



УДК 544.723, 543.544

## Адсорбция среднемолекулярных пептидов на силикагеле

Крюкова Е.Г.

*ОАО «Авангард», Санкт-Петербург*

Меленевская Е.Ю

*Институт Высокмолекулярных соединений РАН, Институт Высокмолекулярных соединений РАН*

Новиков А.В., Подосенова Н.Г.

*Институт Аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

Шаронова Л.В.

*Физико-технический институт им. А.Ф.Иоффе РАН, Санкт-Петербург*

---

### Аннотация

Представлены спектры оптического поглощения и масс-спектры растворов среднемолекулярных пептидов (СМП) ишемического происхождения до и после их контакта с силикагелями, модифицированными фуллереном C<sub>60</sub>. На основании спектров оптического поглощения выявлено влияние молекул фуллерена и метода их введения в структуру силикагеля на его адсорбционные свойства по отношению к СМП. Из анализа масс-спектров установлено, что при адсорбции из раствора удаляются фракции СМП с массами 900-1000Да. Анализ оптических и масс-спектров десорбированных с силикагеля СМП выявил необратимое связывание части СМП, при этом масс-спектр СМП содержит только одну группу пиков в области масс менее 200Да. Сделан вывод, что присутствие фуллерена в структуре силикагеля приводит к образованию новых активных центров адсорбции СМП, которые обладают реакционной способностью и необратимо связывают СМП с адсорбентом

---

### Введение

Получение новых органических и неорганических фуллеренсодержащих нанокмозитов с использованием уникальных свойств фуллерена вызывает значительный интерес ученых и специалистов разных областей, так как открывает ряд перспектив при решении задач оптики, фотоэлектрохимии и др. Предметом наших исследований на протяжении последних 10 лет было изучение адсорбции атерогенных компонент плазмы крови [1-3] силикагелями, модифицированными молекулами фуллерена C<sub>60</sub>. Была выявлена высокая специфичность такого адсорбента по отношению к атерогенным липопротеидам низкой плотности, что

---

позволило рекомендовать его как средство профилактики и лечения атеросклероза методом эфферентной терапии. В настоящее время продолжены подобные исследования адсорбционных свойств силикагеля в присутствии молекул фуллерена по отношению к среднемолекулярным пептидам (СМП) плазмы крови, выделяемым организмом при острых ишемических состояниях миокарда.

Среднемолекулярные пептиды, являясь продуктами распада белков, действуют как вторичные эндотоксины, вызывают угнетение и расстройство различных физиологических процессов. С целью использовать принцип эфферентной терапии при лечении данной патологии был получен адсорбент путем введения молекул фуллерена в силикагель «твердофазным» методом [4]. Этот метод принципиально отличается от использованного нами ранее [1] при получении адсорбента, селективного по отношению к атерогенным липопротеидам низкой плотности. Первые экспериментальные результаты исследования адсорбционных свойств нового адсорбента по отношению к СМП плазмы крови ишемического происхождения были описаны в [5]. Высокая емкость адсорбента позволила рекомендовать его как средство удаления этих токсинов из организма больного разной степени ишемии методом эфферентной терапии. В данной работе представлены экспериментальные результаты, характеризующие адсорбционные свойства силикагеля по отношению к СМП, молекулярно-массовое распределение СМП и изменение состава СМП в процессе адсорбции и десорбции с адсорбента в зависимости от метода введения фуллерена в его структуру. Эти исследования направлены на изучение механизма формирования специфических адсорбционных свойств силикагеля в присутствии фуллерена, определения значения молекул фуллерена при образовании активных центров адсорбции по отношению к СМП ишемического происхождения

### **Материалы и методы исследования**

В работе использован аморфный силикагель КСК, диаметр пор 100 нм, удельная поверхность 150 м<sup>2</sup>/г, общий объем пор 0.89 см<sup>3</sup>/г. Использовался фуллерен фирмы «Фуллереновые технологии», классификация С<sub>60</sub> - 99.5 % по массе.

