

ХЕМОСОРБЦИЯ ГЛИЦИДИНОВОГО СПЕЙСЕРА НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ АЛЬБУМИНА И КВИНАКРИНА

© 2020 г. Д. В. Королев^{a,b}, В. Н. Постнов^{a,c}, Т. Н. Романова^d, В. Н. Зорин^d,
Г. А. Шультмейстер^{a,*}, Е. Б. Наумышева^{a,c}, Н. В. Евреинова^{a,e}, И. В. Мурин^c

^a Национальный медицинский исследовательский центр имени

В. А. Алмазова Министерства здравоохранения России, ул. Аккуратова 2, Санкт-Петербург, 197341 Россия

^b Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

^c Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^d Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В. И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, 197376 Россия

^e Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, 190013 Россия

*e-mail: g.schulmeister@yandex.ru

Поступило в Редакцию 13 сентября 2019 г.

После доработки 13 сентября 2019 г.

Принято к печати 18 сентября 2019 г.

В работе проведена хемосорбция на поверхности магнитных наночастиц глицидинового спейсера из трех различных растворителей. Показано, что наибольшей эффективностью обладают образцы, полученные из бензола. Проведена иммобилизация человеческого альбумина и фармацевтического препарата квинакрин на глицидиновый спейсер. Предложен механизм взаимодействия альбумина и квинакрин с глицидиновой группой.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, спейсер, глицидиновая группа, альбумин, квинакрин, иммобилизация

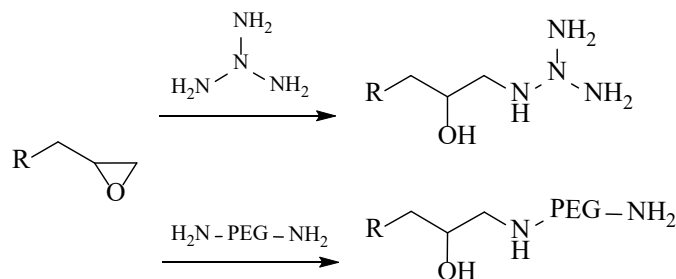
DOI: 10.31857/S0044460X20030114

Реакция глицидиновой группы с аминами [1] используется для сшивки различных, в основном полимерных, материалов [2, 3]. Она проходит с раскрытием цикла. Имеются различные способы синтеза аминспейсера (схема 1) [3]. При этом на глицидиновый спейсер можно иммобилизовать любой препарат, имеющий аминогруппу, либо синтезировать соответствующий конъюгат. Так, в работе [4] синтезированы наночастицы конъюгата желатина и (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана (соединение 1) диаметром 200 нм. Наночастицы были модифицированы *S*-нитрозотиолом. В результате этого был получен препарат эффективной доставки NO для регуляции сосудистых клеток, высвобождающий 0.12 ммоль/мг оксида азота в течение

7 сут. Ферментативно-функционализированные наночастицы диоксида кремния были получены путем иммобилизации антител HRP и альфа-фето-протеинов на поверхности наночастиц кремнезема с помощью линкования соединения 1 [5].

В настоящей работе для хемосорбции глицидинового спейсера на магнитных наночастицах был использован (3-глицидилоксипропил)-триметоксисилан. Взаимодействие его с гидроксильной поверхностью магнитных наночастиц идет по механизму реакции этерификации (схема 2). В качестве растворителя в данной реакции использовали бензол, толуол и циклогексан. Для определения содержания глицидиновых групп в образцах, полученных из трех разных рас-

Схема 1.



творителей, использовали метод, основанный на взаимодействии с триметиламином (схема 3).

