

УДК 543.544.414, 544.023.221

© О. А. Кельцьева, В. Д. Гладилович, А. Н. Прусаков, П. Д. Колоницкий, Н. Г. Суходолов, А. А. Селютин, Н. В. Краснов, Е. Ю. Бонитенко, Е. П. Подольская

РЕГУЛЯРНЫЕ МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОРБЕНТЫ (РММС). ПОЛУЧЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ И СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ

Работа посвящена синтезу регулярных мультимолекулярных структур на основе стеаратов железа и определению их сорбционной емкости по отношению к пептиду SSNGHVY_pGKLSSI методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Было показано, что полученные структуры обладают высокой сорбционной емкостью и могут быть использованы как сорбенты для металл-аффинной хроматографии применительно к биологическим объектам.

Кл. сл.: регулярные мультимолекулярные структуры, стеарат железа, удельная поверхность, металл-аффинные сорбенты, аффинная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с появлением новых высокочувствительных методов анализа белковых соединений в последние годы особое внимание уделяется разработке методик специфичного выделения из сложных образцов фосфорилированных пептидов с помощью металл-аффинных сорбентов. Стоит отметить, что фосфорилирование белков является одним из ключевых регуляторных процессов в организме. Нарушение процесса фосфорилирования через ингибирование или активацию ферментов протеинкиназ может вызывать такие последствия, как злокачественная трансформация, приводящая к онкологическим или метаболическим заболеваниям, таким как диабет. В настоящее время поиск мишеней активации/ингибирования протеинкиназ активно востребован в современной фармакологии при разработке новых лекарственных средств для терапии онкологических и метаболических заболеваний. Было показано, что металл-аффинные сорбенты могут быть использованы при поиске аддуктов белков крови с отравляющими веществами (параоксон, иприт) [1, 2]. Таким образом, металл-аффинная хроматография является высокоспецифичным методом пробоподготовки, который успешно применяется при решении многих протеомных задач для снижения числа маскирующих пептидов в образце.

Однако существующие металл-аффинные сорбенты являются продуктами зарубежного производства, что, во-первых, ставит аналитиков в зависимость от импортной поставки, во-вторых, при-

водит к значительному увеличению стоимости процесса анализа в силу высокой закупочной цены. В последние годы появились работы, посвященные синтезу и исследованию новых металл-аффинных сорбентов в лабораторных условиях [3–8], но процессы, описываемые в данных работах, достаточно трудновыполнимы и также требуют значительных финансовых затрат.

В связи с этим становится очевидной необходимость разработки и получения новых материалов, которые по своим структурным особенностям могли бы эффективно выполнять функции металл-аффинных сорбентов.

Пленки Лэнгмюра—Блоджетт [9, 10] или системы, полученные путем диспергирования монослоев жирной кислоты, снятых с поверхности водной субфазы, содержащей соли металлов, представляют собой регулярные мультимолекулярные структуры, в которых поверхность состоит преимущественно из ионов металлов, надежно связанных с поверхностью твердого тела.

Ранее был разработан метод синтеза регулярных мономолекулярных наноструктур на основе стеарата железа (III), и масс-спектрометрически определено, что для них основным структурным звеном является дистеарат железа (III) [11], при образовании которого задействованы только две валентные возможности металла. При этом третий заместитель может быть различным и связь металла с ним слабее, чем с остатками стеариновой кислоты, что позволяет, согласно теории Пирсона, предположить возможность взаимодействия иона железа с фосфорилированными пептидами и соот-

ветственно использование данной структуры в качестве металл-аффинного сорбента.

Стоит отметить, что получение регулярных структур по методу Лэнгмюра—Блоджетт обладает рядом преимуществ. Во-первых, он позволяет без значительных экономических затрат воспроизводимо получать молекулярные моно- и мульти-слои на основе солей стеариновой кислоты. Во-вторых, при его реализации не возникает необходимости использования вакуума, высоких температур и давлений. Кроме того, уникальность метода заключается в возможности послойно увеличивать толщину пленки, формирующейся на твердой поверхности (причем толщина каждого слоя определяется размерами молекулы используемого органического вещества), и строго контролировать структурное совершенство получаемых пленок.

