

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXIV

СОЕДИНЕНИЯ

№ 5

1982

УДК 541(64+183.12):539.2

СТРУКТУРА И СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА МАКРОПОРИСТОГО КАРБОКСИЛЬНОГО КАТИОНИТА КМ-2п

*Ридзевич Ю.И., Шатаева Л.К., Самсонов Г.В.,
Жукова Н.Г., Зорина А.И., Ласкорин Б.Н.*

Методами малоуглового рентгеновского рассеяния и электронной микроскопии исследована неоднородность и морфология карбоксильного кationита КМ-2п. Исследованы изотермы сорбции белков (пепсина и химотрипсиногена) на этом сорбенте. Показано, что крупные гранулы кationита имеют верхнюю оболочку с повышенной плотностью, которая препятствует хорошей проницаемости белковых макромолекул во внутренние области зерна сорбента; механическое измельчение гранул устраняет это препятствие.

В последнее время все большее значение приобретает использование пористых карбоксильных кationитов для выделения и очистки физиологически активных веществ. Достаточно изучены в этом отношении ионообменные пористые целлюлозы [1, 2], кationиты типа Сферон [3, 4], а также отечественные биосорбенты, синтезированные на основе метакриловой кислоты [5, 6]. Исследование физико-химических закономерностей селективного и обратимого связывания белков с сетчатыми полизлектролитами позволило сформулировать основные требования, которым должен отвечать карбоксильный кationит, предназначенный для селективной сорбции белков. Во-первых, матрица сорбента должна быть достаточно пористой, чтобы обеспечить проникновение сорбируемых макромолекул ко всем сорбционным центрам зерна сорбента. Во-вторых, кationит должен иметь высокую локальную плотность карбоксильных групп на поверхности пор для осуществления полифункционального взаимодействия сорбент — сорбат и для селективной сорбции белковых макромолекул из солесодержащих растворов. В-третьих, структура сорбента должна быть конформационно устойчивой к изменению степени ионизации карбоксильных групп. При этом условии повышение pH внешнего раствора приводит к десорбции белковой макромолекулы без деформации и разрушения ее нативной структуры [7]. Этим требованиям удовлетворяет пористый карбоксильный кationит КМ-2п, применяемый для селективной сорбции поливалентных металлов [8]. Цель настоящей работы — изучение пористости, потенциометрических характеристик и сорбционных свойств кationита КМ-2п по отношению к белковым макромолекулам.

Для работы использовали коммерческий образец кationита КМ-2п, который фракционировали на стандартных ситах. Механическим измельчением крупных гранул в фарфоровой ступке был получен образец с размерами зерен 220 ± 100 мкм, обозначаемый в дальнейшем КМ-2пМ. Полученные фракции обрабатывали поочередно 1 н. растворами HCl и KOH (или NaOH), причем обработку в нейтральной и щелочной областях pH проводили в присутствии 0,5% трилона Б для удаления ионов поливалентных металлов. Удельные объемы сорбента в водородной и натриевой формах определяли в мерных цилиндрах.

Пористость кationита КМ-2п в сухом состоянии исследовали на растровом электронном микроскопе марки MSM-5. При подготовке образца для электронной микроскопии на лиофильно высушенные гранулы наносили двухслойное покрытие «углерод — золото» методом вакуумного напыления. Суммарная толщина покрытия составляла 25 нм и не исказала рельеф изучаемой структуры.

Структуры сорбента в воздушно-сухом, лиофильно высушенном и в набухшем в воде состояниях сравнивали с помощью метода малоуглового рассеяния рентгеноносных лучей. Измерения проводили в герметических кюветах на приборе КМР-1 по методике, описанной ранее [9]. Расчет средних радиусов рассеивающих частиц (пор) проводили по методу Гинье [10]. Для оценки минимальных радиусов неоднородности использовали угол наклона графика Гинье в правой (хвостовой) части. Оценку

максимальных радиусов инерции неоднородности структуры проводили по известному соотношению

$$R^2 = KR_{\min}^2 + (1-K)R_{\max}^2, \quad (1)$$

где K – доля суммарной интенсивности рассеяния при $\phi=0$ от частиц с минимальным радиусом инерции.