Были использованы следующие два метода введения фуллерена в структуру силикагеля. Метод «твердофазного» введения фуллерена в силикагель (образец 104) включал процедуру растирания силикагеля в присутствии молекул С<sub>60</sub> на магнитной мешалке в цельнопаянной колбе, вакуумирование до остаточного давления 10<sup>-6</sup> мм рт.ст. и прогрев при температурах в области 150 – 200<sup>0</sup>С в течение 5 – 7 ч. Метод «жидкофазного» введения фуллерена в пористую структуру силикагеля (образец 103) был ранее разработан нами и описан в [1]. Он включал пропитку зерен силикагеля раствором фуллерена в орто-дихлорбензоле (одхб) (массовая концентрация 1%), испарение растворителя в вакуумной камере при 50<sup>0</sup>С с последующим длительным промыванием водой и этиловым спиртом, сушку в термостате при 150<sup>0</sup>С. Методы введения фуллерена в силикагель, принятые в работе, не используют никаких химических компонент для прививки и закрепления их в силикагеле. Главное отличие этих методов состоит в режимах процесса приготовления, которые обеспечивают различное взаимодействие фуллерена с поверхностью силикагеля. При «твердофазном» методе механическое растирание фуллерена в условиях вакуума сопровождается ковалентным взаимодействием молекул фуллерена с силикагелем и обеспечивает прочное связывание, которое не может быть разрушено даже «хорошим» растворителем фуллерена (например, одхб)

и нагреванием. При «жидкофазном» методе закрепление молекул фуллерена в структуре силикагеля носит донорно-акцепторный характер, инициированный ароматическим растворителем. Растворитель, как показано в [2], изменяет характер распределения электронной плотности в цепях силоксановых связей, длину связей Si-O и межтетраэдрические углы Si-O-Si и, таким образом, химическую природу и микроструктуру поверхности SiO<sub>2</sub>. Как было установлено, оптический спектр десорбированного из силикагеля фуллерена совпадает со спектром исходного, что указывает на физический характер взаимодействия C<sub>60</sub> с поверхностью силикагеля.

Исследовались СМП, выделенные из плазмы крови мужчины 60 лет с ишемической болезнью сердца: инсульт. Кровь забирали утром натощак спустя 14 ч после последнего приема пищи. Выделение СМП из плазмы крови осуществляли осаждением крупномолекулярных белков плазмы крови метанолом при объемном соотношении метанола и нативной плазмы крови 3:1 [6,7]. СМП растворяли в стандартном изотоническом растворе натрия хлорида pH 7.4.

Определение адсорбционных свойств силикагелей проводили в статических условиях с использованием стеклянных пробирок вместимостью 10 мл, в которые к 500 мг сухого силикагеля добавляли 2 мл раствора СМП в стандартном изотоническом растворе натрия хлорида pH 7.4. Содержимое в пробирках (адсорбент и раствор СМП) перемешивали в течение 30 мин. После этого растворы центрифугировали, отбирали растворы СМП над адсорбентом и определяли концентрацию СМП в растворе после его контакта с адсорбентом. Для десорбции СМП с адсорбента последний дважды промывали изотоническим раствором (10мл), заливали щелочным раствором N=0.3 моль/л (5 мл) и перемешивали. Отбор проб над адсорбентом для определения концентрации десорбированных СМП проводили через 30 мин.

Сравнение состава пула СМП в приготовленном растворе до адсорбции, после контакта раствора с адсорбентом и в растворе, полученном в результате процедуры десорбции на образцах силикагеля осуществляли методом оптической спектроскопии. Регистрация спектров поглощения растворов СМП в области длин волн 200-700 нм проводилась на спектрофотометре СФ2000 с разрешением 4нм в идентичных условиях с использованием кювет одинаковой геометрии.

Для того же набора растворов исследовался состав пула СМП методом масс-спектрометрии. Регистрация масс-спектров проводилась на масс-спектрометре MX5303, оборудованном электрораспылительным источником ионизации (electrospray ionization, ESI) и время-пролетным масс-анализатором (TOF), состыкованным с микроколоночным хроматографом «МилиХром А-02» («Эконова», Новосибирск). Хроматографическая колонка размером 2x75мм заполнена сорбентом Prontosil 120-5C18AQ. Элюцию осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила от 2 до 100% (по объему) в растворе 0.25% муравьиной кислоты со скоростью 150мкл/мин.

