

УДК 541(64+183.12)

**КАРБОКСИЛЬНЫЕ СЕТЧАТЫЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТЫ
КАК СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

***Н. Н. Кузнецова, К. М. Рожецкая, Б. В. Москвичев,
Л. К. Шатаева, А. А. Селезнева, И. М. Огороднова,
Г. В. Самсонов***

Сополимеризацией метакриловой кислоты и гексагидро-1,3,5-триакрилтиазина синтезированы карбоксильные сетчатые полиэлектролиты, характеризующиеся высокой проницаемостью и обратимой сорбцией по отношению к белкам и ферментам.

Использование карбоксильных катионитов для выделения и очистки биологически активных веществ обусловлено возможностью изменения в сравнительно мягких условиях степени ионизации карбоксильных групп. Процессы сорбции и десорбции ионов органических веществ на карбоксильных ионитах протекают при низких концентрациях ионов водорода, соответствующих условиям существования нативных форм белков и ферментов.

Однако применение обычных гелевых карбоксильных катионитов для сорбции белков ограничено из-за их невысокой проницаемости по отношению к органическим ионам большой молекулярной массы. Эти катиониты слабо гидратированы в Н-форме в водных растворах, а при ионизации карбоксильных групп наблюдается резкое возрастание степени гидратации катионитов, сопровождающееся значительным изменением объема.

Макропористые катиониты, содержащие макропоры в сухом состоянии, применяются для сорбции ионов органических веществ сравнительно небольшой молекулярной массы. В последнее время появились сообщения об использовании макропористых ионитов для сорбции макромолекул белков [1, 2].

Высоконабухающие ионообменные гели на основе декстрана, агарозы и других гидрофильных материалов характеризуются весьма невысокой величиной обменной емкости по белкам и ферментам и находят применение в основном в лабораторных масштабах.

Задача настоящей работы — изучение процесса синтеза сетчатых полиэлектролитов с целью получения сорбентов, обладающих высокой проницаемостью, емкостью и обратимым связыванием белков и ферментов. Для сорбции последних наибольший интерес представляют карбоксильные катиониты, получаемые на основе гидрофильных мономеров — акриловых кислот и поливинильных соединений амидного типа. Они обладают высокой степенью гидратации в Н-форме в водных растворах, что позволяет осуществлять на них сорбцию в мягких условиях в областях рН 4—6.

Однако синтезированные ранее карбоксильные макросетчатые катиониты и ионит КМТ на основе метакриловой кислоты (МК) и спивающих агентов — N,N'-алкилендиметакриламида (АДМА) [3] и гексагидро-1,3,5-триакрилтиазина (ГТА) [4] сорбируют белки с низкой емкостью и необратимо.

Для получения высокоемкостных проницаемых сетчатых полиэлектролитов, способных обратимо взаимодействовать с макромолекулами белков,

проводили исследования в направлении модификации физической структуры этих катионитов путем сополимеризации в присутствии различных гидрофильных растворителей.

Чтобы найти способ формирования необходимой скрытой пористости и оптимальной степени гидратации, обусловливающих проницаемость больших органических ионов, изучали влияние растворителей с различной сольватирующей способностью: воды, 5- и 30%-ной водной уксусной кислоты, 50%-ного водного ДМФ, сольватирующая способность которых по отношению к мономерной смеси (МК+ГТА) и сополимеру возрастала

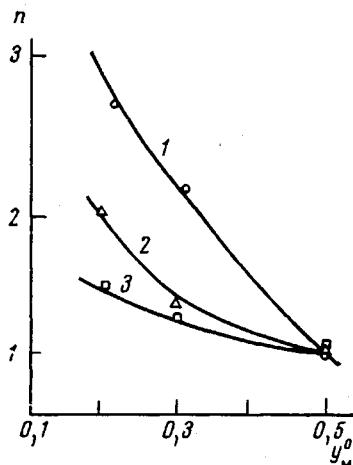


Рис. 1. Зависимость степени набухания n ($\text{gH}_2\text{O}/\text{г смолы}$) Н-формы катионита в воде от удельной доли мономеров в исходной смеси при сополимеризации в 5- (1) и 30%-ной уксусной кислоте (2); 50%-ном водном ДМФ (3); содержание ГТА – 12 вес. %

в указанном порядке. Одновременно выясняли зависимость степени гидратации продукта от концентрации мономерной смеси в исходном растворе.

Как видно из рис. 1, при высокой концентрации мономерной смеси (удельная доля мономеров $Y_m^0=0,5$) влияние природы растворителя, использованного при сополимеризации, на гидратацию Н-формы не сказывается, причем наблюдаются невысокие, близкие по значению величины степени набухания. Различия проявляются только в случае сополимеризации МК и ГТА в разбавленных растворах ($Y_m^0=0,2$), причем максимально гидратируются смолы, сияз которых протекал в водном растворе либо в 5%-ной водной уксусной кислоте.