Удельную поверхность сорбента в сухом и набухшем состояниях рассчитывали по методу Порода [11]. Кислотные свойства различных фракций катионита исследовали потенциометрическим титрованием в статических условиях. Навески сорбента (10 мг) помещали в 0,1 н. раствор хлористого натрия и добавляли 0,05 н. раствор гидроокиси натрия, так что суммарный объем системы составлял 10 см³. Титрование проводили при перемешивании в течение 70 ч при комнатной температуре. Характеристическую константу диссоциации определяли по методу Грегора, используя координаты Гендерсона – Гассельбаха [12] по уравнению

$$pK_{\text{зап}} = pH - n \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}, \quad (2)$$

где α – степень нейтрализации полизелектролита, n – параметр неидеальности.

Сорбционные свойства катионита КМ-2п изучали измеряя емкость сорбции белков с различными молекулярными массами из модельных растворов. В работе использовали препарат кристаллического инсулина (производство завода медпрепаратов объединения Ленимасопром), пепсина (производство НПО «Биохимреактив»), химотрипсингенена (производство фирмы «Сигма»). Сорбцию белков проводили в статических условиях при комнатной температуре в течение 20–22 ч при перемешивании. Навески сорбента (20 мг) помещали в растворы белков при оптимальном значении pH (для инсулина 4,0; для пепсина 2,2; для химотрипсингенена 7,0) и при начальных концентрациях белка 0,5–2,0 мг/см³. Концентрацию белков рассчитывали по оптической плотности растворов при 280 нм. При сорбции пепсина определяли также протеолитическую активность (ПЕ) этого фермента по методу Ансона [13], используя в качестве субстрата казеин при pH 2,2. По разности начальной и равновесной концентраций белка в растворе рассчитывали количество белка, сорбированного катионитом.

Обратимость сорбции пепсина (сохранение нативной структуры фермента) контролировали по десорбции фермента в динамических условиях. Для этого помещали сорбент в колонку размером 0,5×4 см и проводили сорбцию пепсина из раствора с концентрацией 0,5 мг/см³ при pH 2,2 до насыщения колонки. Для десорбции пепсина подавали на колонку 0,1 М раствор фосфатного буфера при pH 6,1 и измеряли активность и оптическую плотность во фракциях элюата. Скорость протекания растворов на стадии сорбции и десорбции 100–120 см/ч.

В табл. 1 представлены основные характеристики гранульных фракций КМ-2п, использованных в работе. Увеличение полной обменной емкости сорбента по мере уменьшения размера гранул можно легко объяснить более глубокой степенью гидролиза нитрильных групп в мелких гранулах за счет большей стерической доступности внутренних областей зерна для гидролизующего агента [8]. Сравнение параметра неидеальности n для гранул разного размера показывает также, что мелкие гранулы проявляют большую конформационную жесткость полизелектролитной сетки по сравнению с крупными гранулами. Это можно объяснить как большей степенью сшивания малых гранул за счет включения большего числа звеньев сшивющего агента на ранних стадиях сополимеризации, так и большей неоднородностью (пористостью) по сравнению с крупными гранулами.

Для решения этой альтернативы были исследованы морфология и структурные характеристики мелких и крупных гранул катионита. В табл. 2 представлены расчетные значения радиусов инерции элементов неоднородной структуры и удельные площади поверхности для мелких и крупных гранул в сухом и в набухшем в воде состояниях; при этом использовали сухие образцы, подготовленные различными методами – сушкой на воздухе и лиофильным высушиванием.

На рис. 1 представлены экспериментальные данные малоуглового рассеяния на сухих и набухших образцах в координатах Гинье. Расчетные значения размеров неоднородности исследуемых образцов в сухом и в набухшем состоянии показывают, что набухание сопровождается увеличением максимального и среднего размеров неоднородностей (пор) крупных гранул и соответствующим уменьшением удельной поверхности гетерогенного катионита. Характеристики пористости лиофильно высушенных образцов занимают среднее положение между воздушно-сухими

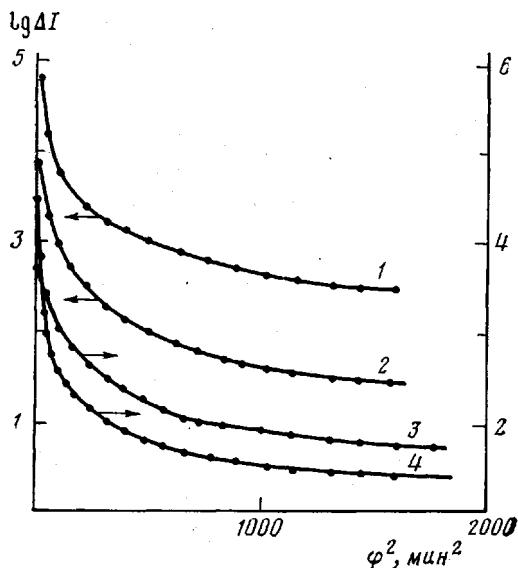


Рис. 1. Малоугловое рентгеновское рассеяние в координатах Гинье для набухших (1, 4) и воздушно-сухих образцов (2, 3) при зернении сорбента <200 (1, 2) и 500–630 мкм (3, 4). Время накопления импульсов 40 (1) и 10 с (2–4)

