

УДК 541(63+183.12)

СТРОЕНИЕ ПРИВИТЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ФАЗ И ОСОБЕННОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ НА КОМПОЗИЦИОННЫХ АНИОНООБМЕННИКАХ

© 1994 г. А. Е. Иванов, С. В. Белов, В. П. Зубов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

117871 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 05.07.93 г.

Методами ЭСХА, ртутной порометрии и путем получения изотермы химической адсорбции поли-*n*-нитрофенилакрилата на непористых и пористых силикатных носителях охарактеризованы хемосорбционные слои указанного полимера. Плотность хемосорбционных слоев поли-*n*-нитрофенилакрилата в ~2 раза превышает плотность полимерного клубка в растворе, а их толщина составляет 40 - 50 Å. Путем обработки раствором 2-диэтиламиноэтамина в диметилформамиде хемосорбционные слои поли-*n*-нитрофенилакрилата могут быть превращены в гидрофильные слои полиакриламидной природы, представляющие интерес в качестве поверхностных фаз композиционных анионообменников, предназначенных для разделения белков. Найдено, что хроматография сывороточного альбумина и овальбумина на полученных сорбентах характеризуется более высоким разрешением компонентов и более мягкими условиями их элюции по сравнению с сорбентами, построенными на основе сшитых пористых полимерных частиц (DEAE-Toyopearl 650 M). Обсужден возможный вклад эффекта исключенного объема привитых цепей в механизм связывания белков композиционными сорбентами.

Прививку полимеров на неорганические матрицы успешно применяли для модификации наполнителей и получения композиционных полимерных материалов. В последнее время этот подход становится все более актуальным при создании материалов биомедицинского назначения. Неорганические носители с привитыми полимерными функционально-активными фазами (композиционные сорбенты) широко используются для хроматографического анализа, препаративной очистки и иммобилизации биополимеров. Композиционные сорбенты сочетают в себе высокую механическую стабильность с биосовместимостью мягких гелей на основе декстрана, агарозы, полиакриламида, традиционно используемых в качестве носителей для разделения белков. Указанная комбинация свойств делает композиционные сорбенты незаменимыми в высокоеффективной жидкостной хроматографии, особенно при необходимости разделения биологически-активных высокомолекулярных веществ. Многообразие способов получения композиционных сорбентов, взаимосвязь их структуры и свойств были подробно рассмотрены нами в обзоре [1].

В последние годы получены убедительные свидетельства того, что разрешающая способность, селективность и емкость композиционных сорбентов заметно отличаются от аналогичных свойств традиционных сорбентов, построенных на основе сшитых полимеров и обладающих сходной химической функциональностью. В ряде

работ отмечено, что протяженные сегменты (петли и хвосты) химически адсорбированных или привитых на неорганический каркас макромолекул способны играть роль гибких спейсеров, облегчающих взаимодействие белковых сорбатов с комплементарными функциональными группами поверхности фазы [2 - 4].

В предыдущих работах нами был предложен способ получения привитых фаз, состоящих из N-замещенных полиакриламидов, заключающийся в химической адсорбции поли-*n*-нитрофенилакрилата (ПНФА) на поверхности аминопропилсилированных неорганических носителей с последующим амидированием сложноэфирных групп полимера алифатическими первичными аминами [1, 4, 5]. Таким образом могут быть получены сорбенты для гидрофобной и биоспецифической хроматографии белков, а также носители для иммобилизации ферментов.

В настоящей работе нами охарактеризована структура химически адсорбированного ПНФА, показана возможность получения на его основе анионообменной привитой фазы и изучены некоторые особенности фракционирования белков на сорбентах этого типа.