Результаты определения количества глицидиновых групп по кремнию приведены в табл. 1. Наибольшее содержание глицидиновых групп наблюдается в образце, полученном при использовании в качестве растворителя циклогексана. При этом величина удельной поверхности у этого образца самая низкая. По-видимому, это говорит об образовании толстой полимерной оболочки, включающей агломераты наночастиц. Несмотря на большую формальную плотность прививки, следует ожидать низкую эффективность при иммобилизации препаратов на этот образец. При использовании бензола в качестве растворителя при хемосорбции полученный образец обладает высокой удельной поверхностью и большим содержанием спейсера (по сравнению с образцом, полученным из толуола). Для этого образца следует ожидать высокой эффективности при иммобилизации препаратов.

Результаты определения количества глицидиновых групп по углероду (табл. 2) хорошо согласуются с результатами определения по кремнию.

Поскольку белок крови альбумин состоит в основном из аминокислот, оказалось интересным сшить их при помощи глицидинового спейсера на поверхности наночастиц. Так как альбумин является транспортным белком, то иммобилизация его на поверхности магнитных наночастиц, возможно, будет способствовать хемосорбции лекарственных препаратов. Вероятно, реакция идет с раскрытием кольца и взаимодействием образовавшегося радикала с первичной боковой аминогруппой. На схеме 4 для примера представлено взаимодействие спейсера с алифатической аминокислотой лизином.

Нами проведена иммобилизация на глицидиновую группу (*RS*)-2-метокси-6-хлор-9-(1-метил-1-диэтиламинобутиламино)акридина дигидрохлорида **2** (мепакрин, квиакрин или акрихин). Квиакрин был синтезирован в 30-х годах XX века как флуоресцентный краситель. Вскоре была обнаружена его противомаларийная и антипаразитарная активность [6]. В последние несколько десятилетий было показано влияние мепакрин на постишемическое восстановление миокарда [7, 8]. Конъюгаты квиакрина с наночастицами различной природы были получены ранее [9–11]. Авторами предпринята попытка использовать

Схема 2.

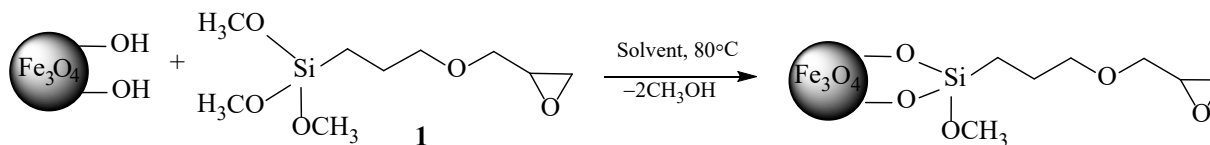


Схема 3.

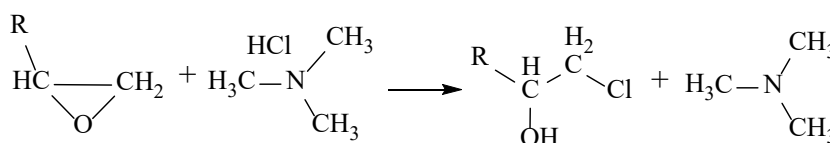


Таблица 1. Результаты определения количества глицидиновых групп по кремнию

Образец	Удельная поверхность, м ² /г	Содержание кремния, мкг	Концентрация, ммоль/г	Концентрация на единицу поверхности, мкмоль/м ²
Fe ₃ O ₄ исходный	63	–	–	–
Fe ₃ O ₄ -1 из бензола	70	9.714	0.35	4.9
Fe ₃ O ₄ -1 из толуола	77	4.000	0.14	1.8
Fe ₃ O ₄ -1 из циклогексана	42	35.429	1.26	30.0