### **Спектры оптического поглощения и масс-спектры**

Спектры оптического поглощения растворов СМП после контакта с каждым из адсорбентов в течение 30мин и растворов СМП, десорбированных с силикагелей, приведены на рис. 1-3 в сравнении со спектром исходного раствора. Относительные концентрации СМП были рассчитаны как площади под соответствующими спектрами:  $S_{ост}$ ,  $S_{дес}$ ,  $S_{исх}$  соответственно. Кроме того, были вычислены разности

спектров исходного раствора СМП и остаточного после адсорбции и площади этих разностных спектров  $S_{\text{разн}}$ , характеризующие концентрацию СМП, необратимо связанных с адсорбентом. Разностные спектры также приведены на рис.2 и 3. Далее рассчитывались следующие параметры адсорбции: коэффициент элиминирования  $K_{\text{эл}} = [(S_{\text{исх}} - S_{\text{ост}}) = S_{\text{разн}}] / S_{\text{исх}}$ , коэффициент десорбции  $K_{\text{дес}} = S_{\text{дес}} / S_{\text{исх}}$  и доля СМП, связанных с адсорбентом,  $W_{\text{связ}} = (S_{\text{разн}} - S_{\text{дес}}) / S_{\text{исх}}$ . Значения всех параметров приведены в таблице.

Таблица 1. Характеристики адсорбции СМП на образцах силикагеля, модифицированного фуллереном

Адсорбент	$K_{\text{эл}}$	$K_{\text{дес}}$	$W_{\text{связ}}$
Стандартный силикагель	0.15	-	-
103- «жидкофазный» метод	0.73	0.26	0.47
104- «твердофазный» метод	0.80	0.53	0.27

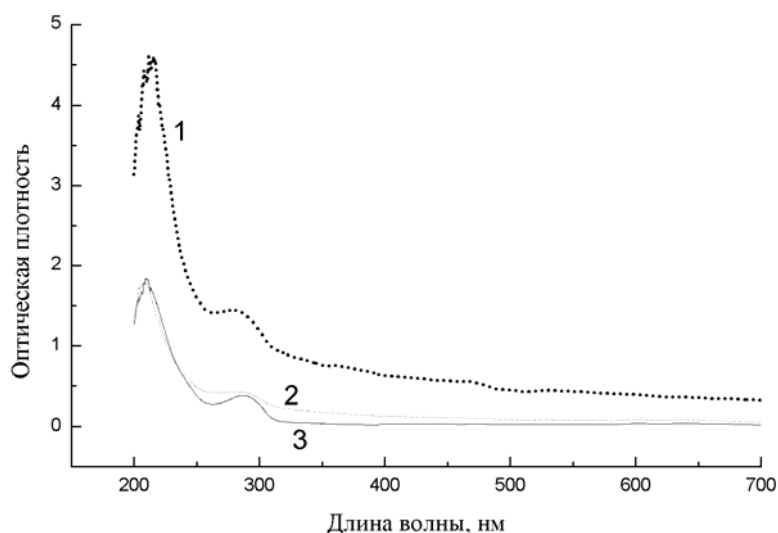


Рис. 1. Спектры оптического поглощения - адсорбция: 1 - исходный раствор СМП; 2 - после адсорбции на образце 103, 3 – после адсорбции на образце 104

Предварительно была проведена серия экспериментов по оценке адсорбционных характеристик не модифицированного силикагеля. Эксперименты показали, что в этом случае  $K_{\text{эл}}$  СМП лежит в интервале 0.10-0.20. В таблице приводится среднее значение  $K_{\text{эл}}=0.15$ .

Из рис.1 видно, что контакт исходного раствора СМП с адсорбентами 103 и 104 приводит к изменению формы оптических спектров и уменьшает их интегральные площади, т.е. при адсорбции в обоих случаях происходит удаление некоторой существенной доли СМП из раствора. Спектры растворов после контакта с адсорбентом содержат информацию о составе пула СМП, который предполагается после окончания акта плазмсорбции возвращать больному. Различия разностных спектров и спектров десорбции (рис. 2, 3) показывают, что при обоих использованных методах приготовления адсорбента (103 и 104) десорбция не позволяет смыть все связанные с адсорбентом СМП.