Для изучения тонких поверхностных слоев адсорбированных или привитых полимеров часто используют метод рентгеновской электронной спектроскопии для химического анализа (ЭСХА). Метод дает информацию об элементном составе поверхности и типе функциональных групп поли-

мера и носителя, расположенных в поверхностном слое толщиной до 50 Å [6]. С целью получения более полной информации о слоях адсорбированного ПНФА метод ЭСХА был использован нами в сочетании с методом ртутной порометрии, позволяющим детектировать изменения в структуре пористых твердых тел, происходящие в результате адсорбции полимеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ПНФА с $M_w = 4.6 \times 10^4$, $M_w/M_n = 3.4$, полученный путем радикальной полимеризации мономера и переосажденный как описано в работе [7]. Для синтеза композиционных сорбентов применяли макропористое стекло марки МПС-2000 ВГХ (г. Нижний Новгород) с размером частиц 50 - 100 мкм и макропористый силикагель XWP-1500 (ФРГ) с размером частиц 16 - 23 мкм, а также 2-диэтиламиноэтиламин ("Fluka", Швейцария). В качестве белковых стандартов использовали бычий сывороточный альбумин (фракция 5, "Boehringer-Mannheim", Австрия) и овальбумин ("Serva", ФРГ).

Неорганические носители химически модифицировали 2%-ным раствором γ-аминопропилтриэтоксисилана в сухом толуоле при 100°C в течение 20 ч, промывали ацетоном, сушили на воздухе и под вакуумом. Стеклянные пластинки для получения спектров ЭСХА перед химической модификацией оплавляли в пламени газовой горелки, обрабатывали концентрированной серной кислотой, затем кипящей 0.1 М соляной кислотой, промывали дистilledированной водой, сушили на воздухе и под вакуумом.

Изотерму химической адсорбции ПНФА получали на непористом микросферическом силикагеле "Моносфер" (диаметр частиц 1.4 мкм) как описано в работе [7]. Для получения хемосорбционных слоев ПНФА аминопропилсилицированные носители обрабатывали 2%-ным раствором полимера в сухом ДМСО в течение 2 сут, многократно промывали ДМСО, ацетоном, сушили на воздухе и под вакуумом.

Энергии связывания и атомные концентрации элементов в поверхностных слоях модифицированных стекол по данным ЭСХА

Образец	E_{ca} , эВ	c , %						
	Cl _s		O _{1s}		Si _{2p}		N _{1s}	
Стекло	285.0	29.9	532.7	50.1	103.3	19.1	400.0	0.9
NH ₂ -стекло	285.0	46.6	532.0	34.5	102.5	10.9	400.0	7.9
ПНФА-стекло	285.0	56.2	532.2	29.2	102.6	8.4	400.0	6.2
	285.0	57.6	532.2	28.2	102.6	8.1	400.0	6.1

Примечание. В числителе даны значения, полученные при обработке NH₂-стекла 0.1%-ным раствором ПНФА, в знаменателе – 2%-ным раствором.

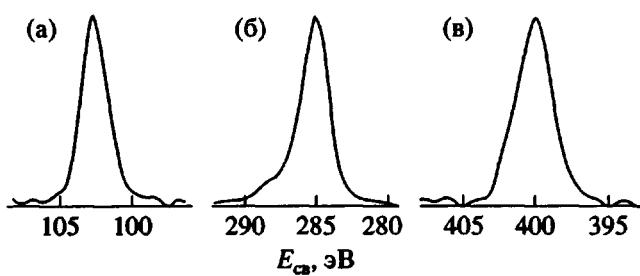


Рис. 1. Линии Si_{2p} (а), C_{1s} (б) и N_{1s} (в) в спектрах ЭСХА ПНФА-стекла, полученного с использованием 2%-ного раствора ПНФА.

Спектры ЭСХА получали на приборе "ISA RIBER ESCA" (Франция) с использованием излучения MgK_α в вакууме порядка 10⁻⁸ Па при мощности источника 300 Вт. Количественный анализ спектров осуществляли с использованием сечений ионизации из работы [8].

Интегральные кривые вдавливания ртути в поры модифицированных носителей получали на ртутном порометре "Pore Sizer 9300" ("Micrometrics", США).