и набухшими образцами, что свидетельствует о большей сохранности гетерогенной структуры сополимера при удалении растворителя лиофильной сушкой. Минимальные размеры неоднородности структуры вносят незначительный вклад в суммарную интенсивность рассеяния (~1%, как это можно видеть из рис. 1) при $\phi=0$ и несколько уменьшаются при переходе от воздушно-сухого или лиофильно высушенного состояния к набухшему. Поскольку именно микропоры вносят значительный вклад в общую удельную поверхность гетерогенного образца, нужно отметить различную тенденцию у крупных и мелких гранул катионита при набухании: для крупных гранул удельная поверхность уменьшается и размеры макропор увеличиваются, тогда как у гранул <200 мкм макропоры

Таблица 1

Характеристики гранульных фракций КМ-2п

Зернение, мкм	Удельный объем, см³/г		Полная обменная емкость, г-экв/кг	$pK_{\text{хар}}$	n
	в сухом состоянии	в набухшем состоянии			
>630	1,5	3,5	8,0	—	—
630–500	1,12	2,4	9,1	6,15	1,35
500–315	—	—	9,5	5,8	1,4
<200	1,34	2,68	9,9	6,1	1,7

Таблица 2

Характеристики структуры катионита КМ-2п, рассчитанные из данных малоуглового рентгеновского рассеяния

Размеры гранул, мкм	Состояние образца	\bar{R} , нм	$R_{\text{мин}}$, нм	$R_{\text{макс}}$, нм	Удельная поверхность, $\text{м}^2/\text{см}^3$
630–500	Сухой	11,1	2,3	12,0	153
	Лиофильно-сухой	13,9	2,8	14,0	49
	Набухший	17,5	1,6	17,5	98
<200	Сухой	12,8	2,3	12,8	94
	Лиофильно-сухой	11,1	3,5	13,5	65
	Набухший	12,1	1,8	12,2	137