Таким образом, целью данной работы был синтез и охарактеризация в качестве металл-аффинных сорбентов регулярных мультимолекулярных структур на основе стеаратов железа (РММС Fe(III)).

МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ СОРБЕНТА И ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение РММС Fe(III)

В специальной ванне на поверхность водной субфазы был нанесен по каплям раствор поверхностно-активного вещества (ПАВ) в подходящем неполярном легколетучем органическом растворителе. Раствор ПАВ растекался по поверхности водной субфазы, образуя монослой, ограниченный бортами ванны и подвижными

барьерами, которые могут регулировать поверхностное давление в образовавшемся монослое. В качестве субфазы использовали 10^{-4} М водного раствора хлорида железа (III) объемом 1.5 л (для ванны размером $500 \times 150 \times 20$ мм). В качестве ПАВ на субфазу наносили 30 мкл насыщенного раствора стеариновой кислоты (HSt) в гексане. После испарения гексана с поверхности водной субфазы на поверхности образовывался монослой стеариновой кислоты, который после прохождения реакции с ионами субфазы медленно сжимали с помощью подвижных барьеров. При достижении определенного давления монослой коллапсировал (ломался), и отдельные части монослоя наползали друг на друга (рис. 1). Таким образом, были получены многослойные регулярные структуры, состоящие из продуктов взаимодействия стеариновой кислоты с ионами металла субфазы. Полученные частицы собирали с поверхности раствора в микропробирку и в дальнейшем использовали в качестве сорбента.

Определение удельной поверхности сорбента

Удельную поверхность определяли по методу тепловой десорбции аргона (газохроматографическим методом) по стандартной методике [12]. В качестве образцов для проведения эксперимента были выбраны вещества, близкие по строению к структуре сорбента — стеариновая кислота (HSt) и пальмитат алюминия.

Определение сорбционной емкости сорбента

Предварительно взвешенную спиновую колонку (размер пор — 0.45 мкм) заполняли сорбентом, колонку помещали в микропробирку на 1.5 мл и с помощью центрифуги (15 с, 3000 об./мин) отделяли консервирующий раствор (TFA 0.1 %). Далее колонку с сорбентом взвешивали и по разности масс устанавливали массу сорбента. Были приготовлены две порции раствора, содержащего пептид SSNGHVY_pGKLSSI в концентрации 20 мг / мл. Одну порцию наносили на сорбент (таким образом, чтобы количество пептида составило 20 % от массы сорбента), вторую часть сохраняли для хроматографического анализа. Колонку инкубировали на качающейся платформе в течение 15 мин. Затем жидкую фазу отделяли с помощью центрифугирования (30 с, 3000 об. / мин). Проскок сохраняли для дальнейшего анализа. Далее наносили на сорбент 100 мкл 5 % раствора аммиака, после чего центрифугировали 30 с при 3000 об./мин. Элюат сохраняли для анализа. Определение количества пептида в образцах проводили с помощью жидкостного хроматографа "Миличром А-02" с исполь-

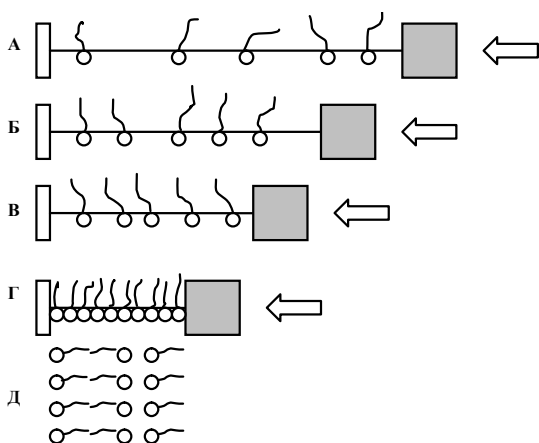


Рис. 1. Фазовые состояния монослоя жирной кислоты при различной степени его сжатия. А — двумерный газ, Б — изотропная жидкость, В — жидкий кристалл, Г — твердый кристалл, Д — коллапсированная структура