Хроматографию белков на композиционных анионообменниках и коммерческом сорбенте DEAE-Toyopearl 650 M ("TOSOH", Япония) проводили в 0.02 моль/л *tris*-HCl буфере (рН 7.8) в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.3 моль/л с использованием колонок размером 1 × 3.9 см ("MC-PC 1020 Whatman", Великобритания). Объем пробы 0.5 мл, концентрация каждого из белков 1 мг/мл. Оптическую плотность ($\lambda_{\text{max}} = 280$ нм) хроматографических элюатов регистрировали на проточном спектрофотометре "HoloChrom" ("Gilson", Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭСХА, полученные для ПНФА, химически адсорбированного на стеклянных пластинах, содержат линии поглощения при 102.6 эВ (Si_{2p}), 285.0 эВ (C_{1s}), 400.0 эВ (N_{1s}), 532.2 (O_{1s}), (рис. 1). В таблице приведены энергии связыва-

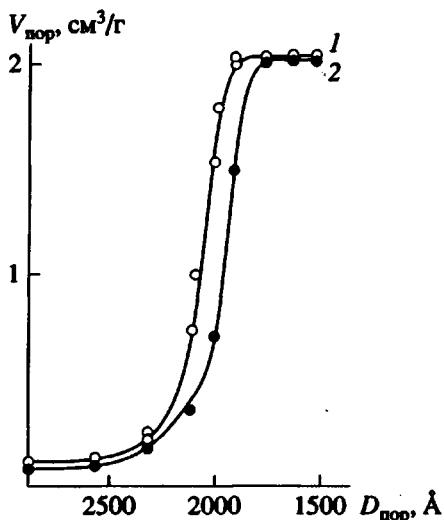


Рис. 2. Интегральные кривые вдавливания ртути в поры МГС-2000 ВГХ (1) и его ПНФА-производного (2).

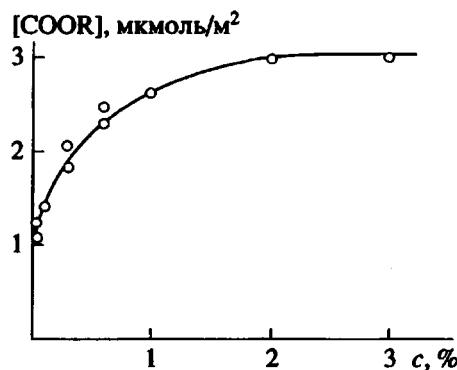


Рис. 3. Изотерма химической адсорбции ПНФА на силикагеле "Моносфера", модифицированном γ -аминопропилтриэтилосиланом.

ния, соответствующие указанным химическим элементам и их атомная концентрация в поверхностных слоях анализируемых образцов.

Из таблицы следует, что атомная концентрация углерода возрастает при переходе от аминопропилсилицированных пластинок (NH_2 -стекло) к пластинкам, обработанным растворами ПНФА (ПНФА-стекло). Кроме того, профиль линии $C1s$ содержит (наряду с основным поглощением при 285 эВ) слабое поглощение при 289 эВ, которое может быть отнесено к углероду карбонильных групп сложных эфиров [9]. И то и другое свидетельствует о необратимом закреплении ПНФА на поверхности NH_2 -стекла. Вместе с тем наряду с адсорбированным полимером в спектры ПНФА-стекол вносит вклад и аминопропилсилицильный подслой. Сохранение, хотя и ослабление

сигналов кремния в спектрах ЭСХА при нанесении хемосорбционного слоя указывает на то, что толщина этого слоя не превышает 50 Å.

Указанный порядок толщины хемосорбционного слоя подтверждают результаты ртутно-порометрических исследований пористых стекол, последовательно модифицированных γ -аминопропилтриэтилосиланом и ПНФА. Интегральные кривые вдавливания ртути в поры носителей, показанные на рис. 2, дают возможность выявить разницу ~80 - 100 Å между диаметрами пор NH_2 -стекла и ПНФА-стекла, что соответствует толщине хемосорбционного слоя в 40 - 50 Å.

Полученные данные интересно сопоставить с плотностью заполнения клубками ПНФА поверхности непористого микросферического силикагеля (диаметр частиц 1.4 мкм). Изотерма химической адсорбции ПНФА на аминопропилсилицильном производном силикагеля приведена на рис. 3. При концентрации контактирующего с носителем раствора ПНФА более 2% достигается насыщение адсорбционного слоя, характеризующегося удельным содержанием *n*-нитрофенильных сложноэфирных групп 3 мкмоль/м², что позволяет оценить толщину хемосорбционного слоя как величину того же порядка, что была указана выше.

