

4. Губен-Вейль. Методы органической химии. М.: Химия, 1967, т. 2, с. 139.
5. Cameron G. G., Kane D. R. Makromolek. Chem., 1968, B. 113, S. 75.
6. Уолл Л. В кн.: Фторполимеры. М.: Мир, 1975, с. 329.
7. Горелов Ю. П., Терман Л. М., Хеиливичкий Р. Я. В кн.: Физико-химические основы синтеза и переработки полимеров: Межвуз. сб. Горький, 1978, вып. 3, с. 65.
8. Голубев С. В., Голованков Н. А., Семчиков Ю. Д. В кн.: Физико-химические основы синтеза и переработки полимеров: Межвуз. сб. Горький, 1979, вып. 4, с. 19.

Поступила в редакцию
14.VI.1982

УДК 541.64 : 547.96

О ВОЗМОЖНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОЧНЫХ, МЕДЛЕННО ДИССОЦИИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ МАКРОИОНОВ С КАРБОКСИЛЬНЫМ КАТИОННОМ БИОКАРБ-Т

*Дубинина Н. И., Селеznева А. А., Елькин Г. Э.,
Самсонов Г. В.*

Ранее нами было показано наличие двух типов конечного распределения сорбированных белков в гранулах карбоксильного катионита Биокарб-Т — равномерного и неравномерного [1]. Для последнего характерно образование поверхности «непроницаемого» слоя (оболочки) в грануле с резкой границей между преобразованной оболочкой и непреобразованной сердцевиной зерна.

Цель данной работы — исследование особенностей сорбции белков и концентрационных профилей в гранулах карбоксильного катионита Биокарб-Т в случае различных типов конечного распределения сорбтива.

Ионит Биокарб-Т является сополимером метакриловой кислоты и гексагидро-1,3,5-триакрилоилтриазина. Сетчатый полиэлектролит данного типа, полученный в присутствии растворов уксусной кислоты определенной концентрации, характеризуется в гидратированном состоянии гетерогенной пористостью — неоднородной по плотности структурой, состоящей из уплотненных гелевых областей и разреженных негелевых пространств [2]. Размеры пор сорбента Биокарб-Т имеют порядок десятков и сотен ангстрем и превосходят размеры макромолекул большинства белков. Сорбция белков идет по развитой поверхности в разрежениях между гелевыми участками. В работе использовали ряд белков различной молекулярной массы: сывороточный альбумин (бычий) — кристаллический препарат белка фирмы Koch-Light 99 %-ной чистоты, гемоглобин человека — дialisированный препарат белка, полученный по методике [3], террилитин — препарат производственного объединения «Мосмедпрепараты», дополнительно очищенный ультрафильтрационным методом, цитохром С — препарат фирмы «Biomed Krakow» 65–75 %-ный. Физико-химические свойства белков (их ММ и емкость Q (в г/г сорбента)) и наблюдаемые типы конечного распределения сорбтива представлены в таблице.

Сорбция белков осуществляли из буферных растворов с различным значением pH в статических условиях при 5° на натриево-водородных формах сорбента. Для этого ионит предварительно уравновешивали тем же буферным раствором. При pH 5,0–8,5 использовали фосфатные буферные растворы с ионной силой 0,05. Сорбцию террилитина проводили при pH 4,2 из ацетатного буферного раствора, имеющего ионную силу 0,5. Концентрацию хромофорных белков (гемоглобина и цитохрома С) определяли по величине оптической плотности растворов при длине волн 570 и 521 нм соответственно [3, 4], а концентрацию нехромофорных — по методу Лоури [5]. Срезы зерен ионитов получали согласно методу [6]. Контрастирование зон нехромофорных белков в срезах проводили амидовым черным 10B по методике [7].

За конечное состояние при сорбции в данных системах независимо от типа распределения сорбтива принимали такое состояние, при котором концентрация белка во внешней фазе не изменяется в течение 5–6 сут. Достижение такого состояния системы подтверждалась предварительными экспериментами по кинетике сорбции.

Исследованиями распределения белков в гранулах сорбентов Биокарб-Т установлено, что тип конечного распределения сорбтива в данной системе зависит от величины pH раствора. При изучении сорбции в разных системах выяснено, что отсутствует прямая зависимость между типом конечного распределения сорбтива и ММ сорбируемых макроионов (таблица). Тип конечного распределения сорбированных белков сохраняется для всех ионитов Биокарб-Т, характеризующихся гетерогенной структурой в набухшем состоянии.

