



УДК 544.723, 543.544

Влияние режима термической подготовки силикагеля на его адсорбционные свойства по отношению к молекулам средней массы

Меленевская Е.Ю

Институт Высокмолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

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, прошедшими термическую подготовку в режимах, близких к условиям стерилизации. Анализ спектров оптического поглощения показал, что используемые режимы термической подготовки исходного силикагеля приводят к увеличению его адсорбционной емкости по отношению именно к СМП ишемического происхождения. Из анализа масс-спектров установлено, что в результате контакта с адсорбентом из раствора были удалены фракции с массами 900-1000 Да. Показано, что эти фракции связаны с адсорбентом необратимо и не могут быть десорбированы щелочным раствором. Наблюдаемые принципиальные изменения массового состава СМП ишемического происхождения выявили, что использованная термическая подготовка силикагеля приводит к образованию новых адсорбционных центров, которые обладают реакционной способностью по отношению именно к фракции СМП ишемического происхождения и селективно связывают их с адсорбентом

Введение

В настоящее время установлено, что характер адсорбционных процессов на силикагеле по отношению к молекулам средней массы (СМП) изменяется в присутствии на его поверхности молекул фуллерена [1]. Интерес к этим процессам по отношению к СМП был обусловлен тем, что они являются продуктами протеолиза белков, имеют строение, близкое к регуляторным пептидам и могут оказывать влияние, согласно [2,3], на жизнедеятельность всех систем и органов. Из-за многообразия вызываемых этими веществами патофизиологических изменений на молекулярном, клеточном и системном уровнях в организме к ним применимы основные критерии токсичности. Из существующих методов снижения

концентрации СМП в плазме крови особый интерес представляют сорбционные технологии [4], которые позволяют, используя метод плазмсорбции, избирательно удалять специфические субстанции, имеющие непосредственное отношение к развитию патологического процесса. Однако эффективность такого подхода определяется наличием высокоемкого и высокоселективного адсорбента, направленного на адсорбцию определенных СМП. Известно, что адсорбционные свойства силикагелей определяются наличием на их поверхности гидроксильных групп, протонодонорных и электроноакцепторных центров, механизм действия которых был изучен с помощью спектральных методов [5-7]. Их соотношение и значимость в процессе адсорбции зависят от режима термической подготовки силикагеля, которая может привести к радикальным изменениям свойств поверхности силикагеля. В данной работе для варьирования адсорбционных свойств силикагелей по отношению к СМП были использованы температурные режимы, близкие к условиям стерилизации.

Эксперимент

В работе использован аморфный силикагель *КСК*, диаметр пор 100 нм, удельная поверхность 150 м²/г, общий объем пор 0.89 мл/г. Термическую подготовку силикагеля проводили в соответствии со следующими схемами: образец 1 - выдержка в вакууме 10⁻³ мм рт.ст., 4 ч при 650 °С; образец 2 - кипячение при 100 °С в воде 24 ч. Исследованы СМП 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 [8]. СМП растворяли в стандартном изотоническом растворе натрия хлорида рН 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 приготовленного раствора СМП, и все перемешивали в течение 30 мин. После этого растворы центрифугировали, отбирали растворы СМП над адсорбентом для определения остаточных концентраций СМП в растворе. 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.

Исследования состава пула СМП в растворах до и после адсорбции и десорбции выполнены методом оптической спектроскопии и масс-спектрометрии.

Регистрация спектров оптического поглощения растворов СМП в области длин волн 200-700нм проводилась на спектрофотометре СФ2000 с разрешением 4нм в идентичных условиях с использованием кювет одинаковой геометрии. Относительные концентрации СМП были рассчитаны как площади под спектрами исходного раствора ($S_{исх}$), остаточного ($S_{ост}$) и после десорбции ($S_{дес}$). Кроме того, были рассчитаны разностные спектры и их площади $S_{разн}$, характеризующие концентрацию СМП, необратимо связанных с адсорбентом. С использованием этих данных были рассчитаны следующие параметры адсорбции: коэффициент элиминирования $K_{эл} = [(S_{исх} - S_{ост}) = S_{разн}] / S_{исх}$, коэффициент десорбции $K_{дес} = S_{дес} / S_{исх}$ и доля СМП, связанных с адсорбентом, $W_{связ} = (S_{разн} - S_{дес}) / S_{исх}$.

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.