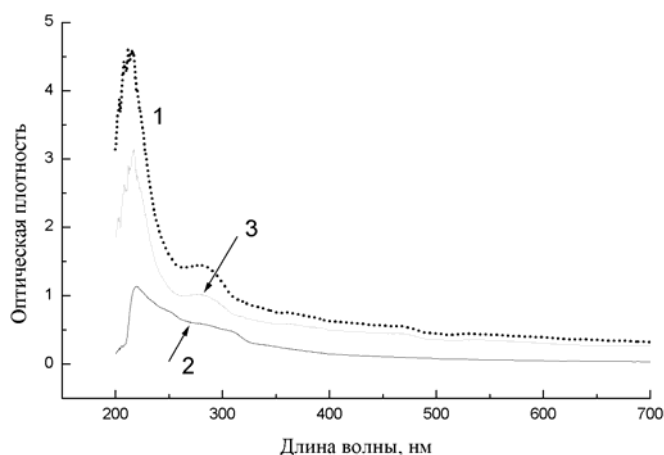


Рис.2. Спектры оптического поглощения – десорбция на образце 103: 1 - исходный раствор СМП, 2 - раствор десорбированных СМП. 3 – разность спектра исходного СМП и спектра адсорбции (см. рис.1)

Из таблицы видно, что наибольшее значение  $K_{эд}$  имеет адсорбент, полученный при твердофазном методе введения фуллерена (образец 104), а наименьшие имеет исходный силикагель (в отсутствие фуллерена). Таким образом, спектры, приведенные на рис.1, и данные таблицы, выявляют влияние фуллерена на адсорбционные свойства силикагеля по отношению к СМП, обусловленное образованием новых активных центров. В то же время существенное различие значений  $K_{дес}$  и  $W_{связ}$  позволяет предположить, что механизм адсорбционного связывания СМП с силикагелем в присутствии молекул  $C_{60}$  носит не только физический, но и химический характер, т.е. активными центрами адсорбции СМП являются реакционно-способные группы на поверхности силикагеля в присутствии фуллерена. При этом сосуществование физикоадсорбции и хемоадсорбции СМП приводит к увеличению адсорбционной емкости силикагеля. Наибольшие значения  $K_{дес}$  и  $W_{связ}$  наблюдаются на адсорбенте, приготовленном «твердофазным» методом. Аналогичные данные были получены нами ранее при исследовании структуры молекул липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), десорбированных с силикагеля, модифицированного молекулами  $C_{60}$  [3]. Исследование структуры десорбированных ЛПНП методом флуориметрии обнаружило присутствие в них перекисных продуктов (прочны связанных с силикагелем), которое было обусловлено окислением ЛПНП по свободно-радикальному механизму.

На рис. 4 сопоставлены масс-спектры исходного раствора СМП и после его контакта с адсорбентом. В спектре исходного СМП (рис. 4 а) можно выделить 3 группы пиков с массами в области до 280Да, 500-550Да и 990-1050Да. Наибольший интерес представляет третья группа пиков, поскольку, как было показано в работе [8], при наличии в плазме крови пациентов высокой концентрации пептидов с массами 800-1000Д возрастает тяжесть клинического течения ишемической болезни сердца. Согласно [8], их содержание зависело от степени поражения коронарного бассейна и коррелировало с тяжестью клинического состояния, обусловленного перенесенным инфарктом миокарда, и присоединением гипертонической болезни. Масс-спектр СМП после его адсорбции на образце 104 (рис. 4 б) содержит 3 группы пиков с массами 400—440Да, 500-600Да и 760-840Да, а СМП с массами 800-1000Д

оказались связанными с адсорбентом. Таким образом, в результате адсорбции на образце 104 наблюдается существенное изменение массового состава СМП.

