

Н. П. Галаган, В. А. Распопина, В. В. Прокопенко, В. И. Богомаз

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНЫХ КРЕМНЕЗЕМОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СМЕСЕЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

*Рассмотрена адсорбционная способность высокодисперсного кремнезема с гидроксильной поверхностью по отношению к белкам природных смесей биомолекул (неочищенные препараты микробного, животного, растительного происхождения) в присутствии углеводов (полисахарида, гликопротеинов, моносахаров).*

*Установлены различия в этом процессе в зависимости от наличия в смесях того или иного углевода.*

*Отмечена возможность межмолекулярных взаимодействий белков и полисахаридов, находящихся в одном и том же препарате, и способность кремнеземов изменять их. Показано, что в биологически активных смесях растительного происхождения моносахара в присутствии белков могут сорбироваться на  $\text{SiO}_2$ , что исключено в модельных экспериментах.*

*Обсуждается механизм процесса. Полученные данные могут быть использованы при очистке биополимеров с применением неорганических сорбентов.*

**Введение.** В последние годы наряду с широким использованием в медицинской практике большого количества синтетических фармпрепаратов все чаще стали применять лекарственные средства из природного сырья. Процесс их получения сопряжен с обработкой и очисткой различных тканевых и растительных экстрактов, соков, культуральной жидкости, а также крови, сыворотки и т. д.

Выделение биопрепаратов из такого рода материалов состоит из нескольких стадий, по сути своей представляющих последовательное освобождение биологически активного начала от балластных компонентов.

Любой исходный экстракт или биологическая жидкость для получения биологически активных смесей — это гетерогенная система-смесь биомолекул с разной структурой и функциональными свойствами. Как правило, здесь могут присутствовать такие биополимеры, как белки, в том числе связанные с углеводами или липидами (гликопротеины, гликолипиды); полимеры, полностью состоящие из углеводных компонентов (полисахариды); не говоря уже о различных гетероциклических соединениях и низкомолекулярных веществах.

Весь этот комплекс соединений, находящихся в одном растворе, очень осложняет процесс выделения биологически активного начала и требует больших затрат в случае широкомасштабного производства.

Известно [1], что стоимость биологически активных веществ примерно на 90 % определяется расходами на выделение и очистку. При этом основными потребителями оборудования, материалов и исполнителей самой очистки биологически активной смеси являются фармацевтические фирмы, а также отрасли промышленности, ответственные за выпуск продуктов питания и препаратов для ветеринарии.

В нашей стране активно развиваются направления, связанные с производством препаратов из крови, ферментов из биологических экстрактов, а в последние годы — лектинов из растительного сырья.

Остальные же направления, а именно: получение различного рода препаратов иммуномодуляторов, белковых гормонов, биологически активных пептидов и др. развиваются гораздо слабее, чем за рубежом. Это сдерживает масштабную выработку разнообразных лекарственных средств из природного сырья.

Для извлечения биологически активных соединений из гетерогенных систем традиционно применяли природные (агароза, сефароза, целлюлоза и др.) полимерные сорбенты [2]. Однако в нашей стране использование значительной части их весьма лимитировано, так как зачастую они являются предметом импорта.

Поэтому в последние годы все больше внимания обращают на минеральные сорбенты, в том числе кремнеземы [3, 4], преимущества которых перед мягкими органическими гелями совершенно очевидны: им присуща высокая механическая прочность, устойчивость к гидравлическому и гидростатическому давлению, высоким температурам при стерилизации, микробному разрушению, а также способность к относительно легкой регенерации. Несмотря на это, применение высокодисперсного кремнезема для получения препаратов из нативных смесей ограничено, хотя их поверхность обладает рядом уникальных свойств [5]. К сожалению, отсутствуют данные об адсорбционных свойствах такого материала по отношению к разным типам биополимеров. В настоящей работе предпринята попытка исследовать взаимодействие высокодисперсного кремнезема с белками в присутствии углеводов разного типа, находящихся вместе в биологически активных смесях микробного, растительного и животного происхождения.

**Материалы и методы.** Исходным материалом для оценки способности высокодисперсного кремнезема сорбировать белки в присутствии углеводов служили следующие природные биологически активные смеси: микробная (комплексный продукт «Полимиксан», выделенный из культуральной жидкости *Bacillus polymixa*; препарат предоставлен Ладжинским ИПО «Энзим») — содержащая фракцию белка и полисахарида, основным компонентом которой являлась гексурановая кислота. Физико-химические свойства такого полисахарида при определенной доработке продукта свидетельствуют о возможном использовании его как медпрепарата.