Анализ причин установления двух типов конечного распределения сорбтива дает возможность предположить, что важную роль в образовании того или иного распределения сорбтива в зернах гетерогенных ионитов (при условии первоначальной доступности сорбционных центров) играют

Сорбция белков ионитом Биокарб-Т, синтезированным в 10%-ной уксусной кислоте

Белок	$M \cdot 10^{-3}$	pI	pH	Q	Тип конечного распределения сорбтива
Сывороточный альбумин	69	4,8	5,0 7,0	2,4 0,5	Оболочка – ядро То же
Гемоглобин	68	7,0	5,5 7,0 8,0	1,5 4,0 0,7	Оболочка – ядро Равномерный То же
Террилитин	27	4,6	4,2	1,2	Оболочка – ядро
Цитохром С	13	10–11	5,0 7,0 8,5	2,5 4,0 5,2	Оболочка – ядро Равномерный То же

особенности межмолекулярного взаимодействия в системе белок – ионит. Они связаны с физико-химическими свойствами сорбируемых ионов белков, в частности с многозарядностью последних и склонностью к полифункциональному взаимодействию с ионитом. Следствием этого является способность макромолекул в определенных условиях к многоточечному взаимодействию с функциональными группами и с матрицей сорбента. В таких случаях равновесие реакции обмена однозарядных минеральных ионов на полион белка должно быть сильно сдвинуто в сторону адсорбции последнего. При этом могут образовываться прочные, слабо диссоциированные соединения в фазе сорбента. Это связано с тем, что одновременный разрыв большого количества связей, возникших между сорбированными макромолекулами белка и сорбентом, затруднителен и диссоциация соединений белка с сорбентом может протекать достаточно медленно. В то же время при образовании соединения макромолекулы белка с сорбентом должен наблюдаться кооперативный эффект: появление одной связи облегчает образование следующих [8]. Это, по-видимому, должно способствовать в определенных случаях более медленной скорости диссоциации этих соединений по сравнению со скоростью их образования (ассоциации). Отношение кинетических констант прямой и обратной реакции равно константе равновесия обратимой реакции связывания сорбтива. При больших различиях скоростей быстрых реакций (прямой и обратной) может проявиться своеобразное явление диффузии с подвижной границей [2, 9].

Факт образования в некоторых случаях таких соединений подтверждается при изучении профилей концентраций в зерне. Когда наблюдается конечное неравномерное распределение сорбтива, происходит образование резкой движущейся границы сорбционной волны в гранулах. В системах с конечным равномерным распределением сорбтива появляются размытые профили концентраций в зернах.

Установлено также, что в первом случае обратный процесс, связанный с десорбцией белка, протекает крайне медленно. При проведении его в

течение месяца величина десорбции составляет не более 10% от максимально возможного количества белка, которое должно десорбироваться при данной концентрации в растворе. Во втором случае обратный процесс протекает более быстро (рис. 1, а). Для сравнения на рис. 1, б приведены кинетические кривые сорбции белков. При построении рис. 1, а в качестве переменной величины использовали степень десорбции $F=Q_t/Q_\infty$, где Q_t — количество десорбированного белка к моменту времени t ; Q_∞ — максимальное возможное количество белка, которое должно бы десорбироваться при данной концентрации в растворе (величину Q_∞ рассчитывали по разности между исходной концентрацией белка в сорбенте m_0 и концентрацией белка в сорбенте m_c , соответствующей на сорбционной ветви изотермы конечной неизменяющейся концентрации белка в растворе: $Q_\infty=m_0-m_c$). А при построении сорбционных кривых (рис. 1, б) под величиной F имели в виду