Результаты и их обсуждение

На рис.1 для каждого образца адсорбента приведены спектры поглощения остаточных растворов СМП после адсорбции в сравнении с исходным раствором. Видно, что в спектре исходного пула СМП и СМП после контакта с адсорбентами разрешаются 2 полосы поглощения: в области 203-205нм и в области 280нм. Соотношение их при адсорбции практически не изменяется. В таблице приведены значения $K_{эл}$, рассчитанные по вышеприведенному соотношению. Видно, что образцы адсорбентов 1 и 2 имеют высокие значения $K_{эл}$, большие 0.5. Это позволяет рекомендовать их к применению в эфферентной терапии для выведения СМП из плазмы крови. В то же время $K_{эл}$ исходного силикагеля, не прошедшего выше описанную термическую подготовку, имеет низкое значение, равное 0.15. Таким образом, из спектров рис.1 и данных таблицы можно заключить, что оба использованных термических режима подготовки силикагеля приводят к увеличению адсорбционной емкости по отношению к СМП.

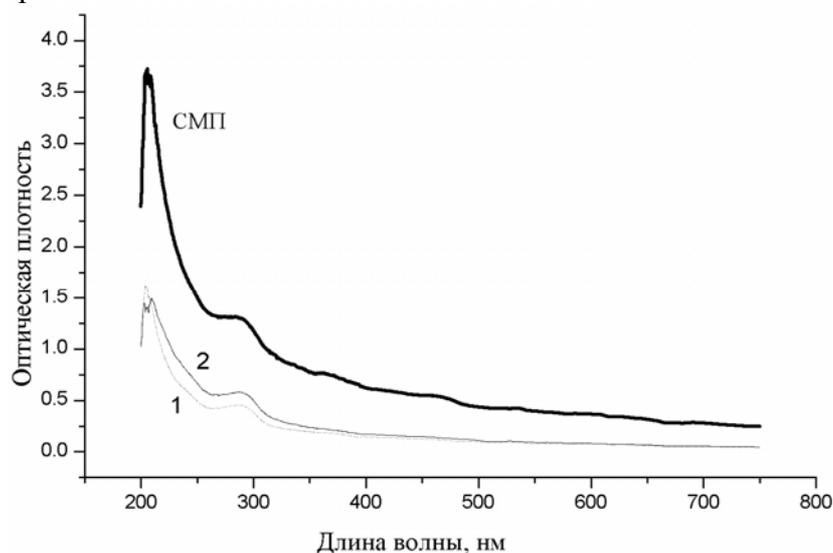


Рис.1. Спектры оптического поглощения – адсорбция: СМП – исходный раствор, 1- остаточный раствор после контакта с адсорбентом 1, 2- остаточный раствор после контакта с адсорбентом 2

На рис. 2, 3 приведены спектры десорбированных СМП соответственно с адсорбентов 1 и 2, и они сравниваются с разностными спектрами. Разностные спектры характеризуют состав СМП, который можно было бы наблюдать экспериментально в случае отсутствия химического взаимодействия между адсорбентом и СМП. Для обоих адсорбентов видно существенное различие спектров как по форме, так и по площади, т.е. по концентрации СМП.