Таблица 2. Результаты определения количества глицидиновых групп по углероду

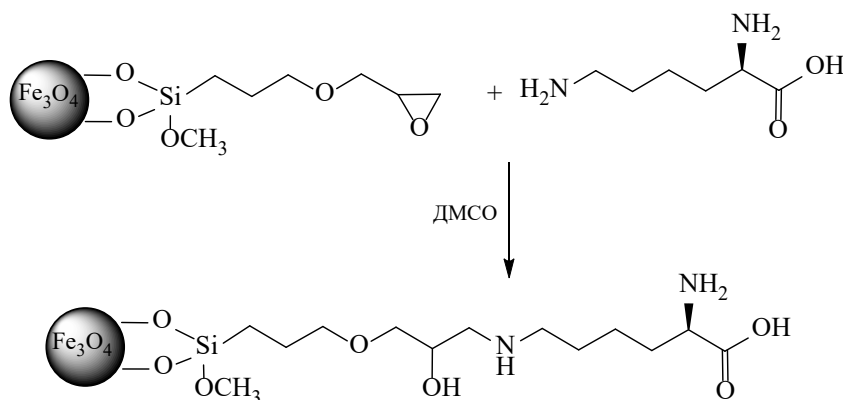
Образец	Удельная поверхность, м ² /г	Содержание кремния, мкг	Концентрация, ммоль/г	Концентрация на единицу поверхности, мкмоль/м ²
Fe ₃ O ₄ исходный	63	–	–	–
Fe ₃ O ₄ -1 из бензола	70	2.4	0.3	4.9
Fe ₃ O ₄ -1 из толуола	77	2.6	0.4	4.8
Fe ₃ O ₄ -1 из циклогексана	42	7.4	1.1	25.2

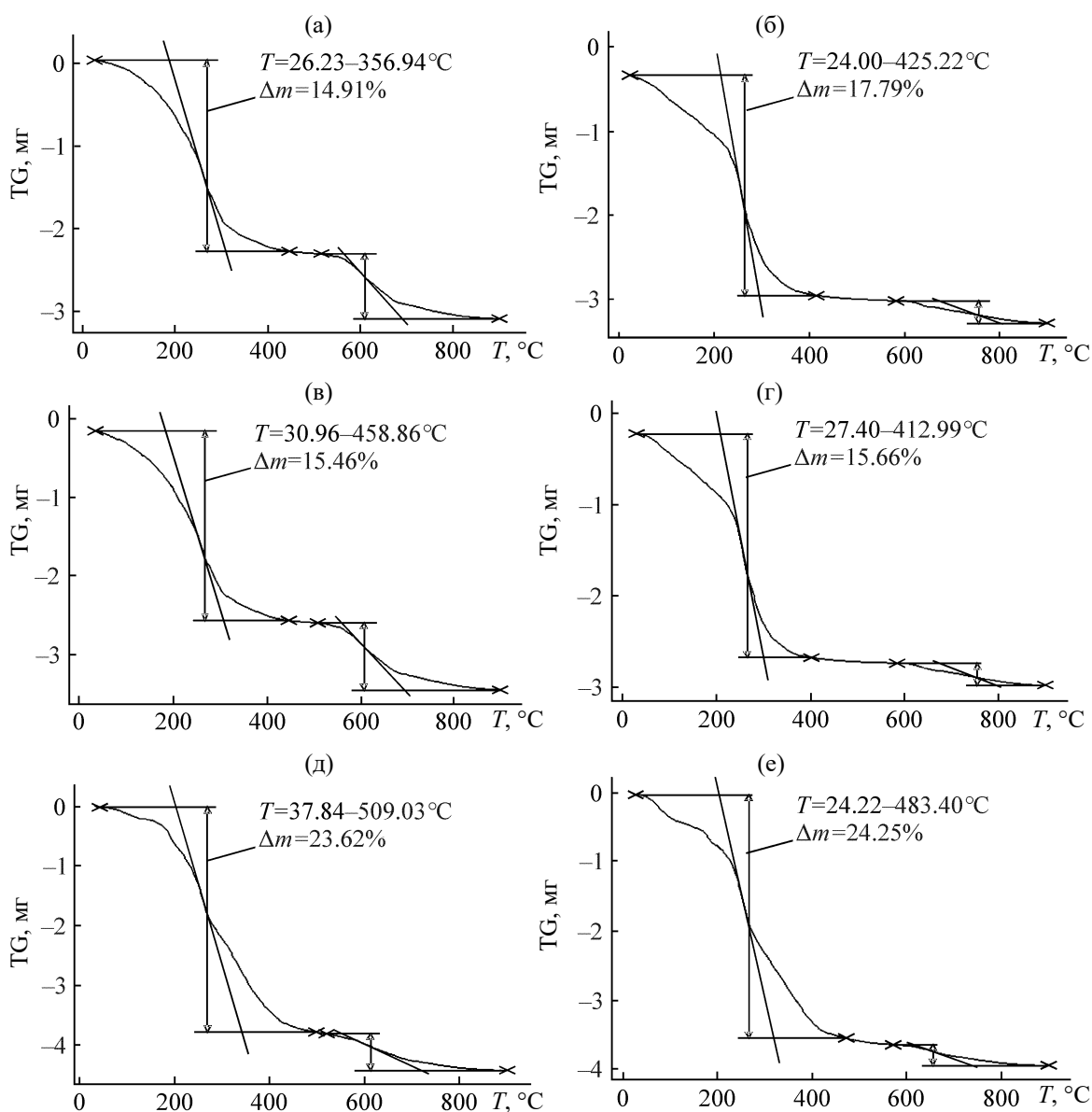
вторичную аминогруппу квинакрина для иммобилизации его на глицидиновый спейсер, привитый на магнитные наночастицы. Иммобилизация квинакрина показана на схеме 5. Предполагается, что образовавшийся при раскрытии кольца радикал взаимодействует со вторичной аминогруппой квинакрина.