зованием метода внешнего стандарта при следующих характеристиках: колонка Prontosil C18; размер колонки 2×120 мм; зерно 5.0 мкм; скорость подачи элюентов 200 мкл / мин; градиент элюции 10–90 % элюента В; длина волны на спектрофотометрическом детекторе 280 нм; объем контрольного образца, взятый на анализ — 3 мкл; объем образца проскока, взятый на анализ — 10 мкл.

В качестве элюентов использовались растворы объемом 200 мл:

- А — 0.25 % раствор уксусной кислоты в дистиллированной воде;
- В — 0.25 % раствор уксусной кислоты в ацетонитриле.

Приготовленные элюенты фильтровали через фильтр с размером пор 11 мкм во избежание попадания частичек пыли в прибор и выдерживали 20 мин в ультразвуковой ванне для дегазации.

Определение влажности сорбента

В предварительно взвешенную спиновую колонку помещали 30 монослоев сорбента, и с помощью центрифуги (15 с, 3000 об. / мин) отделяли лишнюю жидкость. Затем колонку взвешивали и по разности масс устанавливали массу влажного сорбента. Далее на колонку наносили ацетон в таком количестве, чтобы сорбент был погружен в слой ацетона полностью. С помощью центрифуги (15 с, 5000 об. / мин) ацетон отделяли и колонку с сорбентом выдерживали в вакуумном эксикаторе в течение 30 мин до полного высыхания сорбента. Затем колонку взвешивали и устанавливали массу сухого сорбента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТА

В связи со спецификой металл-аффинного анализа биологических образцов, сорбенты должны соответствовать следующим требованиям:

1. ионы металла должны быть доступны для исследуемых молекул;
2. ионы металла должны находиться в активной форме;
3. ионы металла не должны переходить в раствор вместе с исследуемым веществом.

Эти требования трудно удовлетворимы из-за того, что на поверхности твердого тела металл находится чаще всего в форме оксидов. Однако пленки Лэнгмюра—Блоджетт или системы, полученные путем диспергирования коллапсированных монослоев стеариновой кислоты, снятых с поверхности водной субфазы, содержащей ионы Fe(III), имеют поверхность, которая состоит преимущественно из ионов железа, надежно связанных с поверхностью твердого тела. Ранее было

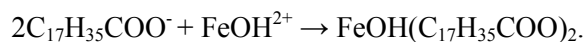
проведено масс-спектрометрическое исследование состава таких пленок и было показано, что основным структурным звеном монослоя является St_2Fe^+ [11], что позволило сделать предположение о том, что описанные структуры могут являться металл-аффинными сорбентами, а содержание в них железа (III) обуславливает их специфичность к фосфорсодержащим пептидам.

Пептиды можно отнести к макромолекулам. Молекулярные массы пептидов, успешно анализируемых методом MALDI-масс-спектрометрии, варьируются в диапазоне 1000–3000 Да. Можно ожидать, что адсорбция больших органических молекул должна эффективно проходить на поверхности коллапсированных монослоев. Таким образом, регулярные мультимолекулярные структуры (пленки Лэнгмюра—Блоджетт), содержащие железо (III) (РММС Fe(III)), могут соответствовать требованиям, предъявляемым металл-аффинным сорбентам.

ОХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СОРБЕНТА

Получение РММС Fe(III)

При образовании монослоя стеариновой кислоты на субфазе происходит гетерофазная реакция взаимодействия ионов Fe^{3+} со стеарат-ионами. При этом образуются стеараты железа, которые нерастворимы в воде и плохо растворяются в большинстве органических растворителей,



Таким образом, при взаимодействии монослоев стеариновой кислоты с ионами Fe^{3+} водной субфазы образуется мономолекулярный слой, который при коллапсировании легко переносится в устройство, используемое как хроматографическая колонка, и применяется в качестве сорбента.

Определение удельной поверхности РММС Fe(III)

В качестве образцов для проведения эксперимента были выбраны вещества, близкие по строению к исследуемому РММС Fe(III) — стеариновая кислота и пальмитат алюминия, т. к. получить значения удельной поверхности для наших структур не представилось возможным из-за необходимости синтеза больших количеств образца на анализ (более 1000 монослоев).

Удельную поверхность исследуемых образцов находили по формуле (1)

$$S_{\text{уд}} = \frac{A \cdot x}{g}, \quad (1)$$

Данные хроматографического исследования

Образец	Объем образца, взятого на анализ (мкл)	Высота хроматографического пика (отн. ед.)	Полуширина хроматографического пика (мкл)	Площадь хроматографического пика (отн. ед. × мкл)	Приведенная площадь
Исходный раствор (SSNGHVY _p GKLS SI)	3	0.88	44.18	40	133.2
Проскок с PMMC Fe(III)	10	1.29	44.91	60	60

где S — удельная поверхность исследуемого образца, $\text{м}^2/\text{г}$; A — коэффициент интегратора, равный $0.000085 \text{ м}^2/\text{ед.}$; x — величина сигнала десорбции, ед.; g — навеска исследуемого образца:

$$S_{\text{yO}}^{\text{HSt}} = \frac{0.000085 \cdot 2502}{0.0871} = 2.44 \text{ м}^2/\text{г},$$

$$S_{\text{yO}}^{\text{C}_{48}\text{H}_{95}\text{O}_7\text{Al}} = \frac{0.000085 \cdot 15422}{0.326} = 4.02 \text{ м}^2/\text{г}.$$

Столь малые значения удельной поверхности свидетельствуют об отсутствии пористости. Близкие значения удельной поверхности для различных жирных кислот и солей на их основе позволяют оценить удельную поверхность и для сорбентов на основе стеариновой кислоты, содержащих ионы железа (III).

Расчет удельной поверхности PMM-сорбента

Размеры частиц сорбента были измерены с помощью анализатора Zetaciser NANO ZC, их радиус составил 200 нм. Это позволяет рассчитать значение удельной поверхности. Предположив, что полученные структуры имеют низкую пористость и форму, близкую к сферической, была рассчитана масса одной частицы:

$$m = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho, \quad (2)$$

где ρ — плотность стеарата; r — радиус частицы, мм. Для большинства стеаратов плотность лежит в интервале $1.01\text{--}1.08 \text{ г}/\text{мл}$.

Было рассчитано число частиц в 1 г

$$n = \frac{3}{4} \pi r^3 \rho, \quad (3)$$

а также площадь поверхности одной частицы

$$S_1 = 4\pi r^2. \quad (4)$$

Удельная поверхность была определена по формуле (5):

$$S_{\text{yO}} = \frac{S_1}{m} = \frac{4 \cdot \pi r^2}{\frac{4}{3} \cdot \pi r^3 \rho} = \frac{3}{r \rho} = \frac{3}{0.2} = 15 \text{ м}^2/\text{г}. \quad (5)$$

Рассчитанное значение удельной поверхности имеет немного большее значение, чем найденное экспериментально, что можно объяснить дополнительным ультразвуковым диспергированием монослоя сорбента при подготовке к микроэлектрофоретическим исследованиям.

Определение емкости PMMC Fe(III)

Сорбционная емкость PMMC Fe(III) была определена по разнице концентраций пептида SSNGHVY_pGKLSSI в образцах до и после проведения сорбции методом ВЭЖХ (C-18) с помощью хроматографа "Миличром А-02". Данные хроматографического исследования приведены в таблице.

