

**РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСЕЙ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА КРЕМНЕЗЕМЕ С ПРИВИТЫМИ
ГЛИКОЛЕВЫМИ ГРУППАМИ**

Мчедлишвили Б. В., Староверов С. М., Лисичкин Г. В.

Изучены адсорбционные и хроматографические свойства кремнеземов (макропористых стекол и силохромов), химически модифицированных прививкой γ -триэтоксисиллпропилглицидилового эфира. Представлены данные по адсорбции альбумина и гель-фильтрации вирусных супензий на модифицированных таким образом кремнеземах.

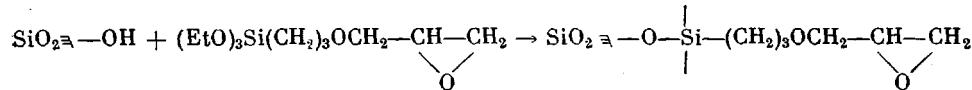
Исследования последнего десятилетия в области хроматографии полимеров позволили создать эффективный метод очистки и разделения сложных смесей биологически активных высокомолекулярных соединений (ВМС) с использованием в качестве носителя кремнеземов (силохромов и макропористых стекол). Уже первые работы по жидкостной ситовой (гель-фильтрационной) хроматографии белков, вирусов и других ВМС на кремнеземах показали преимущество минеральных носителей перед органическими [1, 2]. Основным фактором, сдерживающим широкое применение пористых кремнеземов для хроматографического разделения ВМС, является сильная и зачастую необратимая адсорбция макромолекул на поверхности таких носителей. Для устранения этого нежелательного явления, обусловленного сильным взаимодействием поверхностных сианольных групп с макромолекулами, кремнеземы химически или адсорбционно модифицируют [3]. Существенно, что для разделения ВМС, используемых в качестве фармацевтических средств, вещества-модификаторы не должны быть токсичными и вымываться с поверхности длительное время.

В настоящей работе изложены результаты исследований по синтезу и изучению адсорбционных и хроматографических свойств кремнеземов, химически модифицированных прививкой γ -триэтоксисиллпропилглицидилового эфира (ТПГЭ) и предназначенных для гель-фильтрационного разделения сложных смесей ВМС (белков и вирионов).

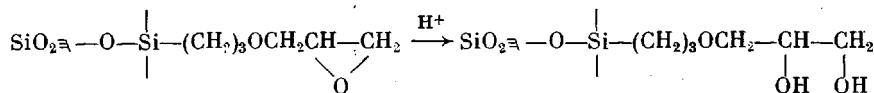
В качестве носителя использовали силохром С-80 (средний диаметр под 0,045 мкм, удельная поверхность 80–100 см²/г), макропористое стекло МПС-1000 В-ГХ (средний диаметр пор 0,11 мкм, удельная поверхность 70 м²/г) и силохром С-2 (средний диаметр пор 0,2 мкм, удельная поверхность 41 м²/г).

Модифицирование поверхности кремнеземов проводили двумя способами: из абсолютного ксиола при 140° в течение 30 ч [4] и из воды при 90°, pH 5–6 в течение 1,5 ч.

Процесс модифицирования описывается схемой



После отмычки непрореагированного избытка модификатора проводили раскрытие эпоксицикла при pH 2 в течение 1 ч



В качестве теста на наличие доступных сианольных групп в поверхностном слое модифицированного носителя использовали адсорбцию альбумина. Адсорбцию альбумина проводили из физиологического раствора (0,15 моль/л хлорида натрия;

**Анализ модифицированных кремнеземов на содержание углерода
и данные по адсорбции белков и вирусов из физиологического раствора
и из растворов в pH 7,65 и 8,7**

Носитель	С, %	Равновесная концентрация альбумина, мг/мл	Адсорбция альбумина, мг/г сорбента	Выход вирусов, %	
				грипп	бешенство
Исходный кремнезем (силохром)	0	0,46	32,7	10	0
B *	1,6	1,55	0	90–100	100
K *	1,6	1,00	16,5	50–60	10
B (7,8)	1,7	1,55	0	90–100	100
B (8,7)	1,8	1,55	0	100	100

* Физиологический раствор.

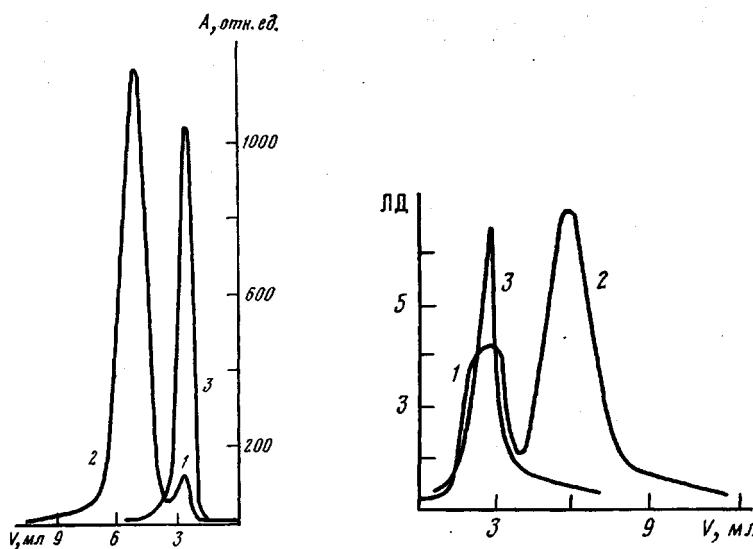


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Гель-хроматографическая очистка аллантоинской супензии вируса гриппа (штамм А (Техас) 77a (H_3N_2)) на силохроме С-2 с привитыми гликоловыми группами: 1 – зона вируса, 2 – зона примесных белков (оптическая плотность при длине волны ультрафиолетового света 254 нм), 3 – активность вируса гриппа А в единицах гемагглютинирующей активности. Выход примесных белков и вирусов из колонки 100%