Полученные образцы до и после иммобилизации были исследованы методом термогравиметрии. Результаты термогравиметрического анализа образцов, полученных из разных растворителей, показаны на рисунке (а–в). На термограммах имеются два участка. Один из них, низкотемпературный, соответствует выгоранию органической оболочки, содержащей глицидиновый спейсер; второй, высокотемпературный, соответствует доокислению магнетита до высшего оксида. Результаты анализа

образцов с иммобилизованным альбумином показаны на рисунке (г–е). Как видно из термограмм, при иммобилизации альбумина в низкотемпературной области разрушения полимерной оболочки добавляется еще одна стадия. По-видимому, она соответствует денатурации белка – альбумина. Это соответствует литературным данным [12]: весь белок денатурирует при температурах ниже 100°C. В дальнейшем идет двухстадийное выгорание продуктов денатурации, которое может продолжаться вплоть до 450°C [13].

К сожалению, количество альбумина, иммобилизованное на глицидиновый спейсер невелико по массе. Среднее значение содержания альбумина колеблется от 0.5 до 3%. Количество иммобилизованного квинакрина составило от 3.7 до 5.5 мг/г. Наибольшее количество квинакрина, как

Схема 4.

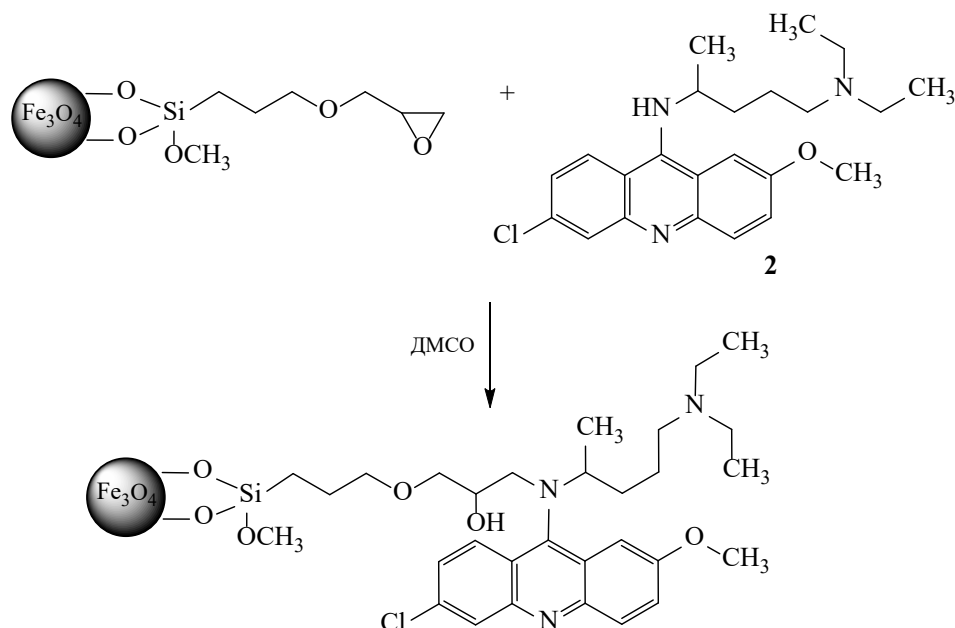


Результаты термогравиметрического анализа образцов с глицидиновым спейсером, полученных с использованием в качестве растворителя бензола (а, г), толуола (б, д) и циклогексана (в, е) до (а–в) и после иммобилизации альбумина (г–е).

и ожидалось, хемосорбируется на образец, полученный при использовании бензола (табл. 3). Это подтверждает предположение о том, что относительно большое количество спейсера в случае образца, полученного при использовании циклогексана, определенное методами анализа по кремнию и углероду, связано с образованием толстой полимерной пленки на поверхности наночастиц. В таком случае доступными остаются только глицидиновые группы, оставшиеся на поверхности.

Таким образом, проведена хемосорбция глицидинового спейсера с использованием трех различных растворителей. Показано, что наибольшей эффективностью обладают образцы, полученные с использованием бензола. Проведена иммобилизация человеческого альбумина и фармацевтического препарата квинакрин на глицидиновую группу спейсера. Предложен механизм взаимодействия альбумина и квинакрин с глицидиновым спейсером. Предложенная модель может быть использо-