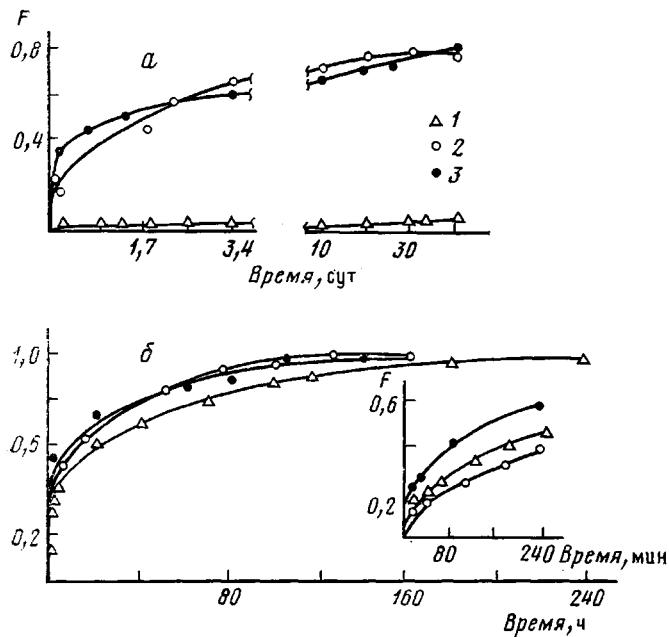


Рис. 1. Кинетические кривые десорбции (а) и сорбции (б) террилита при pH 4,2 (1), цитохрома С при pH 8,5 (2) и гемоглобина при pH 7,0 (3)

степень завершенности процесса, т. е. отношение количества белка, сорбированного к моменту времени t , к емкости сорбента, соответствующей конечной неизменяющейся концентрации белка в растворе.

Медленное протекание десорбции (в течение 720 ч) способствует появлению изотерм со значительным гистерезисом (рис. 2, а). Термин изотерма ввиду привычности этого понятия мы используем также и в том случае, когда установившееся состояние системы характеризуется конечным неравномерным распределением сорбтива по зерну. Для таких систем точки, полученные при добавлении к насыщенному белком сорбенту буферного раствора, не содержащего сорбтива (десорбция), оказываются лежащими значительно выше точек, полученных насыщением сорбента и соответствующих тем же концентрациям белка в растворе. В то же время добавление раствора белка большей концентрации к иониту, находившемуся до этого в контакте с раствором белка меньшей концентрации и не изменявшему свое состояние в течение длительного времени (сдвиг полученного состояния «снизу»), приводит к дополнительной сорбции белка. При этом устанавливается новое, не изменяющееся во времени, состояние,

соответствующее более высокой концентрации в растворе. Точка, соответствующая этому новому состоянию, оказывается лежащей на ветви кривой, полученной путем однократного сорбционного акта. Так как для систем с конечным равномерным распределением сорбтива обратный процесс проходит значительно быстрее, расхождение между сорбционной и десорбционной ветвями изотермы невелико (рис. 2, б).

Таким образом, для объяснения наблюдаемых явлений (значительного гистерезиса сорбции и подвижной резкой границы при диффузии) можно полагать, что сорбция сопровождается образованием слабо диссоциированных соединений белка с сорбентом, и скорость реакции диссоциации комплексов белок — сорбент очень мала при низких pH и возрастает с увеличением pH.

Однако из теоретического анализа процесса с движущейся границей и из экспериментальных исследований сорбции малых ионов (минеральных) следует, что резкая граница между преобразованной оболочкой и непреобразованной сердцевиной зерна должна продвигаться до полного заполнения гранулы ионита [9, 10]. В то же время в указанных случаях движение границы постепенно замедляется и прекращается до завершения.

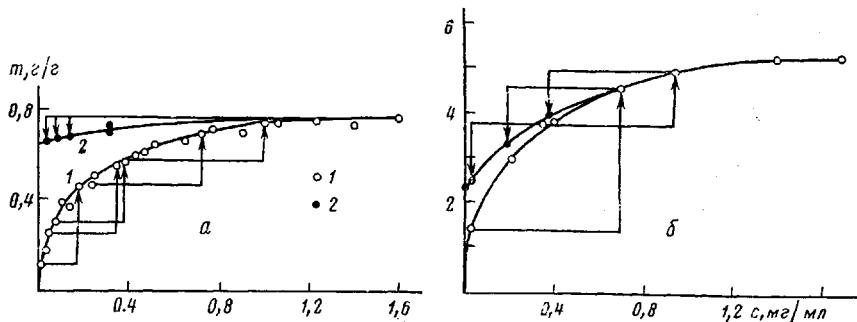


Рис. 2. Изотермы сорбции террилитина при pH 4,2 сорбентом Биокарб-Т, синтезированным в 20%-ной уксусной кислоте (а) и цитохрома С при pH 8,5 сорбентом Биокарб-Т, синтезированным в 10%-ной уксусной кислоте (б): 1 — сорбционная кривая; 2 — десорбционная. m — емкость сорбента по белку, c — конечная концентрация в растворе

заполнения зерна. Показано, что при увеличении длительности контакта до одного месяца неравномерный характер распределения сорбтива в зернах сохраняется и величина емкости сорбента не меняется. Весьма интересно, что для данных систем отсутствует зависимость предельной емкости ионита от размера гранул, а отношение толщины оболочки к радиусу зерна сорбента является постоянной величиной и не зависит от его размера, т. е. постоянен относительный радиус ρ «непоглощающего» ядра в гранулах различной дисперсности ($\rho = 1 - l/r_0$, где l — толщина оболочки, r_0 — радиус зерна).