Действительно, нами было показано, что при длительном времени контакта (2 сут) растворов ПНФА с аминопропилсилицированными носителями количество сложноэфирных групп в хемосорбционном слое приблизительно равно количеству амидных групп, образовавшихся в результате реакции ацилирования [7]. Несложный расчет дает удельную величину адсорбции полимера, равную 6 мономерным звеньям на 1 нм². Принимая среднюю степень полимеризации ПНФА за 200, находим, что одна макромолекула занимает площадь, равную около 30 нм². При среднем гидродинамическом радиусе макромолекулы ПНФА 80 Å [7] и монослоином распределении адсорбированных клубков можно ожидать величину площади, занятой одним клубком, $\pi r^2/4$, равную 50 нм². Реальное расположение химически фиксированных клубков, следовательно, почти вдвое плотнее расчетного. По-видимому, в процессе химической адсорбции ПНФА происходит частичное наложение и взаимное проникновение полимерных клубков. Это согласуется с данными по кинетике адсорбции ПНФА [7], свидетельствующими о постепенном заполнении поверхности носителя новыми макромолекулами в условиях длительного контакта с раствором полимера.

Суммируя приведенные данные, можно утверждать, что поверхность композиционного носителя покрыта слоем хемосорбированного ПНФА средней толщиной 40 - 50 Å, плотность которого превышает плотность полимерного клубка в растворе. В то же время химически фиксированные макромолекулы могут иметь петли и хво-

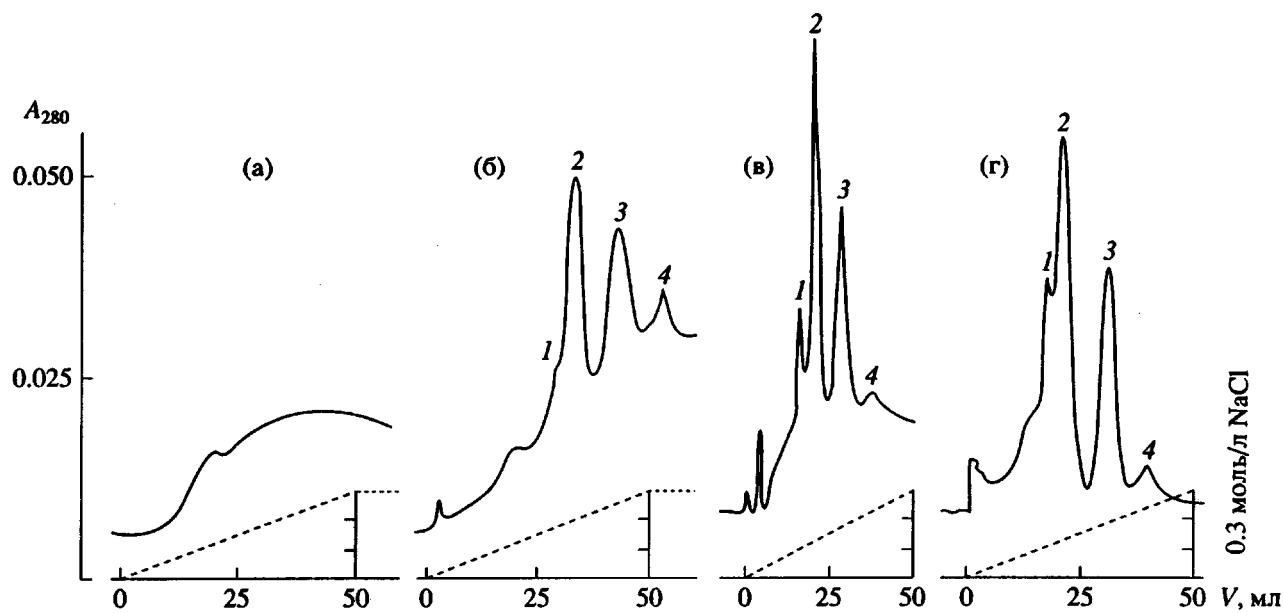


Рис. 4. Хроматограммы разделения овальбумина (1, 2) и бычьего сывороточного альбумина (3, 4) на коммерческом сорбенте DEAE-Toyopearl 650 M (а – холостой градиент хлорида натрия, б – разделение белков) и на композиционных сорбентах ДЭАЭ-XWP-1500 (в) и ДЭАЭ-MPS-2000 (г). Скорость элюции 1.1 (а, б, г) и 1.2 мл/мин (в); полное время градиента 45 (а, б, г) и 42 мин (в).