Схема 5.



вана для пассивной либо магнитоуправляемой направленной доставки лекарственных препаратов в зону ишемии биологических тканей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали магнитные наночастицы, синтезированные по методу, описанному в работе [14]. Для получения глицидинового спейсера использовали (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан (Sigma Aldrich). В работе использовали человеческий альбумин (Вакстер АГ, Австрия).

Хемосорбция глицидинового спейсера.

Смесь 2 г лиофилизированных магнитных наночастиц, 23.75 мл соответствующего растворителя и 1.25 мл (3-глицидилоксипропил)триметоксисилана термостатировали при 80°C в течение 2 ч при перемешивании. В качестве растворителя использовали бензол, толуол или циклогексан. Полученный продукт 5 раз промывали циклогексаном, затем лиофилизировали при -50°C и аб-

солютном давлении (3 Па) в лиофильной сушке VaCo 2 (ZirBus, Germany).

Определение количества глицидиновых групп титрованием в неводной среде. Метод определения количества глицидиновых групп [15] основан на реакции с гидрохлоридом триметиламина. Этот же метод указан для определения функциональных групп при получении гелей для доставки лекарств на основе глицидинового спейсера [16]. К суспензии 100 мг исследуемого образца в 20 мл уксусного ангидрида добавляли эквивалентное количество гидрохлорида триметиламина. Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре 2 ч. Количество высвобожденного амина определяли методом ацидиметрического неводного титрования 0.1 н. хлорной кислотой в ледяной уксусной кислоте в присутствии индикатора кристаллического фиолетового. В среде протогенного растворителя (CH_3COOH) усиливаются основные свойства слабого основания, и он количественно титруется хлорной кислотой. Этому процессу предшествует образование ацелоний- и перхлорат-ионов. Степень замещения глицидиновых групп x рассчитывали по формуле (1).

$$A = m/M \cdot x, \quad (1)$$

где M – молекулярная масса спейсера; A – количество HClO_4 , израсходованного для титрования, моль; m – масса образца, г.

