

УДК 546.287.002.2

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПРИГОДНОГО К ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРРОМАГНИТНОГО КРЕМНЕЗЕМА, МОДИФИЦИРОВАННОГО КАРБОНИЗИРОВАННЫМ ЛИГНИНОМ И КАРБОДИИМИДОМ

Т.Н. Орлова, Е.Е. Афанасьева, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, Н.Ф. Василенко

(ФГУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь; e-mail: admnip@mail.stv.ru)

**Изучен состав природного алюмосиликата, на основе которого путем химического модифицирования получен ферромагнитный функциональный органокремнеземный сорбент, пригодный для иммобилизации различных биологически активных субстанций.**

В современной биотехнологии широко используются различные материалы, область применения которых определяется их свойствами по отношению к клеткам и биомолекулам с определенной структурой. Особое место среди них принадлежит высокодисперсным формам кремнезема, отличительной чертой которых является наличие высокоразвитой поверхности, покрытой гидроксильными группами [1].

Синтез кремнеземных носителей позволяет получить сорбенты, которым присущи положительные свойства неорганических матриц: химическая чистота, гидрофильность, отсутствие набухаемости в растворах, значительная адсорбционная емкость, жесткость остова, химическая и микробиологическая устойчивость, отсутствие токсичности.

Цель работы – получение ферромагнитных иммуносорбентов на основе прочной, технологичной матрицы, легко поддающейся модифицированию и обладающей минимальной неспецифической сорбцией.

### Методика эксперимента

Химический анализ силикатной породы проводили по методам, изложенным в [2]. ИК-спектры сорбентов исследовали на спектрофотометре “Specord” – 751R (Германия) в диапазоне волновых чисел 500–4000 см<sup>-1</sup>. В соответствии с методикой [3] определяли концентрацию аминогрупп органокремнеземного сорбента.

Удельную поверхность магносорбента (МС) определяли по низкотемпературной адсорбции азота. Суммарный объем и диаметр пор определяли методом ртутной порометрии на приборе “Аyto pore-9200” [4]. Микроструктуру сорбентов исследовали на сканирующем электронном устройстве “IMZ-T3000” по методике [5].

В работе использовали метод фракционирования белков (иммуноглобулинов класса G) с использованием высокомолекулярного нейтрального водорастворимого полимера – полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) [6].

Количественное определение белка проводили по методу [7] путем сравнения оптического поглощения белков при 280 и 260 нм.

### Экспериментальная часть

Синтез магносорбента с высокой сорбционной активностью осуществляли методом формирования пористой структуры носителя в присутствии органических полимеров.

В качестве основного структурного компонента, формирующего остов композиционного сорбционного материала, был использован природный алюмосиликат (Астраханское месторождение), имеющий следующие параметры: насыпная плотность 320 кг/м<sup>3</sup>, влажность при температуре 110°C 2,7%, влагоемкость 71%. Химический анализ показал, что в его состав (массовая доля) входят: SiO<sub>2</sub> (78 %), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (21%), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,8%), магний (44 мг/кг), марганец (9,4 мг/кг), цинк (10 мг/кг), кобальт (0,4 мг/кг), кальций (0,9 мг/кг).

Химическое модифицирование сорбента осуществляли в присутствии карбонизированного лигнина и карбодиимида. В качестве магнитного компонента при синтезе применяли магнетит (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). При обработке носителя органическим полимером – карбонизированным лигнином, содержащим карбоксильные группы, происходит активация его поверхности. При последующем модифицировании сорбента карбодиимидом (1-циклогексил-3(2-морфолинил-4-этил)карбодиимидметил-*n*-толуолсульфонат) (СМС) полученный продукт активируется функциональными группами,

способными к взаимодействию с лигандами белковой природы.

Процесс получения МС осуществляли следующим образом: к 1,5 г алумосиликата добавляли 100 мл 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4%-го водного раствора карбонизированного лигнина, а затем от 0,5 до 2,5 г магнитного порошка ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Смесь выдерживали от 1 до 16 ч при температуре  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Значение pH гелеобразования составляло 4,0–7,0. Полученный продукт высушивали при 100–115 $^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, измельчали и методом рассева выделяли фракции с размером частиц 80–120 мк. К сорбенту в последующем добавляли 9 мл ацетатного буфера (pH 4,0), содержащего 40 мг карбодиимида, и в течение 1 ч инкубировали смесь. Затем сорбент тщательно отмывали ацетатным буфером и дистиллированной водой.