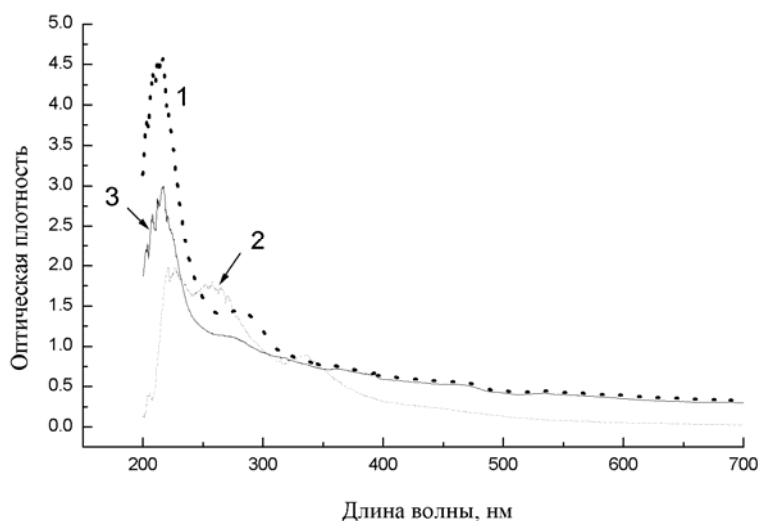


Рис.3. Спектры оптического поглощения – десорбция на образце 104: 1 - исходный раствор СМП, 2 - раствор десорбированных СМП, 3 – разность спектра исходного СМП и спектра адсорбции (см. рис.1)

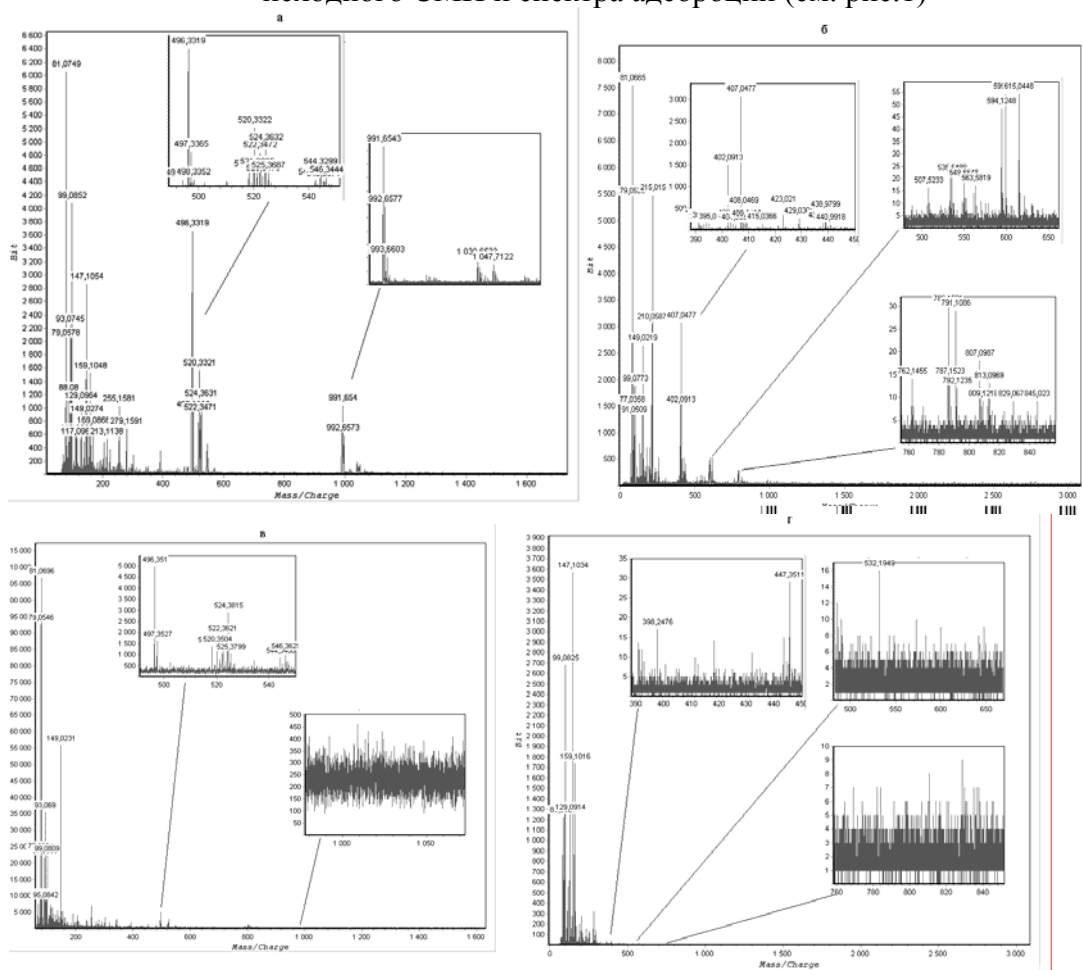


Рис.4. Масс-спектры растворов СМП: исходный (а), после адсорбции на адсорбенте 104 (б), после десорбции с адсорбента 103(в) и с адсорбента 104(г)

Таким образом, совокупность полученных результатов показывает, что присутствие фуллерена приводит к образованию новых активных центров селективной адсорбции СМП.