Таблица 3. Результаты определения содержания квинакрина

Образец	Содержание квинакрина	
	моль/г	мг/г
Fe_3O_4 -1 из бензола	0.014	5.5
Fe_3O_4 -1 из толуола	0.006	2.2
Fe_3O_4 -1 из циклогексана	0.009	3.7

Раствор хлорной кислоты в уксусной кислоте готовили по методике, описанной в работе [17].

Определение количества глицидиновых групп по содержанию кремния. Навеску (50 мг) исследуемого образца подвергали минерализации методом мокрого озоления кипячением в растворе азотной кислоты, полученном разбавлением 20 мл концентрированной кислоты дистиллированной водой в соотношении 1:1, до полного растворения. После охлаждения объем минерализата доводили до 100 мл дистиллированной водой. Полученный таким образом минерализат анализировали на содержание силикат-иона методом молибденовой сини с использованием спектрофотометрии [18].

Определение количества глицидиновых групп по содержанию углерода. Исследуемый образец сжигали в тонкой кварцевой трубке в атмосфере кислорода по методу Прегля [19]. Количество выделившегося углекислого газа определяли волюмометрически при помощи газометра.

Иммобилизация альбумина. Иммобилизацию альбумина проводили на перемешивающем устройстве LS-220 при частоте 300 мин⁻¹. Навеску образца (50 мг) и 2 мл 20%-ного водного раствора альбумина подвергали иммобилизации в течение 2 ч при 25°C. После сорбции полученный препарат 5 раз промывали дистиллированной водой с использованием магнитной сепарации.

Определение количества глицидиновых групп и содержание иммобилизованного альбумина термогравиметрическим методом. Исследование проводили при нагреве до 900°C в воздушной среде со скоростью 10 град/мин на приборе Setaram Setsys Evolution.

Иммобилизация квинакрина. Иммобилизацию квинакрина проводили выдерживанием смеси 50 мг образца и 2 мл 0.1%-ного раствора квинакрина в безводном диметилсульфоксиде при перемешивании (частота 300 мин⁻¹) в течение 30 мин. Безводный ДМСО получали вымораживанием. После сорбции полученный препарат 5 раз промывали дистиллированной водой с использованием магнитной сепарации.

Определение количества иммобилизованного квинакрина. Количество иммобилизованного квинакрина определяли методом спектрофотометрии при помощи спектрофотометра Unico 2802S

(Unico Sys, США) при $\lambda = 430$ нм. Полученную после иммобилизации квинакрина суспензию в ДМСО центрифугировали и анализировали содержание квинакрина в надосадочной жидкости. По этой величине судили о количестве сорбированного вещества.