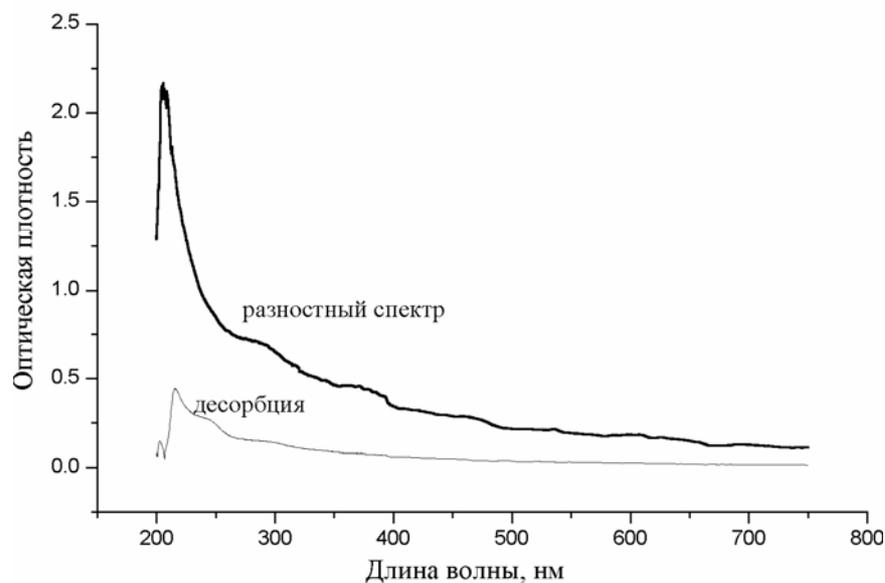


Рис. 2. Спектр десорбированных СМП 1 и разностный спектр для адсорбента 1

В таблице приведены значения $K_{\text{дес}}$, характеризующие степень десорбции СМП с адсорбента, и $W_{\text{связ}}$, характеризующие долю СМП, химически прочно связанных с адсорбентом. Эти два параметра рассчитаны по экспериментальным данным рис. 1-3. Малые значения $K_{\text{дес}}$, так же как и различия значений $K_{\text{дес}}$ и $W_{\text{связ}}$, указывают на частичную десорбцию СМП с силикагеля, обусловленную прочным связыванием СМП на силикагеле. При этом наименьшее значение $K_{\text{дес}}$ и наибольшее $W_{\text{связ}}$ наблюдаются при гидротермальном прогреве силикагеля.

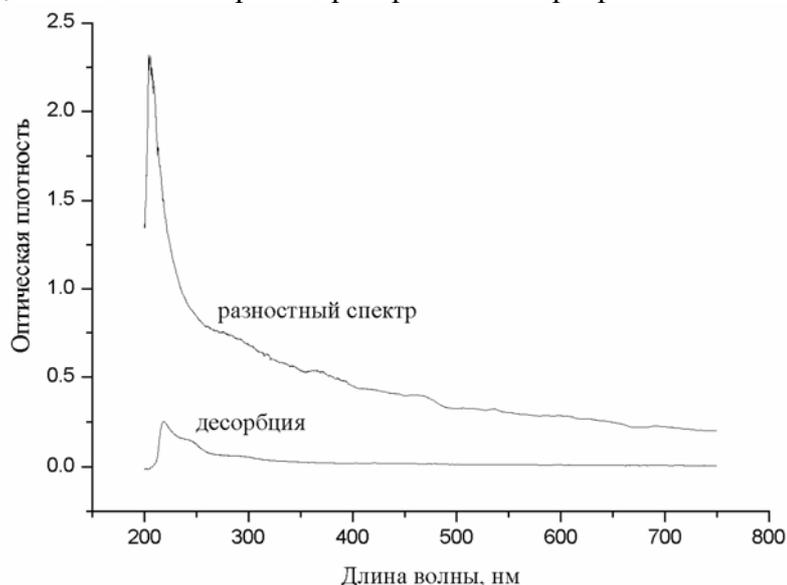


Рис. 3. Спектр десорбированных СМП 1 и разностный спектр для адсорбента 2

На рис. 4-6 приведены масс-спектры раствора СМП до и после его контакта с образцами адсорбентов 1 и 2. В спектре исходного СМП (рис.4) присутствуют группы полос с массами в областях 271Да, 500-546Да, и 990-1047Да. После адсорбции на силикагелях 1 и 2 (рис.5,а, ба) сохраняется только 2 группы пиков, с массами 213-255, 512-806Да. В то же время пики с массами, большими 992 Да

отсутствуют в масс-спектрах после адсорбции. Таким образом, в результате контакта СМП с адсорбентами происходят значительные изменения массового состава СМП: появляются фракции, которые отсутствовали в исходных СМП, и исчезают фракции с большими массами, которые присутствовали в исходных СМП.