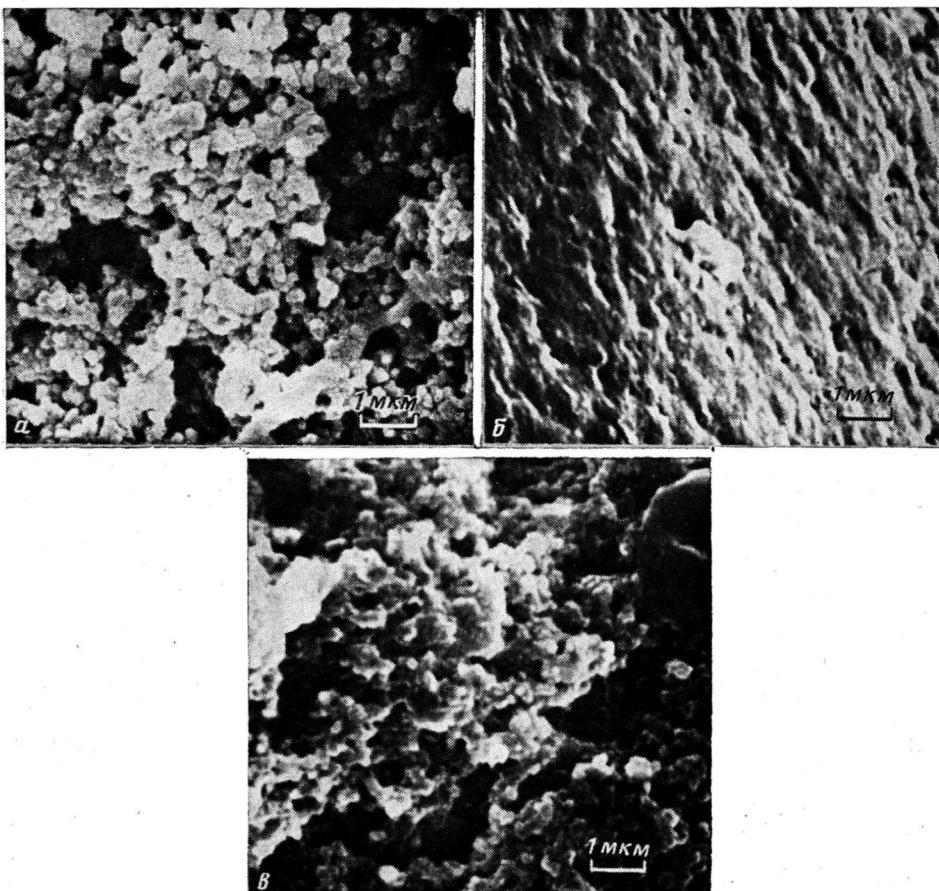


Рис. 2. Растворная электронная микроскопия поверхности гранул КМ-2п: *а* – крупные гранулы (>630 мкм), *б* – мелкие (<200 мкм); *в* – разлом мелкой гранулы, ($\times 10\,000$)

почти не изменяют своего объема при набухании, микропоры уменьшаются, а удельная площадь поверхности растет. Такая тенденция позволяет предположить, что мелкие гранулы катионита в действительности более плотно спиты сшивющим агентом, чем крупные гранулы. Это может сказываться на сравнительной проницаемости мелких и крупных гранул сорбента.

Данные прямой электронной микроскопии зерен в известной степени подтверждают это предположение. На рис. 2 представлен рельеф структуры поверхности крупного (>600 мкм) и мелкого зерна (200 мкм), а также структура разлома мелкого зерна. Сравнение показывает, что мелкие гранулы имеют поверхность с пониженной пористостью по сравнению с крупными гранулами, тогда как внутренние области мелких гранул имеют макропористую высокопроницаемую структуру, практически неотличимую от структуры крупных гранул.

Поэтому исследование сорбционной емкости данного катионита по отношению к белковым макромолекулам проводили на гранульной фракции КМ-2п и на измельченном образце КМ-2пМ, полученном из более крупных гранул механическим истиранием и имеющем сравнимые с гранульным образцом размеры зерен.

На рис. 3 представлены изотермы сорбции инсулина, химотрипсина и пепсина на крупных гранулах катионита КМ-2п, которые имеют тот же характер изотерм с насыщением, который известен для сорбции белков на карбоксильных катионитах типа КМТ и Биокарб [6, 7], а также на пористых стирол-дивинилбензольных сульфокатионитах [14]. На рис. 4 приведены изотермы сорбции пепсина и инсулина на крупных

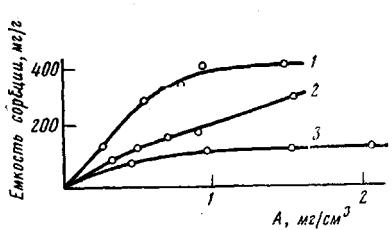


Рис. 3

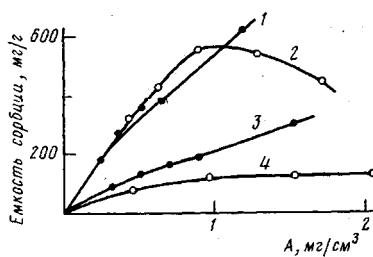


Рис. 4

Рис. 3. Изотермы сорбции химотрипсингена (1), пепсина (2) и инсулина (3) на гранульном образце катионита КМ-2п с размерами зерен >630 мкм. Здесь и на рис. 4 А – равновесная концентрация белка

Рис. 4. Изотермы сорбции пепсина (1, 3) и инсулина (2, 4) на гранульной фракции сорбента КМ-2п (3, 4) и на измельченном образце КМ-2пМ (1, 2)

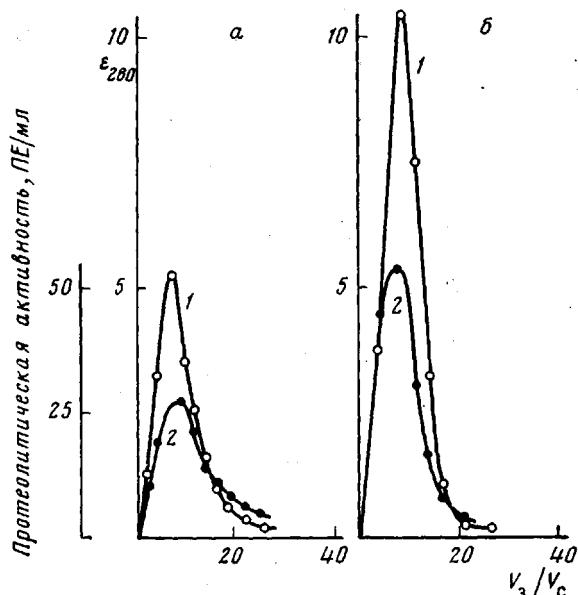


Рис. 5. Выходные кривые элюции пепсина с гранульного (а) и с измельченного образца (б) при сравнимых размерах зерен и размере колонок 0,5×4 см; 1 – оптическая плотность раствора, 2 – активность пепсина в казеинолитических единицах