Как нами было установлено, весьма важной характеристикой карбоксильных сетчатых полиэлектролитов является изменение объема набухшего ионита или деформация матрицы ионита при ионизации карбоксильных групп.

Из рис. 2 видно, что основное возрастание удельной гидратации $Y_{\text{H}_2\text{O}}$ происходит до степени ионизации, равной 0,5. На рис. 3 представлены данные, характеризующие изменение относительной гидратации катионита $Y_{\text{H}_2\text{O}, \alpha}/Y_{\text{H}_2\text{O}, \alpha=0}$ по мере увеличения степени его ионизации. Как следует из рисунка, образцы смол, синтезированные в концентрированных растворах, независимо от природы растворителя, отличаются значительным изменением относительной гидратации и, следовательно, деформацией сеток при ионизации карбоксильных групп. Минимальное изменение набухания наблюдается у образцов, полученных в разбавленных водных растворах либо в 5%-ном водном растворе уксусной кислоты.

Образцы, синтезированные в водном ДМФ, даже при большом разбавлении мономерной смеси ($Y_m^0=0,2$) отличаются существенным изменением относительной гидратации при увеличении степени ионизации.

Найденную различную способность сеток карбоксильных полиэлектролитов к деформации при изменении pH и ионной силы следует объяснить различным характером формирования пространственной сетки в процессе сополимеризации в присутствии разных растворителей.

Образование сетчатых полиэлектролитов с малой деформируемостью сеток обусловлено особенностями процесса трехмерной сополимеризации МК и ГТА в разбавленных водных растворах. Известно, что в присутствии растворителей с плохой сольватирующей способностью трехмерная сополимеризация обычно сопровождается фазовым разделением, ведущим к образованию дисперсий и, как следствие, к микрогетерогенности гелей [5].

При сополимеризации МК с ГТА в разбавленных водных растворах разделение фаз и образование дисперсий проявляется уже на ранних ста-

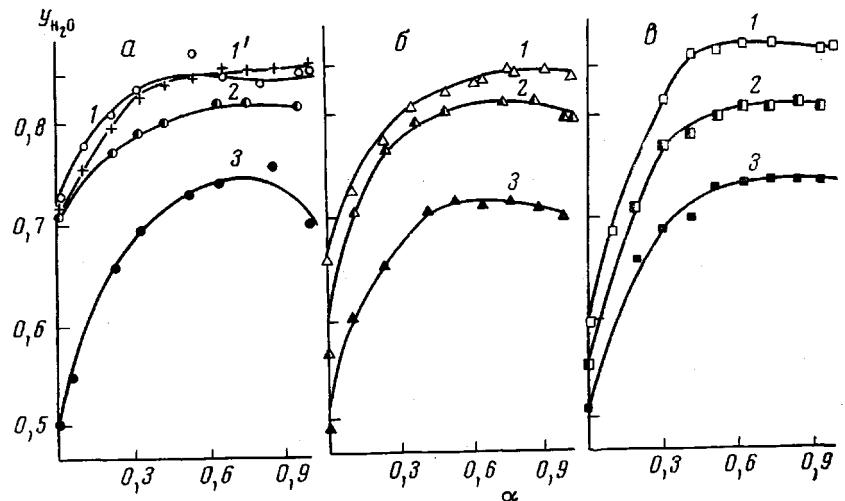


Рис. 2. Зависимость удельной гидратации Y_{H_2O} от степени ионизации α карбоксильных групп катионита, полученного при различной удельной доле мономеров в исходной смеси в разных растворителях

Здесь и на рис. 3: а — в 5%-ной уксусной кислоте (1—3) и в воде (1'); б — в 30%-ной уксусной кислоте; в — в 50%-ном водном ДМФ; $Y_{M^0}=0,2$ (1, 1'); 0,3 (2) и 0,5 (3)

диях превращения. Этому способствует ограниченная растворимость ГТА в воде и 5%-ной уксусной кислоте и жесткая структура молекулы ГТА с наличием в ней трех двойных связей одинаковой активности. Образование дисперсий приводит к получению сополимеров, характеризующихся значительной гетерогенностью по плотности не только в набухшем, но и в сухом состоянии. Эти катиониты содержат наряду с гелевой и негелевую пористость как скрытую, проявляющуюся при набухании, так и явную. Негелевая пористость является одной из причин, обуславливающих по сравнению с обычными ионитами большую жесткость сеток, проявляющуюся в малом изменении степени гидратации при ионизации карбоксильных групп.