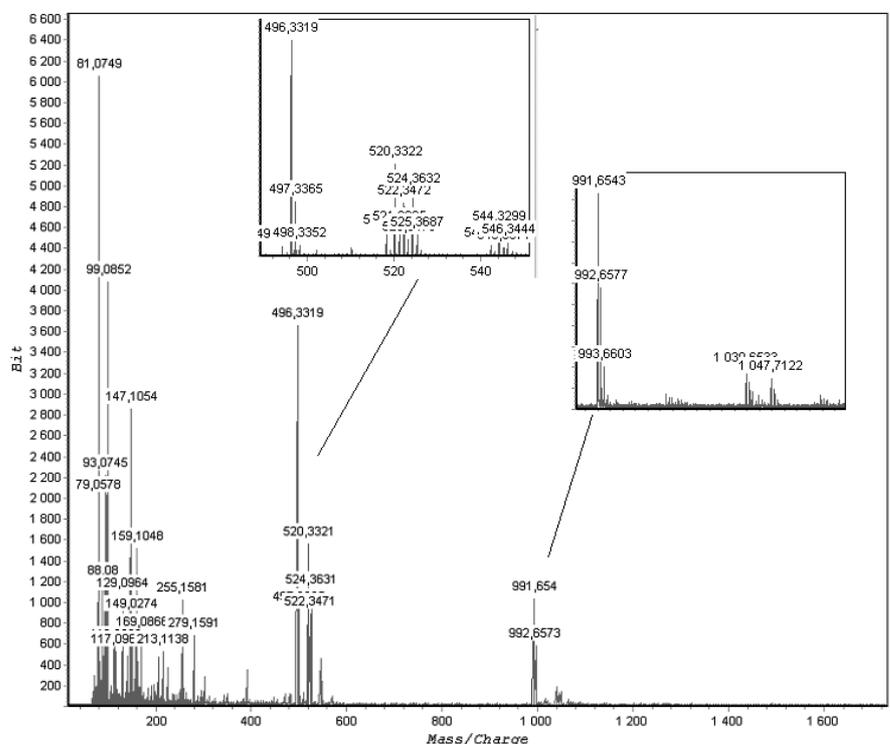


Рис.4. Масс-спектр исходного раствора СМП

Согласно работе [9], при наличии в плазме крови пациентов высокого уровня пептидов с массой 800-1000Д возрастает тяжесть клинического течения ишемической болезни сердца. Их содержание зависит от степени поражения коронарного бассейна и коррелирует с тяжестью клинического состояния, обусловленного перенесенным инфарктом миокарда или гипертонической болезнью. Термическая подготовка силикагеля обеспечивает удаление из пула СМП именно эти тяжелые пептиды.

Масс- спектры образцов СМП после их десорбции с адсорбентов 1 и 2 представлены на рис. 5,в, 6,в. Видно, что массовый состав десорбированных СМП в обоих случаях содержит только 2 группы пиков: 234-271 и 512-610Да. Это позволяет сделать вывод, что все СМП с массами выше 780Да адсорбируются необратимо. Этот результат подтверждает вывод о хемосорбционном механизме связывания СМП с адсорбентом, сделанный выше при анализе оптических спектров, и позволяет предполагать, что термическая подготовка силикагеля в условиях, близких к стерилизации, приводит к образованию новых реакционно-способных центров. Эти центры определяют адсорбционную емкость и селективность такого адсорбента по отношению к СМП с массами 800-1000Да.

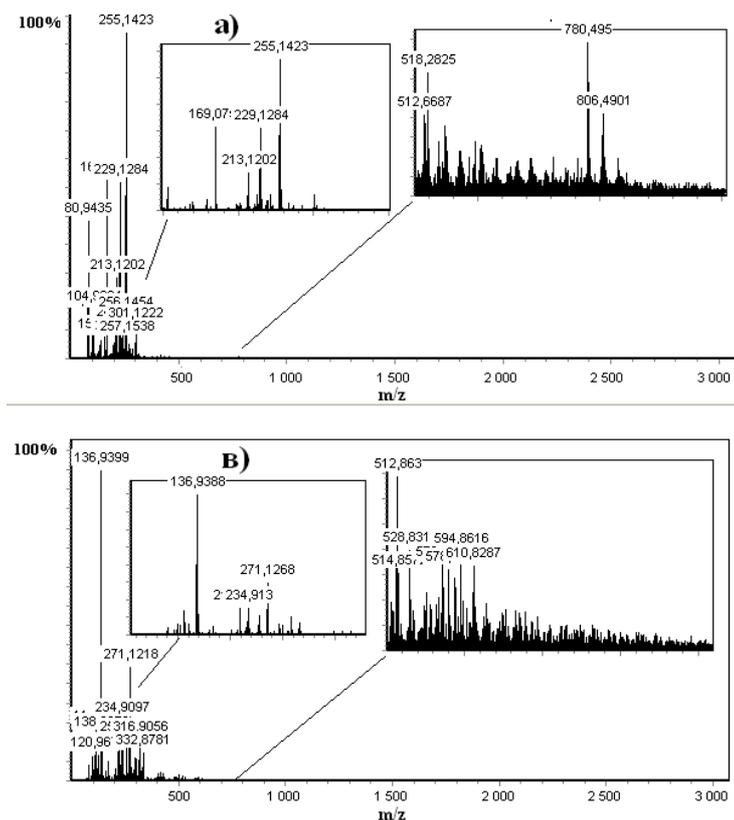


Рис. 5. Масс-спектры растворов СМП после адсорбции (а) и десорбции (в) – силикагель 1