Работа выполнена с применением оборудования ресурсных центров «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Инновационные технологии композитных наноматериалов» Санкт-Петербургского государственного университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shechter L., Wynstra J., Kurkcy R.P. // *Ind. Eng. Chem.* 1956. Vol. 48. N 1. P. 94. doi 10.1021/ie50553a029
2. Fryauf K., Strehmel V., Fedtke M. // *Polymer.* 1993. Vol. 34. N 2. P. 323. doi 10.1016/0032-3861(93)90084-N
3. Kimmins S.D., Wyman P., Cameron N.R. // *Polymer.* 2014. Vol. 55. P. 416. doi 10.1016/j.polymer.2013.09.019
4. Zhang Q.Y., Wang Z.Y., Wen F., Ren L., Li J., Teoh S.H., Thian E.S. // *J. Biomed. Mater. Res. (A).* 2015. Vol. 103. P. 929. doi 10.1002/jbm.a.35239
5. Wu Y., Chen C., Liu S. // *Anal Chem.* 2009. Vol. 81. N 4. P. 1600. doi 10.1021/ac802345z
6. Машиковский М.Д. Лекарственные средства. М.: ООО «Новая волна», 2002. Т. 2. С. 608.
7. Otani H., Engelman R.M., Breyer R.H., Rousou J.A., Lemeshow S., Das D.K. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1986. Vol. 92. N 2. P. 247.
8. van Bilsen M., van der Vusse G.J., Willemsen P.H., Coumans W.A., Roemen T.H., Reneman R.S. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1990. Vol. 22. N 2. P. 155-163. doi 10.1016/0022-2828(90)91112-K.
9. Satapathy S.R., Nayak A., Siddharth S., Das S., Nayak D., Kundu C.N. // *Nanomedicine.* 2018. Vol. 14. N 3. P. 883. doi 10.1016/j.nano.2018.01.007
10. Satapathy S.R., Siddharth S., Das D., Nayak A., Kundu C.N. // *Mol. Pharm.* 2015. Vol. 12. N 11. P. 4011. doi 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00461
11. Sun M.G., Shi J.F., Li X.Y., Zhao Y., Ju R.J., Mu L.M., Yan Y., Li X.T., Zeng F., Lu W.L. // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015. Vol. 11. N 8. P. 1339. doi 10.1166/jbn.2015.2079
12. Kulikova G.A., Ryabinina I.V., Guseynov S.S., Parfenyuk E.V. // *Thermochim. Acta.* 2010. Vol. 503-504. P. 65. doi 10.1016/j.tca.2010.03.009
13. Parfenyuk E.V., Kulikova G.A., Ryabinina I.V. // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2010. Vol. 100. N 4. P. 987. doi

- 10.1007/s10973-009-0604-4
14. *Toropova Y.G., Golovkin A.S., Malashicheva A.B., Gorshkov A.N., Gareev K.G., Afonin M.V., Korolev D.V., Galagudza M.M.* // *Int. J. Nanomed.* 2017. Vol. 12. P. 593. doi 10.2147/IJN.S122580
 15. *Kondo T., Ishizu A., Nakano J.* // *J. Appl. Polym. Sci.* 1989. N 37. P. 3003. doi 10.1002/app.1989.070371017
 16. *Park K., Shalaby W.S.W., Park H.* *Biodegradable hydrogels for drug delivery.* Lancaster-Base: Technomic Publishing Company, Inc. 1993. P. 93.
 17. ГОСТ 25794.3-83. Реактивы. Методы приготовления титрованных растворов для титрования осаждением, неводного титрования и других методов. М.: Стандартинформ, 2006. 11 с.
 18. *Уильямс У.Дж.* Определение анионов. М.: Химия, 1982. С. 199.
 19. *Pregl F.* *Die Quantitative Organische Mikroanalyse.* Berlin: Springer, 1917. P. 189.

Chemisorption of Glycidine Spacer on Magnetic Nanoparticles Surface and Immobilization of Albumin and Quinacrine

**D. V. Korolev^{a,b}, V. N. Postnov^{a,c}, T. N. Romanova^d, V. N. Zorin^d, G. A. Schulmeister^{a,*},
E. B. Naumysheva^{a,c}, N. V. Evreinova^{a,e}, and I. V. Murin^c**

^a V. A. Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197341 Russia

^b I. P. Pavlov The First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^d V. I. Ulyanov (Lenin) St. Petersburg State Electrotechnical University "LETI", St. Petersburg, 197376 Russia

^e St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, 190013 Russia

*e-mail: g.schulmeister@yandex.ru

Received September 13, 2019; revised September 13, 2019; accepted September 18, 2019

Chemisorption on the surface of magnetic nanoparticles of a glycidine spacer from three different solvents was performed. It was shown that the samples obtained from benzene are most effective. The human albumin and the pharmaceutical preparation quinacrine were immobilized on a glycidine spacer. A mechanism is proposed for the interaction of albumin and quinacrine with a glycidine group.

Keywords: magnetic nanoparticles, spacer, glycidine groups, albumin, quinacrine, immobilization