Существование развитой микропористой структуры этого типа карбоксильных полиэлектролитов было подтверждено с помощью электронной микроскопии (рис. 4).

На образцах, полученных сополимеризацией МК и ГТА в различных условиях, определялись предельные емкости сорбции по отношению к белкам и ферментам.

Как указано в таблице, величина емкости сорбции белков на образцах изменяется в зависимости от природы применяемого при сополимеризации растворителя, причем для всех образцов характерны значительные величины емкости (порядка сотен миллиграмм на 1 г катионита).

По-видимому, каждый из исследуемых образцов располагает некоторым количеством пор, размер которых близок к размерам сорбируемых белковых молекул.

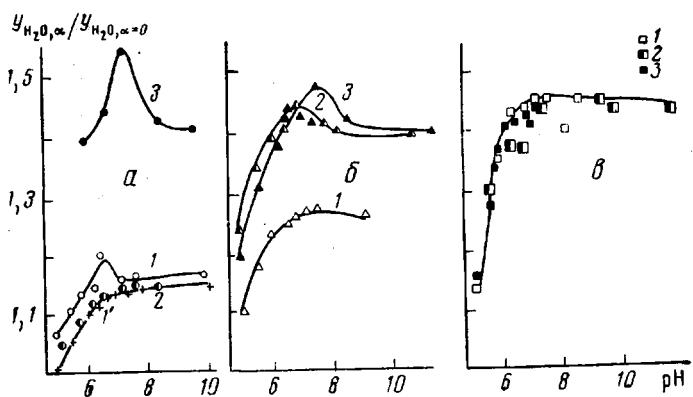


Рис. 3. Зависимость относительной гидратации катионита, полученного при различной удельной доле мономеров в исходной смеси в разных растворителях, от pH равновесного раствора

Однако наибольшая емкость наблюдается у образцов, полученных при 20%-ной концентрации мономерной смеси в воде (образец 1) либо в 5%-ной уксусной кислоте (образец 2). На этих же образцах, отличающихся малым изменением относительной гидратации (рис. 3), имеет место полная обратимость сорбции.

Смолы, синтезированные в среде других растворителей или при большей концентрации мономерной смеси, отличающиеся значительным изменением степени гидратации с повышением pH, частично или полностью инактивируют белок.

Емкость и обратимость сорбции белков и ферментов на карбоксильных смолах

Белок	$M \cdot 10^3$	Образец, M*					
		1		2		3	
		емкость, мг/г	обратимость, %	емкость, мг/г	обратимость, %	емкость, мг/г	обратимость, %
Сывороточный альбумин	66	810	—	580	—	370	—
Химотрипсиноген	26	330	—	320	—	230	—
Рибонуклеаза	14	230	—	350	—	29	—
Террилитин	27	102	100	153	100	200	0
Термолизин	20	730	100	650	100	510	0

* Образцы 1—3 получены сополимеризацией МК и ГТА в воде при $Y_M^0 = 0,2$, 5%-ной уксусной кислоте при $Y_M^0 = 0,2$ и в 50%-ном водном ДМФ при $Y_M^0 = 0,5$ соответственно. Содержание ГТА для всех образцов 12 вес.%.

Мы проводили изучение процесса сорбции (рН 4,2) и десорбции (рН 6, 8) террилита на большом количестве образцов сорбентов с различным набуханием в Н- и Н—Na-формах (рис. 5). Было подтверждено, что сорбенты, набухание которых мало изменяется в процессе сорбции—десорбции (рН 4,2—6,8), обладали полной обратимостью сорбции фермента и давали при элюции узкую зону с высокой концентрацией белка. Так, из рис. 5 видно, что полная десорбция террилита имеет место лишь в том случае, если отношение коэффициентов набухания в Н—Na- к Н-форме близко к единице и составляет 1,0—1,2. Эти данные показывают, что необратимое связывание белков сетчатыми полиэлектролитами обусловлено