Нативная смесь животного происхождения содержала белки и гликопротеины, имеющие в качестве терминального фрагмента N-ацетилглюкозаминуровую кислоту (N-АНК) — экстракт, полученный из генеративных органов коровы в соответствии с [6], где активным действующим началом являются лектины (биологически активные полимеры, перспективные для медицины) [7].

Смесь растительного происхождения представляла собой сгущенный березовый сок (технология получения сгущенного березового сока разработана ПО «Сумyles»), в котором наряду с белками присутствуют моносахара (глюкоза, фруктоза — 15—20 % в зависимости от степени сгущения). Наличие в таком сгущенном соке легко усвояемых сахаров и микроэлементов, а также высокая энергетическая ценность предполагают его использование в качестве биостимулирующего препарата [8].

Взаимодействие белков и углеводов вышеприведенных нативных смесей с кремнеземом, имеющим гидроксильную поверхность ( $S_{уд} = 300 \text{ г/м}^2$ ), оценивали по величине адсорбции [9], учитывая изменения их концентраций до и после контакта с сорбентом. Содержание белка в смесях определяли согласно [10], глюкозы и фруктозы — [11]. Концентрацию N-АНК-содержащих гликопротеинов регистрировали по N-АНК [12] после отщепления ее от полимера гидролизом в 0,1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 ч; 100 °C); полисахарида — по гексурановым кислотам [13] после гидролитического расщепления в тех же условиях. Калибровочные кривые строили общепринятым методом: белка — с использованием бычьего сывороточного альбумина («Reanal», Венгрия), углеводов: глюкозы, галактозы, фруктозы («Pharmacia», Швеция), N-АНК («Биолар», Латвия); гексурановых кислот — по глюкуроновой и галактурановой кислотам (х. ч.).

Эксперименты проводили при температуре 23 °C, pH = 5,8—6,5.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены результаты взаимодействия высокодисперсного кремнезема с гидроксильной поверхностью с биополимерами (белком и полисахаридом) микробного комплексного препарата «Полимиксан». Отмечено, что используемым методом до введения сорбента в препарат можно обнаружить только белки и ничтожные количества полисахарида, хотя визуальная оценка препарата свидетельствует о большой концентрации последнего. По

мере приближения к оптимальным условиям контактного процесса поверхности сорбента и белка, имеющегося в растворе, резко возрастает возможность выявления самого полисахарида в препарате и количественной его оценки по гексуроновым кислотам.

Наличие белков в присутствии полисахарида такого типа «маскирует» обнаружение его основного компонента — гексуроновых кислот, что не исключает межмолекулярных взаимодействий между белком и

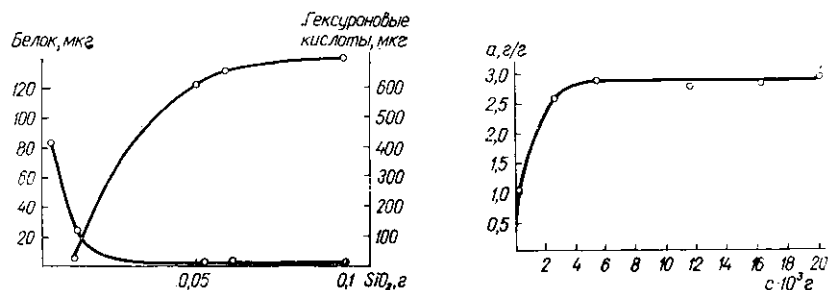


Рис. 1. Изменение концентраций белка (1) и полисахарида (2) (по гексуроновой кислоте) в полиимиде после контакта с высокодисперсным кремнеземом

Рис. 2. Изотерма адсорбции белков неочищенного препарата лектина из генеративных органов коровы на дисперсном кремнеземе

полисахаридом в растворе. Во всяком случае это можно допустить, поскольку полисахаридные сорбенты, как известно [2], широко используются для извлечения белков из биомесей.

