моль в результате более легкого депротонирования бренстедовских центров $\text{SiO}(\text{H})\text{Ti}$ по сравнению с SiOH -группами. Для системы БСА–А-300–вода $E_{\text{сп}} = 62,1$ (т.е. подвижность протонов в адсорбционном слое растет) и для БСА–КТ20–вода $E_{\text{сп}} = 74,7$ кДж/моль (подвижность протонов падает по сравнению с суспензией КТ20), т.е. эти величины изменяются относительно $E_{\text{сп}}$ для суспензий оксидов без БСА противоположным образом. При этом $T_{\text{сп}}$ для БСА–А-300–вода снижается, а для БСА–КТ20–вода – нет. Это можно объяснить тем, что макромолекулы белка эффективно взаимодействуют с бренстедовскими центрами КТ20, снижая подвижность протонов этих центров, что дает рост энергии активации протонной проводимости по сравнению с суспензией КТ20 без БСА. В случае кремнезема БСА увеличивает поляризацию SiOH -групп на поверхности частиц кремнезема и подвижность H^+ растет. В целом соблюдается условие – энергия активации сквозной проводимости превышает энергию дипольной релаксации ($E_{\text{сп}} > E$), хотя высокоэнергетические "хвосты" функций $f(E)$

(рис. 4) перекрываются с $E_{сп}$, например для системы БСА-А-300-вода. Этот эффект легко понять, поскольку указанные "хвосты" относятся к релаксации протяженных структур, подвижность которых проявляется примерно при тех же температурах, что и начинается сквозная проводимость. Поэтому энергии активации этих двух процессов оказываются близки.

Следует учитывать и различия в удельной поверхности изученных оксидов, поскольку $S_{уд}$ соответствуют изменению распределения первичных частиц по размеру (рис. 2) и, следовательно, изменению объема связанной воды в системе при одинаковом весовом содержании оксидов (1 мас.%) с разной величиной $S_{уд}$. Так, уменьшение $S_{уд}$ в ряду А-300 > КА1 > КТ20 (примерно на 100 м²/г для каждого последующего оксида) обуславливает существенное снижение токов ТСД в этом же ряду как для водных дисперсий оксидов (рис. 3), так и систем БСА-оксид-вода (рис. 1), содержащих уменьшающееся количество БСА (соответствующее лэнгмюровскому монослою покрытию) в этом же ряду. Это приводит к относительному росту первого пика $f(E)$ при 10 кДж/моль в этом же ряду (рис. 4), поскольку объем невозмущенной или слабо возмущенной воды растет в дисперсии более крупных частиц. Смешанные оксиды обладают более сильными бренстедовскими и льюисовскими кислотными центрами поверхности, которые взаимодействуют с водой и БСА сильнее, чем силанольные группы кремнезема [5, 13]. Поэтому перенормировка ТСД спектров только с учетом величины $S_{уд}$ не дает токов, больших для КА1 и КТ20, чем для А-300, поскольку более сильные адсорбционные взаимодействия (воды и БСА с КА1 и КТ20) в большей степени тормозят переориентацию полярных структур как при поляризации, так и деполяризации. Влияние отмеченных структурных эффектов на токи ТСД носит нелинейный характер (по $S_{уд}$, T и концентрации). Это обусловлено одновременным действием нескольких факторов, таких как объем и толщина слоев связанной воды, характер межчастичных промежутков в агрегатах оксида, заполненных водой и макромолекулами, характер вытеснения воды из зазоров между наночастицами оксида и макромолекулами, изменение конформации и дегидратация макромолекул при адсорбции, полярность молекул воды в связанных слоях, заряд, поляризуемость и подвижность гидратированных фрагментов макромолекул БСА.