По-видимому, такое поведение границы связано как с большими размерами сорбируемых ионов и (как следствие) с малыми скоростями их диффузии в ионите (как видно из рис. 1, б, скорость сорбции по истечении некоторого начального промежутка времени резко замедляется), так и с медленной диссоциацией образовавшегося соединения. Перенос свободных макроионов белка может осуществляться преимущественно в обход занятых функциональных групп из-за образования медленно диссоциирующих соединений. В таком случае вследствие уменьшения размеров каналов должна существенно уменьшиться стерическая доступность сердцевины зерна. Необходимо учитывать происходящие при сорбции органических ионов сложные изменения в структуре ионита: уменьшение упругости его зерен [11], их сжатие в процессе высокоизбирательной сорбции органиче-

ских ионов [12, 13] и т. п. Наблюдается также ассоциация ионов в сорбированном состоянии и многослойная сорбция [12]. Все перечисленные факторы в конечном итоге могут привести к прекращению процесса задолго до полного заполнения гранулы.

Сдвиг рН раствора в сторону больших значений, облегчающий разрыв связей катионита с макромолекулой белка из-за перезарядки последней, не только переводит систему из состояния, способствующего образованию подвижной резкой границы и конечному неоднородному заполнению гранулы, в состояние, для которого характерными являются размытые границы и конечное однородное заполнение, но и смещает равновесие в сторону десорбции белка. Этот факт также свидетельствует в пользу предположения о замедленности стадии десорбции как о причине рассмотренных выше кинетических и квазиравновесных явлений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селезнева А. А., Дубинина Н. И., Лукницкая О. Ф., Самсонов Г. В. Коллоидн. ж., 1976, т. 38, № 6, с. 1194.
2. Шагаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э. Карбоксильные катиониты в биологии. Л.: Наука, 1979, с. 65.
3. Гаурович Ф. Химия и функции белков. М.: Мир, 1965, с. 388.
4. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam – L.: North-Holland Publ. Co., 1971, p. 4.
5. Lowry O. H., Roserbrough N. J., Furr A. L. J. Biol. Chem., 1953, v. 193, № 1, p. 265.
6. Герасимов Г. Я., Яхонтова Л. Ф., Брунс Б. П. В кн.: Исследования в области промышленного применения сорбентов. М.: Изд-во АН СССР, 1961, с. 70.
7. Maupher G. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1965, с. 88.
8. Николаев А. Я. Биохимия, 1962, т. 27, № 3, с. 487.
9. Кокотов Ю. Я., Пасечник В. А. Равновесие и кинетика ионного обмена. Л.: Химия, 1970, с. 306.
10. Helfferich F. J. Phys. Chem., 1965, v. 69, № 4, p. 1178.
11. Либинсон Г. С. Сорбция органических соединений ионитами. М.: Медицина, 1979, с. 114.
12. Дмитренко Л. В. Автореф. дис. на соискание уч. ст. докт. хим. наук. Л.: ИВС АН СССР, 1974. 40 с.
13. Якович Г. А., Елькин Г. Э., Воробьева В. Я., Самсонов Г. В. Коллоидн. ж., 1980, т. 42, № 1, с. 181.

Всесоюзный научно-исследовательский
технологический институт антибиотиков
и ферментов медицинского назначения

Поступила в редакцию
14.VI.1982

УДК 541(515+64)

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ РАДИКАЛОВ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ РАЗЛОЖЕНИИ ОЛИГОПЕРЭФИРОВ В ВЯЗКИХ СРЕДАХ

Иванчев С. С., Семенова В. А., Матвеенцева М. С.,
Зяльков И. П.

При использовании пероксидных соединений в качестве инициаторов полимеризации часто приходится считаться с тем, что по ходу процесса вязкость системы нарастает. Изучение зависимости констант скорости разложения пероксидов и вероятности выхода радикалов из клетки растворителя при изменении вязкости в системе представляет особый интерес. В работах [1, 2] на примере ряда монопероксидов (диацильных пероксидов и перэфириров) показано, что при увеличении вязкости среды снижается вероятность выхода радикалов в объем из клетки. Клеточный эффект при распаде полифункциональных пероксидов практически не исследован.