Для подтверждения соответствия пика хроматограммы анализируемому пептиду были получены MALDI-масс-спектры как исходного раствора пептида SSNGHVY_pGKLSSI с концентрацией $20 \text{ мг}/\text{мл}$, так и образца, содержащего проскок с сорбента (рис. 2).

Как видно из рисунка, с сорбента действительно элюируется пептид SSNGHVY_pGKLSSI. Кроме того, стоит отметить, что в обоих масс-спектрах имеется сигнал, соответствующий нефосфорилированной форме пептида, причем в масс-спектре проскока его интенсивность значительно выше. Это позволяет сделать выводы, что соотношение

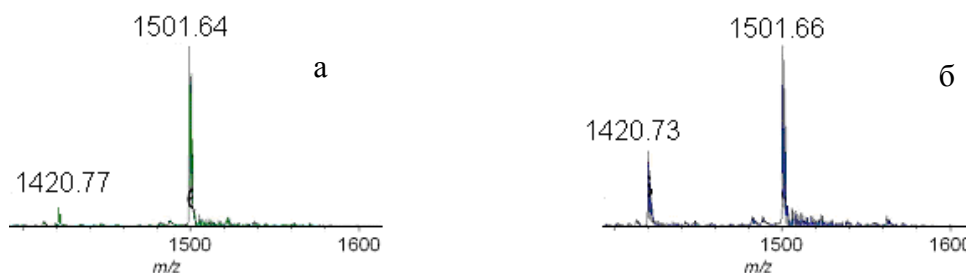


Рис. 2. MALDI-масс-спектры исходного образца (а), содержащего пептид SSNGHVY_pGKLSSI и проскока с сорбента PMMC Fe(III) (б)

фосфорилированной формы и нефосфорилированной меняется в сторону уменьшения количества фосфорилированного пептида, который задерживается на PMMC Fe(III).

По концентрации исходного раствора было определено количество пептида. Величина составила 1.08 мг. На хроматограмме такому количеству пептида соответствует пик с площадью 133.2 отн.ед. × мкл. Площадь пика, соответствующего пептиду в проскоке, равна 60 отн.ед. × мкл. Составив пропорцию, вычислили количество сорбированного образца пептида, равное 0.52 мг, что составило 1.1 масс. % от массы влажного сорбента (54 мг). Влажность сорбента составила 65 масс. %. В пересчете на сухой сорбент (18.9 мг) сорбционная емкость составила 2.75 масс. %. Полученная сорбционная емкость PMMC Fe(III) более чем на порядок превышает технические характеристики коммерческого сорбента PHOS-Select Iron Affinity Gel (Sigma) [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате работы показано, что созданные PMMC Fe(III) обладают высокой сорбционной емкостью. Кроме того, применение методики Лэнгмюра—Блоджетт позволяет с небольшими затратами получать регулярные мультимолекулярные структуры, содержащие различные ионы металлов, которые, как и было показано на примере PMMC Fe(III), могут быть использованы для металл-аффинной хроматографии применительно к биологическим объектам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гладилов В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П. и др. Идентификация пептидов сывороточного альбумина, модифицированных фосфорорганическими соединениями, с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 4. С. 84–92.
2. Дубровский Я.А., Гладилов В.Д., Краснов И.А. и др. Металл-аффинная хроматография для выделения алкилированных аддуктов гемоглобина крысы // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38, № 1. С. 52–57.
3. Каньшин Е.Д., Нифантьев И.Э., Пшежецкий А.В. Синтез и тестирование новой аффинной фазы для обогащения и последующего масс-спектрометрического анализа фосфопептидов // Масс-спектрометрия. 2008. Т. 5, № 3. С. 195–202.
4. Li Y., Leng T., Lin H., Deng C., Xu X., Yao N., Yang P., Zhang X. Preparation of Fe₃O₄@ZrO₂ core-shell microspheres as affinity probes for selective enrichment and direct determination of phosphopeptides using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // J. Proteome Res. 2007. V. 6, № 11. P. 4498–4510.
5. Li Y., Liu Y., Tang J., Lin H., Yao N., Shen X., Deng C., Yang P., Zhang X. Fe₃O₄@Al₂O₃ magnetic core-shell microspheres for rapid and highly specific capture of phosphopeptides with mass spectrometry analysis // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1172, N 1. P. 57–71.
6. Li Y., Xu X., Qi D., Deng C., Yang P., Zhang X. Novel Fe₃O₄@TiO₂ core-shell microspheres for selective enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis // J. Proteome Res. 2008. V. 7, № 6. P. 2526–2538.
7. Li Y., Wu J., Qi D., Xu X., Deng C., Yang P., Zhang X. Novel approach for the synthesis of Fe₃O₄@TiO₂ core-shell microspheres and their application to the highly specific capture of phosphopeptides for MALDI-TOF MS analysis // Chem. Commun. (Camb.). 2008. V. 7, № 5. P. 564–566.
8. Qi D., Lu J., Deng C., Zhang X. Development of core-shell structure Fe₃O₄@Ta₂O₅ microspheres for selective enrichment of phosphopeptides for mass spectrometry analysis // J. Chromatogr. A. 2009. Jul 17; V. 1216, N 29. P. 5533–5539.
9. Янкович А.И. Регулярные мультимолекулярные структуры ПАВ — пленки Лэнгмюра—Блоджетт // Успехи коллоидной химии. Л.: Химия, 1991. С. 262–291.
10. Ковальчук М.В., Ключевская В.В., Фейгин Л.А. Молекулярный конструктор Ленгмюра—Блоджетт // Природа. 2003. № 11. С. 11–19.