Выводы

Системы нанооксид-БСА-вода характеризуются более сложными процессами дипольной релаксации по сравнению с водными дисперсиями этих же оксидов, поскольку в релаксационных процессах принимают участие и молекулы белка (полярные связи, группы, фрагменты и целые макромолекулы), характер связи которых с поверхностью зависит от строения этой поверхности, т.е. он различен для кремнезема и смешанных нанооксидов. Это обуславливает и основное отличие ТСД спектров систем БСА-вода и БСА-нанооксид-вода от систем нанооксид-вода, которое состоит в обратном соотношении величин токов в низкотемпературной ($T < 160...170$ К) и высокотемпературной ($T > 160...170$ К) областях спектров ТСД. Для водных дисперсий оксидов характерны большие токи ТСД в первой области, а для систем БСА-вода и БСА-оксид-вода – во второй. Изменения характера межмолекулярных взаимодействий для систем с участием БСА по сравнению с водными дисперсиями оксидов приводят в целом к росту времен, энергии и свободной энергии активации дипольной релаксации и росту диэлектрической постоянной соответствующих структур. Однако токи ТСД в системах БСА-оксид-вода ниже, чем в случае раствора БСА (при той же или близкой концентрации), в результате сильных адсорбционных взаимодействий макромолекул с активными центрами поверхности, которые препятствуют ориентационным процессам при поляризации и реориентационным движениям при деполяризации. Полученные

результаты свидетельствуют об изменении строения воды, связанной наноксидом и БСА, причем более существенные изменения наблюдаются для систем БСА – сложный наноксид (КА или КТ) – вода. Поэтому можно предположить, что криопротекторные свойства систем на основе сложных наноксидов, белков и других соединений (например, сахаров) могут быть выше, чем систем на основе нанокремнезема. В этом случае целесообразно использовать сложные наноксиды с максимальной удельной поверхностью для усиления нарушений в структуре сеток Н-связей молекул воды и снижения вероятности образования протяженных кристаллитов льда при температурах криоконсервирования.

Благодарность

Авторы благодарны НТЦУ (гранты № 3832 и 4481) за финансовую поддержку исследований.

Литература

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наук. думка, 2003. – 416 с.
2. Surface chemistry in biomedical and environmental science / Ed. J.P. Blitz, V.M. Gun'ko. – Dordrecht: Springer, 2006. – V. 228. – 434 p.
3. Proteins at interfaces II: fundamentals and applications / Ed. T.A. Horbett, J.L. Brash. ACS Symposium Series 602. – Washington, DC: Amer. Chem. Soc., 1995.
4. Chaplin M., Water structure and behaviour, <http://www.lsbu.ac.uk/water/>.
5. Interaction of proteins and substituted aromatic drugs with highly disperse oxides in aqueous suspension / V.M. Gun'ko, N.N. Vlasova, L.P. Golovkova, N.G. Stukalina et al. // Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspects. – 2000. – V. 167 – P. 229–243.
6. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko et al. // Adv. Colloid Interface Sci. – 2005. – V. 118 – P. 125–172.
7. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. – 2003. – V. 46. – P. 205–229.
8. Aqueous suspension of fumed oxides: particle size distribution and zeta potential / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, R. Leboda, E. Chibowski // Adv. Colloid Interface Sci. – 2001. – V. 91. – P. 1–112.
9. Surface structure and properties of mixed fumed oxides / V.M. Gun'ko, J.P. Blitz, K. Gude, V.I. Zarko et al. // J. Colloid Interface Sci. – 2007. – V. 314, N 1. – P. 119–130.
10. Morphological and structural features of individual and composite nanooxides with alumina, silica, and titania in powders and aqueous suspensions / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, V.V. Turov, O.I. Oranska et al. // Powder Technol. – 2009. – V. 195. – P. 245–258.
11. Айлер Р. Химия кремнезема: растворимость, полимеризация, коллоидные и поверхностные свойства. – М.: Мир, 1982. – Т. 1, 2. – 1127 с.
12. TSDC spectroscopy of relaxational and interfacial phenomena / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, E.V. Goncharuk, L.S. Andriyko et al. // Adv. Colloid Interface Sci. – 2007. – V. 131, N 1–2. – P. 1–89.
13. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наук. думка, 2009. – 694 с.
14. Гунько В.М., Зарко В.И. Высокодисперсный кремнезем в жидкой среде // Химия, физика и технология поверхности. – 2006. – Вып. 11. – С. 74–88.
15. Закономерности поведения наноматериалов в разных средах, обусловленные строением поверхности и морфологией частиц / В.М. Гунько, В.И. Зарко, В.В. Туров, Е.В. Гончарук и др. // Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных

структур / Под ред. А.П. Шпака, П.П. Горбика. – Киев: Наук. думка, 2007. – Т. 1. – С. 157–226.

16. Regularities in the behaviour of water confined in adsorbents and bioobjects studied by ^1H NMR spectroscopy and TSDC methods at low temperatures / V.M. Gun'ko, V.V. Turov, V.I. Zarko, E.V. Goncharuk et al. // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. – 2009. – V. 336. – P. 147–158.
17. Температурно-програмована десорбційна мас-спектрометрія бичачого сироваткового альбуміну в конденсованому стані і адсорбованого на поверхні високодисперсних оксидів / Н.Ю. Клименко, Н.П. Галаган, Б.Г. Місчанчук, В.І. Зарко, В.О. Покровський // Химия, физика и технология поверхности. – 2008. – Вып. 14. – С. 456–466.
18. Tischenko V.A., Gun'ko V.M. Water electret relaxation at dispersed silica surface // Colloids Surf. A. – 1995. – V. 101, N 2/3. – P. 287–294.
19. Interaction of fibrinogen with nanosilica / A.A. Rugal, V.M. Gun'ko, V.N. Barvinchenko, V.V. Turov // Central Europ. J. Chem. – 2007. – V. 5, N 1. – P. 32–54.

LOW-TEMPERATURE DIPOLAR RELAXATION IN BOVINE SERUM ALBUMIN-NANOOXIDE-WATER SYSTEMS

V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, E.V. Goncharuk, N.Y. Klymenko, N.P. Galagan

Chuiko Institute of Surface Chemistry, 17 General Naumov Street, 03164 Kiev, Ukraine

Comparative investigations of low-temperature processes of dipolar relaxation in frozen aqueous dispersions of nanooxides alone and with the presence of bovine serum albumin (BSA) were carried out using thermally stimulated depolarization current method. For the later systems, an increase in contribution of relaxational processes is observed at $T > 160$ – 170 K, since for aqueous suspensions of nanooxides, greater TSD currents are observed at $T < 160$ – 170 K. This difference is due to the participation of the BSA molecules (polar bonds, groups, fragments, whole molecules) in the relaxation processes, whose features depend also on the nature of nanooxide and a character of BSA interactions with its surface.

ПРОЦЕСИ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОЇ ДИПОЛЬНОЇ РЕЛАКСАЦІЇ В СИСТЕМАХ БИЧАЧИЙ СИРОВАТКОВИЙ АЛЬБУМІН–НАНООКСИД–ВОДА

В.М. Гунько, В.І. Зарко, Е.В. Гончарук, Н.Ю. Клименко, Н.П. Галаган

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, Київ-164, Україна

Методом термостимульованої деполяризації проведені порівняльні дослідження процесів низькотемпературної дипольної релаксації в заморожених водних дисперсіях наноксидів, індивідуальних і в присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Для останніх систем характерно збільшення вкладів релаксаційних процесів при $T > 160$... 170 K, в той час як для водних дисперсій оксидів більші струми ТСД спостерігаються при $T < 160$... 170 K. Ця відмінність зумовлена участю молекул БСА – полярних зв'язків, груп, фрагментів і цілих макромолекул – в релаксаційних процесах, особливості яких залежать від природи наноксиду та характеру взаємодій БСА з його поверхнею.