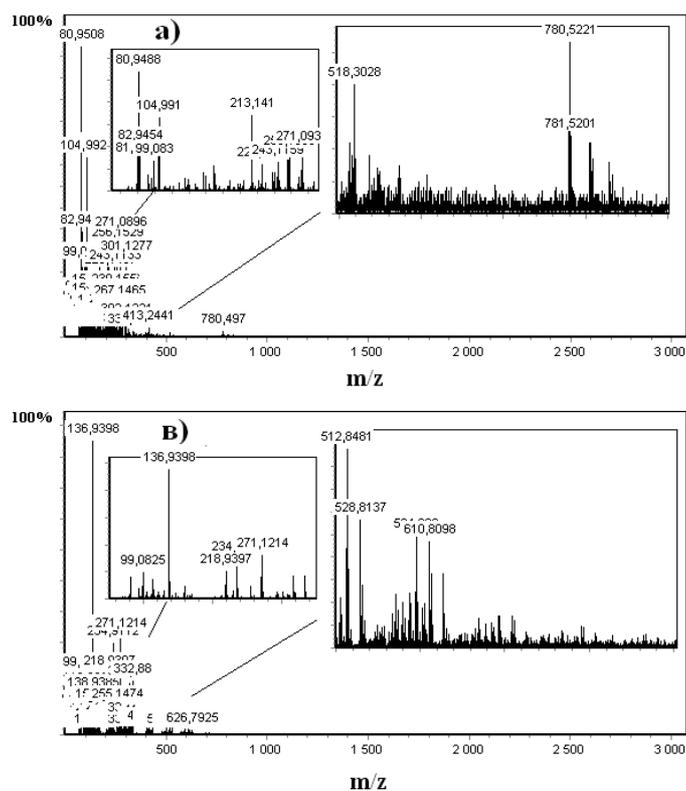


Рис.6. Масс-спектры растворов СМП после адсорбции (а) и десорбции (в) – силикагель 2

Аналогичные данные были нами ранее получены при исследовании адсорбционных свойств силикагеля по отношению к СМП в присутствии молекул фуллерена [1]. Было показано, что механизм взаимодействия СМП с силикагелем в присутствии фуллерена, приводящий к образованию прочных связей СМП и силикагеля, носит ярко выраженный химический характер. Термическая подготовка силикагеля также приводит к образованию новых реакционных центров. При этом параметрами, определяющими зависимость коэффициентов десорбции СМП и доли их связывания от режимов термической подготовки силикагелей, могут быть природа и число центров взаимодействия силикагеля с СМП.

Природа активных центров силикагеля, реакционно-способных по отношению к СМП, определяется химическими свойствами функциональных групп поверхности силикагеля и СМП. Пептиды содержат на одном конце аминогруппу, проявляющую основные свойства, а на другом – карбоксильную группу, проявляющую кислотные свойства. Значимость этих групп в связывании СМП с адсорбентом зависит от рН среды и от функциональных групп, присутствующих на поверхности адсорбента. Как хорошо известно, адсорбционными центрами на поверхности силикагеля являются гидроксильные группы силанольных групп и адсорбционно-связанной воды. Исследованные образцы силикагеля в зависимости от способов их термической подготовки, согласно [5-7], различаются по содержанию воды, адсорбированной порами и связанной с функциональными группами силикагеля, и по содержанию свободных силанольных групп на его поверхности. Так, концентрация адсорбированной воды при термическом прогреве в вакууме при 100 °С составляет 1.05 ммоль/г SiO₂, и при 650 °С

Таблица 1. Характеристики адсорбции СМП разными адсорбентами

Адсорбент	Подготовка силикагеля	K _{эл}	K _{дес}	W _{связ}
Исходный силикагель		0.15		
Силикагель 1	Термическое прогревание	0.54	0.1	0.43
Силикагель 2	Гидротермальное прогревание	0.65	0.04	0.6