сты, удобные для прикрепления к ним лигандных или ионогенных функциональных групп.

Хемосорбционные слои ПНФА легко превращаются в слои N-замещенных полиакриламидов в результате полимераналогичного превращения под действием первичных *n*-алкиламинов [10]. В настоящей работе для создания диэтиламиноэтильной фазы в качестве амидирующего реагента был использован 2-аминоэтилдиэтиламин. Конденсация указанного реагента с хемосорбированным ПНФА в сухом ДМФА приводит к практически полному превращению сложноэфирных групп в N-замещенные амидные. Незначительное количество (2 - 3% от исходного) оставшихся сложноэфирных групп может быть амидировано при инкубации с 1 М раствором ацетата аммония (рН 9). Потенциометрическое титрование сорбентов, синтезированных на основе пористого стекла МПС-2000 ВГХ и пористого силикагеля XWP-1500, показывает удельную ионообменную емкость 60 мкмоль/мл для каждого из образцов.

На рис. 4 представлены хроматограммы разделения модельных белков (бычьего сывороточного альбумина и овальбумина), проведенного на колонках с полужестким коммерческим сорбентом DEAE-Toyopearl 650 M (размер частиц 40 - 80 мкм) и вновь синтезированными композиционными сорбентами. Из рисунка следует, что хроматография белков на композиционных сорбентах характеризуется более высокой степенью разрешения и меньшим временем удерживания

разделяемых компонентов. Их элюция достигается в более мягких условиях, при меньшей концентрации солевого буфера. Времена удерживания белков на сорбентах с различной кремнеземной основой практически совпадают, что свидетельствует об определяющей роли полимерного покрытия в механизме ионообменной сорбции белков.

Сходные эффекты были описаны для разделения той же пары белков на композиционных сорбентах с одноточечно привитым поли-N-диэтиламиноэтилакриламидом, полученных путем прививочной сополимеризации мономера с глицидоксипропильными производными силикагелей [2]. В указанной работе повышенная селективность сорбентов объяснена гибкостью макромолекулярных "щупальцеобразных" спиралей, способных к "настройке" на более специфическое комплексообразование с белками по сравнению со сшитыми полимерными матрицами.

На наш взгляд, при интерпретации особенностей связывания белков гибкими цепями привитых полиэлектролитов следует учитывать особенности термодинамики этого процесса. Равновесный характер взаимодействия водорастворимых поликатионов с белками был экспериментально показан в работе [11]. В работе [12] указано, что образование устойчивых поликомплексов с резким падением свободной энергии возможно при относительно слабом межмолекулярном взаимодействии за счет большого числа возможных микросостояний системы. Это позволяет исключить не-

желательные конформационные изменения в белковых глобулах в результате их связывания с сорбентом и, возможно, смягчить оптимальные условия элюции.

Вместе с тем известно, что нейтральные водорастворимые полимеры, такие, например, как полиэтиленоксид, понижают растворимость белков в воде за счет эффектов исключенного объема [13]. Неспецифическое отталкивание сывороточных белков нейтральными гидрофильтральными полимерами, химически присоединенными к поверхности твердых тел, обеспечивает сильное уменьшение адсорбции белков на этих поверхностях и может быть использовано при создании различных биосовместимых материалов [1, 14]. В том случае если химическим модификатором поверхности служит гибкоценной полизелектролит, можно ожидать взаимного наложения и частичной компенсации эффектов электростатического притяжения и неспецифического отталкивания белковых глобул сегментами привитых макромолекул. По всей видимости, на связывание белка гибкий привитой полизелектролит отвечает собственной внутренней деформацией, что маловероятно при связывании того же белка сильно сшитым полизелектролитом. Вследствие этого свободные энергии связывания белков композиционными сорбентами и сорбентами на основе сшитых полимеров различны, как различны и десорбирующие концентрации солевого буфера. Для строгого доказательства различий в механизмах связывания белковых сорбатов необходимо, конечно, исследовать равновесные параметры сорбции и соответствующие им тепловые эффекты.