Масс-спектры СМП, десорбированных с образцов силикагеля 103 и 104, представлены на рис. 4, с,d. Видно, десорбция с образца силикагеля 103 и 104 дает только одну группу пиков. Из этого следует, что все СМП с массами выше 500 Да адсорбируются необратимо. Этот результат также подтверждает вывод о хемосорбционном механизме связывания СМП с адсорбентом, который был сделан выше при анализе оптических спектров растворов СМП, и позволяет предполагать, что именно присутствие фуллерена в структуре силикагеля приводит к образованию новых реакционно-способных центров. Таким образом, силикагель при введении в него фуллерена «твердофазным» и «жидкофазным» методами приобретает каталитические свойства, которые определяют адсорбционную емкость и селективность такой структуры по отношению к СМП с массами 800-1000Д.

Природа активных центров силикагеля, реакционно-способных по отношению к СМП, определяется химическими свойствами функциональных групп самих молекул. Как хорошо известно, пептиды представляют собой цепь, на одном конце которой находится аминогруппа, проявляющая кислотные свойства, а на другом – карбоксильная группа, проявляющая основные свойства. Значимость этих групп в связывании СМП с адсорбентом зависит от рН среды и от функциональных групп, присутствующих на поверхности адсорбента. Как хорошо известно [9 -12], в исходном силикагеле активными центрами являются гидроксильные группы силанольных групп и адсорбционно-связанной воды. Отсутствие адсорбции СМП на стандартном силикагеле обусловлено низкой реакционной способностью вышеперечисленных групп по отношению к молекулам пептидов. Поэтому наблюдаемую значительную хемоадсорбцию СМП адсорбентами 103 и 104 из растворов с рН = 7.4 можно связать с присутствием молекул фуллерена на поверхности силикагеля. Однотипный вывод был сделан в [13-16] при исследовании адсорбции белков разной кислотности и основности с использованием в качестве адсорбента силикагеля с иммобилизованным первичными аминами на его поверхности фуллереном.

При иммобилизации фуллерена на поверхности силикагеля с использованием первичных аминов, согласно данным [17], наблюдается образование комбинированной поверхности силикагеля. Она содержит иммобилизованные молекулы фуллерена и первичные амины – не модифицированные фуллереном участки поверхности. Сохранение аминогрупп на поверхности силикагеля не позволило авторам [17] реализовать уникальные свойства фуллерена. В результате механизм адсорбции на таком адсорбенте будет определяться числом аминогрупп и молекул фуллеренов, что привело к отсутствию селективности таких адсорбентов. В нашем случае использованные методы введения фуллерена в структуру силикагеля **позволяют получать** однородный адсорбент и отнести адсорбционную емкость и селективность полностью к присутствию фуллерена. Это является главным преимуществом развитых методов.

## Выводы

1. Выявлено влияние молекул фуллерена и метода их введения в структуру силикагеля на его адсорбционные емкость и селективность по отношению к СМП

ишемического происхождения. Наибольшей адсорбционной емкостью и селективностью обладает образец 104, полученный «твердофазным» методом.

2. Установлено, что механизм адсорбционного связывания СМП с адсорбентами носит не только физический, но и химический характер. Наибольшее значение необратимое связывание СМП приобретает при «твердофазном» введении фуллерена в силикагель.

3. Химическая составляющая адсорбции обусловлена присутствием самих молекул фуллерена, которые выступают по отношению к СМП ишемического происхождения в качестве реакционно-способных групп и необратимо связывают пептиды с массой 800-1000Д.