0 ммоль/г SiO₂, в то время как при кипячении силикагеля в воде при 100 °С (гидротермальная подготовка) она составляет 2.7 ммоль/ г SiO₂. В свою очередь, концентрация свободных силанольных групп изменяется незначительно. Так, при термическом прогреве в вакууме при 650 °С она составляет 0.316 OH / г SiO₂, а при гидротермальном режиме при 100 °С – 0.375 OH / г SiO₂. Так как концентрация силанольных групп незначительно зависит от режима термической подготовки, то их присутствие в адсорбенте 1 определяет нижнюю границу значений K_{эл}. Верхняя граница значений K_{эл} определяется присутствием адсорбированной воды. Таким образом, различие значений K_{эл} и K_{дес}, приведенных в таблице, обусловлено присутствием протонодонорных центров, концентрация которых заметно убывает при термическом прогреве силикагеля при 650 °С. Основными центрами, определяющими адсорбцию СМП на таком силикагеле, полученном при гидротермальной подготовке исходного силикагеля, является адсорбционно-связанная вода, инициирующая кислотно-основной механизм специфического взаимодействия СМП с силикагелем. Прочность связывания СМП с поверхностью, имеющей гидратную оболочку, согласно [6], зависит от строения СМП.

Наибольшая наблюдается для СМП, содержащих сильнополярные кислотные группы, способные образовать со структурными элементами поверхностного слоя силикагеля прочные адсорбционные комплексы, которые не могут быть разрушены щелочью.

Заключение

Таким образом, на основании оптических измерений выявлено, что адсорбционная емкость силикагеля по отношению к СМП ишемического происхождения может быть увеличена путем термической подготовки.

На основании масс-спектров растворов СМП сделан вывод о существенных изменениях массового состава СМП при адсорбции: удаление высокомолекулярных фракций СМП с массами 780-1047 Да. Полученные результаты показывают, что связывание СМП с силикагелем имеет не только физический, но и химический характер.

Список литературы

1. Галль Л.Н., Подосенова Н.Г., Меленевская Е.Ю., Романенко С.М., Шаронова Л.В., Крюкова Е.Г. Влияние фуллерена на адсорбционные свойства силикагеля по отношению к среднемолекулярным пептидам. // Эфферентная терапия 2007, №3, с.19-22.
2. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации. // Эфферентная терапия, 1995, т.1, №1, с.61-63
3. Галактионов А.Г., Цейтин В.М., Леонова В.И. и др. Пептиды группы «средних молекул». // Биоорганическая химия, 1984 т.1, №10, с.5-17.
4. Лопаткин Н.А. Лопухин Ю.М. // Эфферентные методы в медицине, Москва, Медицина, 1989, с.91
5. Айлер Р. // Химия кремнезема, М., Мир, 1982, т.2, с.857-901.
6. Чуйко А.А. Кремнеземы в медицине и биологии. // Сб. научных трудов под ред. Акад. АН Украины А.А. Чуйко. Киев-Ставрополь, 1993, с. 4-41
7. Соболев В.А., Чуйко А.А., Тертых В.А., Машенко В.М., Исследование связанной воды на поверхности аэросила методом количественной инфракрасной спектроскопии // Сб. Связанная вода в дисперсных системах, 1974, МГУ, вып.3, с.62-72.
8. Малахова М.Я., Соломенков А.В., Беляков Н.А. Определение фракции молекул средней массы в сыворотке крови осаждением белков ТХУ и ультрафильтрацией. // Лаб. дело, 1987, №3, с.224—226.
9. 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.

Influence of thermal treatment of silica gel on its adsorption properties with respect to medium-molecular-mass peptides

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

* *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences*

** *Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences*

****Ioffe Physico-Technical Institute, Russian Academy of Sciences*

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 subjected to thermal preparation in regimes similar to sterilization conditions. The optical absorption spectra analysis shown that the initial silica gel thermal treatment regimes in use led to increase of adsorption capacity with respect to medium-molecular-mass peptides of ischemia origin, namely. From the mass-spectra analysis was found that, as a result of medium-molecular-mass peptides and adsorbent contact, fractions with masses 900-1000Da were removed from the solution. It was shown that these fractions were bound with the adsorbent irreversible and could not be desorbed with alkaline solution. Fundamental changes of mass-content of ischemia-origin medium-molecular-mass peptides revealed that thermal preparation of silica gel led to formation of new active centers of medium-molecular-mass peptides adsorption those have reactive capacity with respect to medium-molecular-mass peptides of ischemia origin, namely, and irreversible bound those to adsorbent.

Ключевые слова: адсорбция, десорбция, пептиды, фуллерен