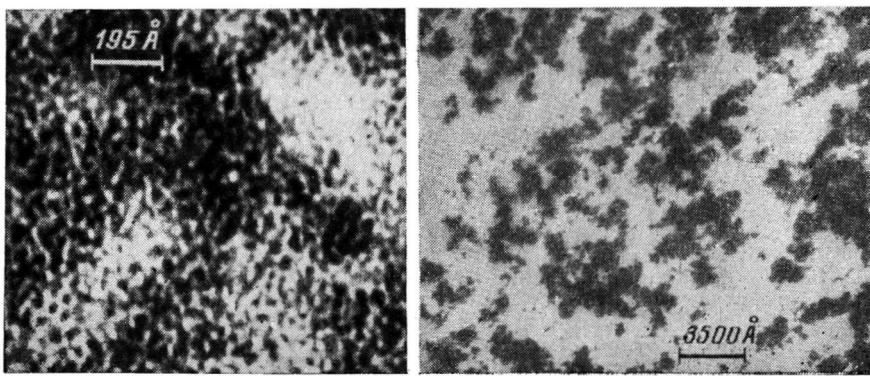


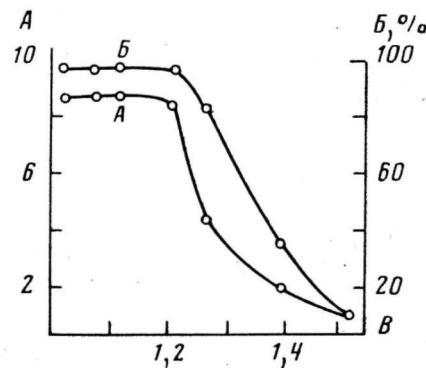
Рис. 4. Электронные микрофотографии образцов катионита, полученных сополимеризацией МК и ГТА в 5%-ной уксусной кислоте; $Y_m^0=0,2$ и 12 вес.% ГТА при разных увеличениях

способностью сеток к значительной деформации при повышении рН и ионной силы, приводящей к усилиению дополнительного взаимодействия с сорбированными макромолекулами.

Сополимеризацию МК и ГТА проводили в указанных растворителях при различных концентрациях мономеров в смеси. Содержание ГТА для всех опытов составляло 12 вес.%. Реакцию осуществляли при 20–50° в присутствии персульфата аммония – бисульфита натрия до образования геля с последующим прогреванием геля

Рис. 5. Десорбция террилитина на карбоксильных полиэлектролитах с различной относительной гидратацией

A — отношение максимальной концентрации террилитина при десорбции к исходной смеси; *B* — выход террилитина при десорбции; *B* — отношение коэффициента набухания Н-формы катионита в воде к коэффициенту набухания в буферном растворе (рН 6,8)



при 100° в течение 0,5–1,0 часа. По окончании сополимеризации смолы обрабатывали последовательно 0,5 н. раствором щелочи, 1,0 н. раствором кислоты и промывали водой [6].

Степень максимальной гидратации катионитов определяли весовым методом и выражали в граммах поглощенной воды на 1 г сухого ионита или величиной удельной доли воды в набухшем ионите.

Относительную гидратацию выражали отношением удельной гидратации катионита, находящегося в равновесии с раствором определенного рН, к удельной гидратации Н-формы катионита.

Емкость по белкам определяли в статических условиях при оптимальном для сорбции значении рН равновесного раствора из 0,065 н. фосфатного буфера; исходная концентрация белка – 5–20 мг/г. Для протеолитических ферментов обратимость сорбции определяли по сохранению ферментативной активности после десорбции белка со смолы. Электронные микрофотографии были получены на электронном микроскопе марки JEM-7A. Образцы помещали на ночь в 50%-ную уксусную кислоту при 4°. Затем постепенно обезвоживали этанолом возрастающей концентрации и заливали эпоксидной смолой. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме типа LKB и контрастировали цитратом свинца. Предварительная фиксация в растворах четырехокиси осмия, а также дополнительное контрастирование раствором уранил-ацетата, используемого обычно при фиксации биологических объектов, не изменяли общей картины на малых увеличениях (рис. 4, а), но вследствие избыточного кон-

трастирования ионита полностью исключали возможность наблюдения микроструктуры гелевых участков сополимера при высоких разрешениях (рис. 4, б).

Авторы выражают признательность А. И. Неворотину за электронно-микроскопические исследования.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
6 III 1975

ЛИТЕРАТУРА

1. F. X. Pollio, R. Kunin, Chem. Engng Progr., 67, 108, 1971.
 2. Д. И. Острогский, Диссертация, 1975.
 3. В. А. Динабург, Г. В. Самсонов, К. М. Генендер, В. А. Пасечник, В. С. Юрченко, Г. Э. Элькин, С. Ф. Беляя, Ж. прикл. химии, 41, 891, 1968.
 4. A. A. Vanшейдт, O. И. Охрименко, Авт. свид. 114020, 1953.
 5. K. Dusek, Polymer Networks, ed. by A. Y. Chormpff, S. Newmau, New York – London, 1971, p. 245.
 6. Н. Н. Кузнецова, К. М. Генендер, Г. В. Самсонов, А. А. Селезнева, Г. А. Бабенко, Т. А. Козлова, О. А. Виголс, А. А. Штрауса, Авт. свид. 322332, 1971; Бюлл. изобретений, 1974, № 36.
-