На стадии гидрогеля при его созревании и синерезисе протекают дегидратационные процессы, что приводит к уменьшению объема гидрогеля, его уплотнению. При термообработке гидрогель превращается в ксерогель, при этом его объем уменьшается в 8–15 раз. Завершающие стадии процесса синтеза композиционного МС обеспечивают выделение высокодисперсной фракции и его активирование функциональными группами для последующей иммобилизации белковых лигандов. Получаемый композиционный МС представляет собой связанные друг с другом в пространственном каркасе частицы кремнезема, покрытые полимером – карбонизированным лигнином. Размер частиц определяет величину удельной поверхности МС, а плотность их упаковки – объем и радиус пор.

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о хорошей воспроизводимости технологии получения лигнинсодержащих композиционных МС, имеющих стандар-

тный состав и структурные характеристики. Для оптимизации структурных характеристик композиционных МС варьировали состав компонентов синтеза (алумосиликат, карбонизированный лигнин,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), а также время гелеобразования и pH среды.

Результаты экспериментов по оптимизации структурных характеристик МС показали, что при увеличении количества магнетита, вводимого в компонентный состав сорбента, наблюдается некоторое снижение величины удельной поверхности сорбента, увеличение объема и диаметра пор (табл. 1). Это обусловлено, вероятно, стабилизирующим действием магнетита железа, проявляющимся в противодействии процессу, связанному с укрупнением корпускулярных частиц в структуре композиционного сорбента. Исследования влияния продолжительности времени гелеобразования на структурные характеристики лигнинсодержащих оксидокремнеземных композиционных МС представлены в табл. 2. На наш взгляд, оптимальное время гелеобразования при синтезе сорбентов составляет 2 ч, так как при увеличении времени удлиняется процесс синтеза МС и уменьшается размер его пор, что приводит к снижению степени иммобилизации лиганда при ковалентном связывании в порах сорбента.

На основе проведенных исследований можно рекомендовать следующие оптимальные условия получения лигнинсодержащих МС: соотношение компонентов синтеза  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , карбонизированный лигнин – 1,5: 1:1 соответственно; время гелеобразования 2 ч; pH гелеобразования 7,0.

У получаемых образцов наблюдалась ярко выраженная губчатая, пористая структура. Дополнительный компонент синтеза (магнитный порошок) способствовал усилению срастания глобул.

МС представляли собой высокодисперсные микрогранулы неправильной формы с выраженными маг-

Таблица 1

Характеристика магносорбента в зависимости от количества магнетита, используемого в синтезе

Массовое соотношение компонента синтеза			Удельная намагничённость насыщения, МН, А·м <sup>2</sup> /кг	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Радиус пор, нм
SiO <sub>2</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	карбонизированный лигнин				
1,5	0,5	1	8,8±0,04	64,5±0,74	1,21±0,05	25,6±0,49
1,5	1,0	1	10,2±0,08	63,6±0,49	1,23±0,08	29,6±0,49
1,5	1,5	1	12,4±0,08	55,4±0,83	1,25±0,09	30,6±0,49
1,5	2,5	1	17,7±0,08	54,6±0,47	1,29±0,038	32,2±0,6

Т а б л и ц а 2

## Структурные характеристики магносорбента в зависимости от времени гелеобразования

Массовое соотношение компонента синтеза			Время гелеобразования, ч	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объем пор, см <sup>3</sup> /г	Радиус пор, нм
SiO <sub>2</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	карбонизированный лигнин				
1,5	1	1	2	63,0±0,84	1,23±0,09	29,7±0,29
1,5	1	1	4	65,0±0,51	1,23±0,08	25,6±1,12
1,5	1	1	8	69,6±0,6	1,21±0,02	23,7±0,45
1,5	1	1	16	71,4±0,52	1,21±0,08	21,6±0,49

нитными свойствами, обладающие хорошей смачиваемостью и эффективным оседанием в растворе, отсутствием склонности к конгломерации.