Рис. 2. Гель-хроматография 10%-ной мозговой супензии вируса бешенства (штамм «Москва») на пористом стекле МПС-1000В-ГХ с привитыми гликоловыми группами: 1 – зона вируса, 2 – зона примесных белков, 3 – инфекционная активность вируса ЛД в ед. $\text{lg LD}_{50}/0,03$ мл. Выход из колонки примесных белков 75%, вируса 100%

pH 7; навеска сорбента 0,1 г; объем раствора альбумина 3 см³; время сорбции 24 ч; 12°.

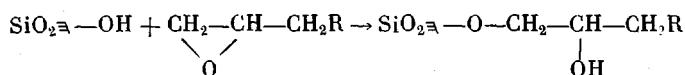
Гидролитическую стабильность сорбентов изучали в динамическом режиме: 1 см³ сорбента промывали со скоростью 0,5 мл/мин 100 см³ дистиллированной воды и 100 см³ буфера А (0,05 моль/л трис-оксиметиламинометана, 0,15 моль/л хлорида натрия, pH 7,8) или буфера Б (0,5 моль/л трис-оксиметиламинометана, 1 моль/л хлорида натрия, pH 8,7). Затем сорбенты промывали 500 см³ дистиллированной воды. Стабильность модифицирующего слоя оценивали по данным элементного анализа и по адсорбции альбумина.

Хроматографию ВМС проводили на колонках 0,9×10 см. Объем вводимой пробы составлял 1 см³, скорость элюирования 4–8 см/мин. Элюирование осуществляли буфером А.

Опыты по адсорбции альбумина показали, что более плотное покрытие поверхности кремнезема достигается при нанесении модификатора из воды (таблица). Альбумин не сорбируется на кремнеземе, модифицированном ТПГЭ из водного раствора (В), тогда как при нанесении модификатора из ксилола (К) наблюдается заметная адсорбция альбумина. Это сказывается на хроматографических свойствах модифицированных кремнеземов. Так, выход вирусов гриппа и бешенства на сорбенте К составляет 10–60%, а на сорбенте В 90–100% (рис. 1 и 2).

Изучение гидролитической стабильности сорбента В показало, что привитый слой устойчив вплоть до значений pH 8,7: в пределах ошибки измерений содержание модификатора после такой обработки не изменяется и не происходит сорбции альбумина (таблица). В статических условиях сорбенты, модифицированные ТПГЭ, сохраняют свои свойства при pH 7,8 и ионной силе 0,15 моль/л, по крайней мере, в течение 1,5 лет. При этом выход белков и вирионов сохраняется на уровне 100%.

Образование менее плотного покрытия при нанесении модификатора из ксилола связано, по нашему мнению, с возможностью протекания побочных процессов. В частности, длительность нанесения (30 ч) и повышенная температура (140°) могут привести ко взаимодействию между эпоксигруппой ТПГЭ и силиконовыми группами поверхности



Образовавшаяся система связей Si – O – C легко гидролизуется, освобождая силиконовые группы.

Таким образом, описанный метод модифицирования кремнезема позволяет получить сорбенты, обратимо взаимодействующие с молекулами ВМС и вариконами, что в свою очередь дает возможность проводить гель-фильтрацию весьма сложных смесей ВМС без потери их биологической активности.

Авторы приносят сердечную благодарность Н. К. Бебрис за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бреслер С. Е., Добычин Д. П., Попов А. Г., Суходолова А. Т.* Молек. биол., 1969, т. 3, № 1, с. 29.
2. *Kiselev A. V., Khokhlova T. D., Eltekov Yu. A., Nikitin Yu. S.* In: Inter. symp. on separ. methods. Column chromatography. Suppl. Chimia. Lausanne: Aarau. Swiss Chemists Ass., 1970, p. 124.
3. *Борисова В. Н., Мchedlishvili B. B., Нахапетян Л. А.* Синтетические макропористые сорбенты в хроматографии биополимеров: Обзорная информация. М.: Главмикробиопром, 1979, № 4, с. 57.
4. *Староверов С. М., Нестеренко П. Н., Лисичкин Г. В.* Вестник МГУ. Сер. хим., 1980, № 4, с. 370.

Ленинградский политехнический
институт им. М. И. Калинина

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
14.IV.1982

SEPARATION OF MIXTURES OF HIGH-MOLECULAR COMPOUNDS BY CHROMATOGRAPHY ON SILICA HAVING GRAFTED GLYCOL GROUPS

Mchedlishvili B. V., Staroverov S. M., Lisichkin G. V.

Summary

Adsorptional and chromatographic properties of silicas (macroporous glasses and silochroms) chemically modified by grafting of γ -triethoxysilylpropylglycidyl ester have been studied. The data on adsorption of albumin and gel-filtration of virus suspensions on modified silicas are presented.