### Список литературы

1. Подосенова Н.Г., Седов В.М., Андожская Ю.С., Кузнецов А.С. //Журн. физич. химии. – 1997.- Т.71, №8.- С.1459.
2. Подосенова Н.Г., Седов В.М., Шаронова, Л.В, Дричко Н.В //Журн. физич. химии. 2001. Т. 75. № 11. С.2037.
3. Седов В.М., Подосенова Н.Г., Кузнецов А.С.. //Кинетика и катализ. 2002. Т.43. № 1. С.61.
4. Ратникова О.В., Тарасова Э.В., Меленевская Е.Ю., Згонник В.Н., Барановская И.А., Кленин С.И.// Высокомол. соед. А 2004, т.46, №7, с.1211-1216.
5. Галль Л.Н., Подосенова Н.Г., Меленевская Е.Ю., Романенко С.М., Шаронова Л.В., Крюкова Е.Г.. //Эфферентная терапия 2007, №3, с.19-22.
6. Малахова М.Я., Соломенков А.В., Беляков Н.А. Владыка А.С. //Лаб.дело. 1987, №3, С.224.
7. Галактионов А.Г., Цейтин В.М., Леонова В.И.// Биоорганическая химия. 1984. Т.1. №10. С.5.
8. Э.Э.Кузнецова, В.Г.Леонтьева, И.Б.Рудных, А.А.Рунович, Т.Е.Курильская, А.А.Файтельсон, Н.П.Мишарина, А.В.Зуев //Эндогенная интоксикация. Тезисы Международного Симпозиума. 1994г. 14-16 июня, С.Петербург. С. 74. . 9. Киселев А.В. //Успехи химии. 1956. Т.25. №6. Р. 705.
10. Айлер Химия кремнезема М.:Мир, 1982. Т.2. С.857.
11. Ласкорин Б.Н. Сорбенты на основе силикагеля в радиохимии. М: Атомиздат. 1977. 300с.
12. Игнатьева Л.А., Квилидзе В.И., Киселев В.Ф.// В сб. «Связанная вода в дисперсных системах» вып. 1, М: МГУ, 1970, С.56 Слесарев В.И. Основы химии живого. Спб: Химиздат 2001. с.552.
13. Taylor R., Walton D.R.M.//Nature. (L.). 1993. V.363. P.685.
14. Davydov V.Ya., Filatova G.N., Khohlova T.D.//Mol.Mat. 1998. V.10. P.125.
15. Nagashima H., Terasaki H., Saito Y. et al. //J. Org. Chem. 1995. V.60. P.4966.
16. Saito Y., Ohta H., Terasaki H. et al. //J. High Resol. Chromatography. 1995. V.19. P.569.
17. Давыдов В.Я., Хохлова Т.Д. //Журн. физ. хим. 200. Т.74. №7. С.1292.



**Adsorption of medium-molecular-mass peptides on silica gel**

Kryukova E.G.\* Melenevskaya E.Yu.\*\*, Novikov A.V.\*\*\*, Podosenova N.G.\*\*\*,  
Sharonova L.V.\*\*\*\*

\* *OAO "Avangard"*

\*\* *Institute of Macromolecular Compounds, RAS, St. Petersburg*

\*\*\* *Institute for Analytical Instrumentation, RAS, St. Petersburg*

\*\*\*\* *Ioffe Physico-Technical Institute, RAS, St. Petersburg*

Optical absorption spectra and mass-spectra are presented for solutions of ischemia-origin medium-molecular-mass peptides before and after their contact with silica gels modified with fullerene. Based on optical absorption spectra, the effect of fullerene molecules and technique of their introduction into silica gel structure on its adsorption properties in relation to medium-molecular-mass peptides was revealed. From the mass-spectra it was found that peptide fractions with masses 900-1000 Da were removed from solutions at adsorption. The analysis of optical and mass-spectra of desorbed from silica gel medium-molecular-mass peptides revealed irreversible binding of a portion of medium-molecular-mass peptides, with the mass spectrum contained only one group of peaks in the mass range below 200 Da. It was concluded, that presence of fullerene in the silica gel structure led to appearance of new active centers of medium-molecular-mass peptides adsorption those had reactive capacity and irreversible bound peptides to adsorbent.

*Ключевые слова к обеим статьям: адсорбция, десорбция, пептиды, фуллерен*