Следовательно, когда в биомеси одновременно присутствуют белки и полисахариды, содержащие гексуроновые кислоты, возможны взаимодействия между молекулами этих биополимеров. Вместе с тем введение кремнезема в такие смеси как бы разрывает контакт белка и полисахарида. При этом кремнезем сорбирует на себе белок, оставляя в растворе сам полисахарид, из чего делается вывод, что поверхность кремнезема обладает большим химическим сродством к белкам, чем к полисахаридным структурам.

На основании полученных данных можно заключить, что в биологически активных смесях, где присутствуют белки и полисахариды, возможны межмолекулярные взаимодействия, ограничивающие условия проведения реакций по выявлению компонентов и вероятность определения количества полисахарида в образцах. Эти моменты следует учитывать при использовании кремнезёмов для обработки таких препаратов.

На рис. 2 приведена кривая адсорбции белков препарата лектина на высокодисперсном кремнеземе, поверхность которого проявляет высокую степень сродства по отношению к этим полимерам. Известно [14], что такой тип поверхности кремнезема в модельных экспериментах эффективно сорбирует белки. В данном случае при определенных соотношениях концентраций белка и адсорбционной емкости высокодисперсного кремнезема можно достичь практически полной адсорбции белков, находящихся в смеси с другими молекулами. Изотерма адсорбции (см. рис. 2) свидетельствует о том, что взаимодействие между адсорбированными молекулами пренебрежимо мало, а энергия активации не зависит от степени заполнения поверхности. Такая изотерма (согласно классификации Гильса) характерна для адсорбции, сопровождающейся образованием химических соединений (хемосорбцией), или других сильных взаимодействий с поверхностью [15].

Кроме белков, поверхность  $\text{SiO}_2$  сорбирует также до 50 % гликопротеинов, имеющих N-АНК-фрагмент и относящихся к лектинам.

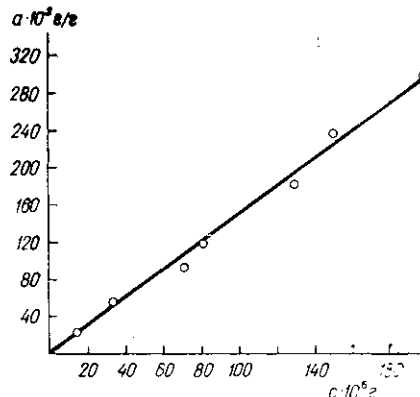
Поэтому, когда речь идет о введении в биологически активные смеси дисперсного гидроксильированного кремнезема, следует иметь в виду, что наличие углеводного фрагмента в биополимере может ограничи-

вать его взаимодействие с таким сорбентом, чего не наблюдается с белками.

По отношению к белкам растительного происхождения поверхность кремнезема также проявляет высокую адсорбционную способность. Однако кривая адсорбции (рис. 3) в этом случае имеет иной характер. Здесь наблюдается линейный рост адсорбции вслед за начальным его этапом. Согласно [15], в этом случае возможно, что по мере заполнения одних центров появляются новые, и доступная для адсорбции поверхность увеличивается пропорционально количеству адсорбированного из раствора вещества.

Очень интересным, на наш взгляд, оказался тот факт, что моносахара (фруктоза и глюкоза) сгущенного березового сока способны сорбироваться на  $\text{SiO}_2$  (рис. 4, 5). Об этом свидетельствует уменьшение их концентрации в смеси после контакта с сорбентом.

Рис. 3. Изотерма адсорбции белков сгущенного березового сока на высокодисперсном кремнеземе



том. Характерно, что эти же моносахара не сорбируются на дисперсном кремнеземе в условиях модельных экспериментов.

Возможно, что гликопротеины сгущенного березового сока, какowymi являются многие ферменты, при контакте с кремнеземом сорби-

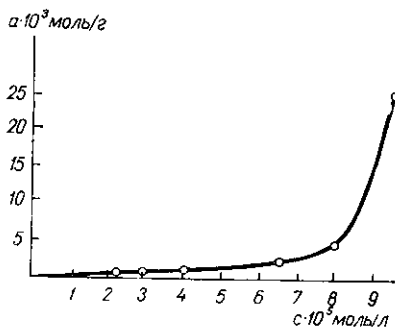


Рис. 4. Изотерма адсорбции фруктозы из сгущенного березового сока на  $\text{SiO}_2$