11. Рожкова Е.А., Краснов И.А., Суходолов Н.Г. и др. Исследование свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра—Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18, № 4. С. 54–61.
12. Определение удельной поверхности твердых тел газохроматографическим методом: Методические указания. СПбГТИ(ТУ), 1998. 24 с.
13. Sigma-Aldrich. URL: (<http://www.sigmaaldrich.com>).

**Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург** (Кельцьева О.А., Гладилов В.Д.,
Краснов Н.В., Подольская Е.П.)

Институт токсикологии ФМБА России (Гладилов В.Д., Бонитенко Е.Ю., Подольская Е.П.)

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России (Прусаков А.Н.)

Санкт-Петербургский государственный университет (Колоницкий П.Д., Суходолов Н.Г., Селютин А.А.)

Контакты: Кельцьева Ольга Александровна,
keltcieva@gmail.com

Материал поступил в редакцию 2.05.2012

REGULAR MULTIMOLECULAR SORBENTS (RMMS). THE OBTAINING AND THE STUDY OF SURFACE AND SORPTION PROPERTIES

O. A. Keltsieva¹, V. D. Gladilovich^{1, 2}, A. N. Prusakov³, P. D. Kolonitsky⁴, N. G. Sukhodolov⁴,
A. A. Selyutin⁴, N. V. Krasnov¹, E. Yu. Bonitenko², E. P. Podolskaya^{1, 2}

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*

²*Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency of Russia*

³*State Scientific-Research Institute of Highly Pure Biomaterials of Medico-Biological Agency of Russia*

⁴*Saint-Petersburg State University*

The work deals with the synthesis of regular multimolecular structures based on iron stearates and determination of their sorption capacity in relation to the peptide SSNGHVY_pGKLSSI by the method of high performance liquid chromatography. It was shown that the obtained structures have a high sorption capacity and can be used as sorbents for metal-affine chromatography as applied to biological objects.

Keywords: regular multimolecular structures, iron stearate, specific surface area, metal-affine sorbents, affinity chromatography