С практической точки зрения менее жесткое связывание белков в принципе обеспечивает лучшее сохранение их третичной и четвертичной структуры, а следовательно и биологических функций. В то же время повышенная селективность и высокая механическая прочность композиционных сорбентов позволяет использовать их в режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для анализа сложных смесей белков и полипептидов. Примером практического использования композиционных анионообменников, описанных в настоящей работе, может служить ВЭЖХ-анализ рекомбинантного инсулина и проинсулина человека в производственном

процессе выделения, очистки и ферментативной модификации этих белков [15].

В заключение отметим, что химическая адсорбция нейтральных полимеров с реакционноспособными группами в цепях как метод синтеза поверхностных фаз может быть перспективной не только для получения композиционных сорбентов, но и при создании других материалов, предназначенных для работы с водными растворами белков, средами культивирования микроорганизмов и биологическими жидкостями.

Авторы выражают признательность А.М. Рябцеву (МИТХТ им. М.В. Ломоносова) за получение спектров ЭСХА и их математическую обработку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zubov V.P., Ivanov A.E., Saburov V.V. // *Adv. Polym. Sci.* 1992. V. 104. P. 135.
2. Muller W. // *J. Chromatogr.* 1990. V. 510. P. 133.
3. Muller-Schulte D. // *J. Chromatogr.* 1990. V. 510. P. 115.
4. Ivanov A.E., Korchagina E.Yu., Bovin N.V., Zubov V.P. // *Biomed. Chromatogr.* 1992. V. 6. № 1. P. 39.
5. Ivanov A.E., Kozlov L.V., Shojbonov B.B., Antonov V.K., Zubov V.P. // *Biomed. Chromatogr.* 1991. V. 5. № 2. P. 90.
6. Нефедов В.И., Черепин В.Т. Физические методы исследования поверхности твердых тел. М.: Наука, 1983. С. 8.
7. Иванов А.Е., Белов С.В., Зубов В.П. // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 8. С. 1320.
8. Scofield J.H. // *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* 1976. V. 8. P. 129.
9. Нефедов В.И. Рентгено-электронная спектроскопия химических соединений. М.: Химия, 1984. С. 31.
10. Иванов А.Е., Белов С.В., Скловский М.Д., Зубов В.П. // Высокомолек. соед. Б. 1991. Т. 33. № 4. С. 289.
11. Кабанов В.А., Мустафаев М.И. // Высокомолек. соед. А. 1981. Т. 23. № 2. С. 255.
12. Самсонов Г.В. // Высокомолек. соед. А. 1979. Т. 21. № 4. С. 723.
13. Atha D., Ingham K. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 12168.
14. Lee J.H., Koreckova P., Korecek J., Andrade J.D. // *Biomaterials.* 1990. V. 11. P. 455.
15. Ключниченко В.Е., Якимов С.А., Мальцев К.В., Арутюнян А.М., Иванов А.Е., Вульфсон А.Н. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 12. С. 1478.

Structure of the Bonded Polymeric Phases and Features of Protein Separations on the Composite Anion-Exchangers

A. E. Ivanov, S. V. Belov, and V. P. Zubov

*Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Abstract – Layers of poly(*p*-nitrophenyl acrylate), PNPA, chemically adsorbed on porous and non-porous silicas and glasses were characterized by ESCA, mercury porosimetry and by obtaining the adsorption isotherm. The PNPA layers are 40 - 50 Å in thickness whereas their density exceeds by factor of two the density of the polymer coil in contacting solution. By reaction with 2-diethylaminoethylamine the chemically adsorbed PNPA may be transformed into the hydrophilic layers of N-substituted polyacrylamides, which are interesting as the bonded phases of composite anion-exchangers for separation of proteins. Chromatography of ovalbumin and bovine serum albumin on the prepared sorbents allows the higher resolution and milder elution conditions of proteins as compared to the cross-linked polymer DEAE-Toyopearl 650 M. The possible contribution of the excluded volume effect from the flexible ion-exchanging chains into the mechanism of protein binding is discussed.