При определении концентрации аминогрупп алюмосиликатного сорбента с включенным оксидом железа показано, что значения концентрации аминогрупп находятся в пределах от 0,45 до 0,54 мг экв/г сорбента.

В ИК-спектрах алюмосиликатного сорбента полосы 3750 и 3680 см<sup>-1</sup> отвечали соответственно свободным и связанным гидроксильным группам. После химического модифицирования алюмосиликатного носителя карбонизированным лигнином в ИК-спектре наблюдалось уменьшение интенсивности поглощения в области полосы 3750 см<sup>-1</sup>. Одновременно обнаруживалось появление полосы поглощения в области 1650 см<sup>-1</sup> валентных колебаний –СН-групп, карбоксильных групп (–СООН) и аминогрупп (–NH<sub>2</sub>), а при 900 см<sup>-1</sup> – ароматических колец. Кроме того, полученный сорбент обнаруживал в своем спектре интенсивные полосы 2900 см<sup>-1</sup> –СН-связей, относимых к метиленовым группам [8].

Результаты рентгенофазного анализа показали, что в алюмосиликатном сорбенте обнаруживаются фазы неокисленного металла (Cu) и оксидов (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, ZnO), причем по интенсивности типов больше содержание оксида алюминия. Это согласуется с данными

химического анализа образцов алюмосиликатных сорбентов.

Для получения магноиммуносорбентов проводили иммобилизацию магносорбентов специфическими лигандами, в качестве которых использовали фракционированные полиэтиленгликолем-6000 иммуноглобулины класса G, выделенные из мышинной иммунной асцитической жидкости против вируса ЛЗН, и класса IgG, выделенные из крови больных боррелиозом [6].

Изучение кинетики процесса иммобилизации и проведенная количественная оценка ковалентного связывания иммуноглобулинов с сорбентом показали, что концентрация белка лиганда 2 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антителами сорбента в объеме 0,2 мл 10%-й взвеси. При использовании иммуноглобулинов с концентрацией белка больше 2 мг/мл адсорбционная емкость МИС снижалась. По всей видимости, зависимость адсорбционной емкости от количества иммобилизованного белка объясняется факторами стерического характера [8–12]. При изучении кинетики процесса иммобилизации и оценке связывания белкового лиганда с сорбентом установлено, что для полного насыщения МС белком достаточно 2 ч при значении рН раствора 6–7 и температуре от 22 до 37°C.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чуйко А.А., Горлов Ю.И. Кремнеземы в медицине и биологии. М., 1993. С. 4.
2. Афанасьева Е.Е., Ефременко В.И., Тюменцева И.С. и др. Деп. в ВИНТИ 23.01. 2007, № 66.
3. Гайда А.В., Староверов С.М. // ЖВХО им. Д.И. Менделеева. 1989. 34. № 3. С. 350.
4. Гиллербранд В.Ф., Лендель Г.Э., Брайт Г.А. и др. Практическое руководство по неорганическому анализу. М., 1960. С. 801.
5. Тертых В.А. // Адсорбция и адсорбенты. 1983. Вып. 11. С. 3.
6. Muller J., Pfeleiderer G. // Hoppe-Seylers Ztschr. Physiol. Chem. 1980. 361. N 5. P. 675.
7. Tanaka K., Shinoda S., Takai N. et al. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1980. 53. N 5. P. 1242.
8. Алиева Е.В., Таран А.В., Афанасьева Е.Е. и др. // Вестн. СГУ. 2006. Вып. 47. С. 292.
9. Муремец В.И., Наградова Н.К. Иммобилизованные олигомерные ферменты. М., 1984.

10. *Кельцев Н.В.* Основы адсорбционной техники. М., 1984. С. 280.
11. *Алиева Е.В.* // Вестн. СГУ. 2005. Вып. 42. С. 163.
12. *Кудрявцев Г.В., Староверов С.М.* // ЖВХО им. Д.И. Менделеева. 1989. № 3. С. 300.

Поступила в редакцию 10.09.07