гранулах и на измельченной фракции, полученной из этих же гранул. Из этих данных можно сделать два вывода: во-первых, карбоксильный катионит КМ-2п проявляет значительную селективность при сорбции белков из модельных растворов (коэффициенты распределения составляют 63 для пепсина, 151 для химотрипсингена и 35 для инсулина); во-вторых, предельные емкости сорбции и селективность возрастают при переходе от гранульного к механически измельченному образцу.

Чтобы убедиться, что наблюдаемый эффект увеличения емкости и селективности не связан с геометрическим размером зерен (а также для контроля за обратимостью сорбции протеолитического фермента пепсина), провели сорбцию и десорбцию пепсина в динамическом режиме на гранульном образце (<200 мкм) и на механически измельченном, сравнимом с ним по размеру (220–100 мкм). На рис. 5 представлены выходные кривые десорбции пепсина фосфатным буфером, которые показывают, что измельченный образец обнаруживает большую емкость сорбции и проявляет лучшие кинетико-динамические характеристики по сравнению с гранульным образцом. Выход по активности фермента также выше в случае измельченного образца (82%), что, по-видимому, связано с удлиненным хроматографическим хвостом в случае гранульного сорбента (58%), как это видно из рис. 2, а.

Таким образом, макропористый карбоксильный катионит КМ-2п по своим структурным и сорбционным характеристикам может быть отнесен к классу биосорбентов и рекомендован для ионообменной хроматографии белков и других высокомолекулярных физиологически активных веществ.

Авторы выражают благодарность Т. Е. Погодиной и Ю. С. Надежину за техническую помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаев А. Я. Успехи химии, 1963, т. 32, № 9, с. 1037.
2. Jones D. T. Proc. Biochem., 1974, № 12, p. 17.
3. Mikeš O., Štrop P., Zbrožek J., Čoupek J. J. Chromatogr., 1976, v. 119, p. 339.
4. Mikeš O., Štrop P., Sedláčkova J. J. Chromatogr., 1978, v. 148, № 1, p. 237.
5. Шатаева Л. К., Самсонов Г. В. Хим.-Фарм. ж., 1977, т. 11, № 4, с. 78.
6. Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э. В кн.: Карбоксильные катиониты в биологии/Под ред. Самсонова Г. В. Л.: Наука, 1979, с. 213.
7. Шатаева Л. К., Орлиевская О. В., Джмухадзе Ц. И., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1975, т. 17, № 10, с. 735.
8. Ласкорин Б. Н., Логвиненко И. А., Зорина А. И., Сахарова Л. И., Хараши М. И., Халимова А. К., Болотов А. М., Трофимов Ю. В. В кн.: Иониты и ионный обмен. Л.: Наука, 1975, с. 5.
9. Надеждин Ю. С., Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Сидорович А. В., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1975, т. 17, № 2, с. 448.
10. Стэгтон В. В кн.: Новейшие методы исследования полимеров. М.: Мир, 1966, с. 197.
11. Guinier A., Fourquet G. Small-angle scattering of X-ray. N. Y.: John Wiley and Sons, Inc., 1955, p. 156.
12. Gregor H. P., Hamilton M. J., Becher J., Bernstein F. J. Phys. Chem., 1955, v. 59, № 9, p. 874.
13. Anson M. L. J. Gen. Phys., 1938, v. 22, № 1, p. 79.
14. Островский Д. И., Дмитренко Л. В., Самсонов Г. В. Изв. АН СССР, Серия химич., 1973, № 5, с. 1145.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
16.I.1981

STRUCTURE AND SORPTION PROPERTIES OF MACROPOROUS CARBOXYLIC CATION-EXCHANGER KM-2p

*Radzyavitchyus K. I., Shataeva L. K., Samsonov G. V.,
Zhukova N. G., Zorina A. I., Laskorin B. N.*

Summary

The heterogeneity and morphology of carboxyl cation-exchanger KM-2p have been studied by small-angle X-ray scattering and electronic microscopy methods. The isotherms of proteins sorption (pepsine and chymotrypsinogen) on this sorbent were measured. It was shown that large granulae of cationite had the upper shell with enhanced density preventing the good permeability of protein macromolecules into inner regions of the sorbent grain. The mechanical grinding of granulae removes this obstacle.