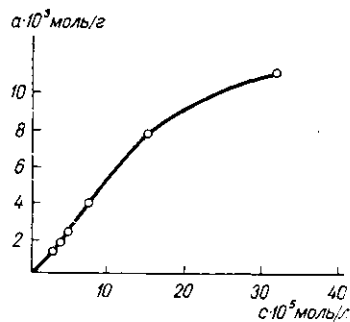


Рис. 5. Изотерма адсорбции глюкозы из сгущенного березового сока на  $\text{SiO}_2$

руются на нем. Учитывая высокую степень химического сродства гликофрагмента к моносахарам, можно ожидать [2], что спонтанная иммобилизация способствует адсорбции углеводов на подобном комплексе.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что поверхность дисперсного кремнезема проявляет высокие сорбционные свойства по отношению к белкам нативных биологически активных смесей разного происхождения вне зависимости от наличия в них полисахаридов, гликопротеинов и моносахаров. Однако механизм адсорбции при этом может быть различным, что является важным фактором при обработке биологически активных смесей с применением сорбентов такого рода и очистке активного начала с их помощью.

Следует также учитывать, что результаты по адсорбции чистых веществ не всегда адекватно отражают процессы, происходящие в смеси биологически активных молекул.

**Summary.** The adsorption abilities of disperse silica with hydroxygroups on surface on to proteins of native mixtures of biomolecules (non-purified preparates of micro-biological, animal and plant origin) in the presence of carbohydrates (polysaccharide, glycoproteins, monosaccharides).

The difference having place in this process depending on participation of one or another carbohydrate are obtained.

The possibility of intermolecular interaction between the proteins and polysaccharides, was observed having been in one and the same preparation and silica's ability to change them.

It was shown that in biologically active mixtures of plant origin the monosaccharides can sorbe upon the SiO<sub>2</sub>, in presence of proteins, which is impossible in model experiments.

The mechanism process is discussed. The data obtained may be used in purifying the biopolymers by inorganic sorbents.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гайда А. В., Староверов С. М.* Модифицированные кремнеземные носители в биотехнологии // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1989.— 34, № 3.— С. 356(68)—363(75).
2. *Коршак В. В., Штильман М. И.* Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений.— М.: Наука, 1984.— 261 с.
3. *Хохлова Т. Д., Никитин Ю. С., Ворошилова О. И.* Макропористые кремнеземы в иммобилизации и хроматографии биополимеров. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1989.— 34, № 3.— С. 363(75)—367(79).
4. *Коликов В. М., Мчедlishvili Б. В.* Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах.— Л.: Наука, 1986.— 190 с.
5. *Модифицированные кремнеземы в сорбции, хроматографии и катализе* / Под ред. Г. В. Лисицкина.— М.: Химия, 1986.— 247 с.
6. *Галагин Н. П., Богомаз В. И.* Получение препарата лектина из генеративных органов коровы // Изучение и применение лектинов: Ученые записки Тартус. ун-та.— Тарту, 1989.— Т. 1, вып. 869.— С. 123—155.
7. *Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцкий А. Д.* Лектины.— Львов: Вища шк., 1981.— 155 с.
8. *Орлов И. И., Рябчук В. П.* Березовый сок.— М.: Лесн. пром-сть.— 1982.— 128 с.
9. *Айвазов Б. В.* Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции.— М.: Высш. шк., 1972.— 208 с.
10. *Lowry O. H., Rosenbrough N., Farr A. F., Randall R. T.* Protein measurements with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1949.— 177.— P. 751—766.
11. *Починок Х. Н.* Методы биохимического анализа растений.— Киев: Наук. думка, 1976.— 334 с.
12. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* / Под ред. М. И. Прохоровой.— Л., 1982.— 272 с.
13. *Методы химии углеводов* / Под ред. Н. К. Кочеткова.— М.: Мир, 1967.— 512 с.
14. *Луцкий Н. Б., Богомаз В. И., Пентюк А. А. и др.* Сорбируемость биологически активных веществ на высокодисперсном кремнеземе как предварительный критерий выбора направлений медико-биологических исследований // Материалы IV Всесоюз. конф. «Биологическая активность соединений кремния, германия и олова». — Иркутск, 1990.— С. 90.
15. *Парфит Г., Рочестер Н.* Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел.— М.: Мир, 1982.— 586 с.

Ин-т химии поверхности АН Украины, Киев  
ПО «Сумылес», Сумы

Получено 22.05.92