

УДК 541.64.547.39

ГЕТЕРОСЕТЧАТЫЕ ПОЛИОСНОВАНИЯ
С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ИОНОГЕННЫХ ГРУПП НА ОСНОВЕ
N-ДИМЕТИЛАМИНОПРОПИЛМЕТАКРИЛАМИДА,
N-(2-ГИДРОКСИПРОПИЛ)МЕТАКРИЛАМИДА
И N,N'-ЭТИЛЕНДИМЕТАКРИЛАМИДА¹

© 2000 г. К. П. Папукова, А. А. Демин, Е. С. Никифорова

Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

Поступила в редакцию 28.12.1999 г.
Принята в печать 05.04.2000 г.

Синтезированы гидрофильные сетчатые полиоснования гетерогенной структуры с различным содержанием ионогенных групп путем тройной сополимеризации N-(диметиламинопропил)метакриламида, N-(2-гидроксипропил)метакриламида и N,N'-этилендиметакриламида в водном растворе. Показано, что полученные сетчатые полиоснования обладают значительным набуханием в воде, величина которого не зависит от состава терполимера. Исследовано взаимодействие сетчатых полиоснований с модельными белками (инсулином и овальбумином) и показано, что их емкость по белку падает пропорционально уменьшению содержания звеньев ионогенного мономера. На основании этого сделано заключение, что связывание белков с полученными сетчатыми полиоснованиями идет за счет ион-ионных взаимодействий.

При разделении веществ в хроматографическом процессе идеальными являются условия, когда сорбция каждого из компонентов смеси характеризуется определенной энергией взаимодействия сорбат–сорбент, различной для разных компонентов. В этом случае при десорбции можно добиться тонкого разделения веществ. При разделении белков на полимерных сорбентах, в частности ионообменных, такие условия соблюдаются далеко не всегда. Дело в том, что при связывании белков с полимерной поверхностью возможно образование слоев адсорбированного белка, различных по структуре и энергии межмолекулярных связей [1, 2]. Существование подобных слоев наблюдается при исследовании синергетических явлений в процессах взаимодействия модельных смесей белков с ионообменными сорбентами для препаративной хроматографии [3–7]. Возможность многослойной укладки белков в порах таких сорбентов [3], изменения избирательности сорбции в ходе заполнения гранул сорбента белками [5] может приводить к значительному ухудшению разделения белковых смесей.

Как показано в работе [7], одним из факторов, определяющих наличие синергетических явлений в ходе многокомпонентной сорбции белков, является количество фиксированных ионогенных групп сорбента, приходящихся на одну молекулу белка. В связи с этим целью настоящей работы было создание ионообменных сорбентов, которые характеризуются следующими особенностями: гидрофильностью – для того, чтобы при взаимодействии их с белками реализовывались лишь ион-ионные взаимодействия; варьируемым содержанием ионогенных групп; гетеросетчатой структурой для обеспечения высокой проницаемости по отношению к белковым макромолекулам.

Ранее нами был осуществлен синтез сетчатых полиоснований (СПО) на основе сополимеризации в растворе N-диметиламиноалкил(мет)акриламидов с гексагидро-1,3,5-триакрилоилтриазином. Было показано, что сополимеризация в воде и в водном ДМФА (50%) протекает в гетерофазных условиях с образованием гетеросетчатых полиоснований [8, 9]. Особенность трехмерной сополимеризации гидрофильных мономеров в воде или в водных органических растворителях состоит в том, что выделение сополимера в новую фазу происходит в высокогидратированном состоянии

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 98-03-32435).

[10]. Благодаря этому, структура таких СПО характеризуется сочетанием плотно спищих участков, включающих микроглобулы, с разреженными участками, исчезающими в процессе высушивания. В отличие от этого макропористые СПО содержат каналы и поры, сохраняющие свою структуру при удалении растворителя [11]. СПО в набухшем состоянии содержат значительную массу растворителя, что обеспечивает высокую проницаемость для макромолекул биологически активных веществ [12].

В настоящей работе ставится и решается задача получения аналогичных по структуре СПО с различным содержанием ионогенных групп. Для выяснения условий синтеза структурно устойчивых гидрофильных СПО были исследованы условия сополимеризации N-диметиламинопропилметакриламида (ДМАМ) с N,N'-этилендиметакриламидом (ЭДМА) в воде. Было показано, что при концентрации смеси мономеров в растворе 20%, сополимеризация ДМАМ с ЭДМА протекает в гетерофазных условиях с образованием высоко-набухающих структурно устойчивых СПО АДЭ (А – анионит, Д – диметиламинопропилметакриламид, Э – этилендиметакриламид). Величина относительного набухания $K_{\text{отн}}$, характеризующая структурную устойчивость СПО АДЭ, практически не меняется от содержания ЭДМА в СПО и близка к единице (рис. 1). $K_{\text{отн}}$ – отношение коэффициента набухания $K_{\text{наб}}$ HCl-формы СПО к $K_{\text{наб}}$ OH-формы. Как видно из рисунка, коэффициент набухания СПО АДЭ незначительно растет при увеличении содержания кросс-агента, что характерно для гетеросетчатых структур полиэлектролитов [11].

Учитывая это, синтез гидрофильных СПО аналогичной структуры с различным содержанием ионогенных групп ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) проводили путем тройной сополимеризации гидрофильного неионогенного мономера амидной природы и ДМАМ с ЭДМА. В качестве гидрофильного неионогенного

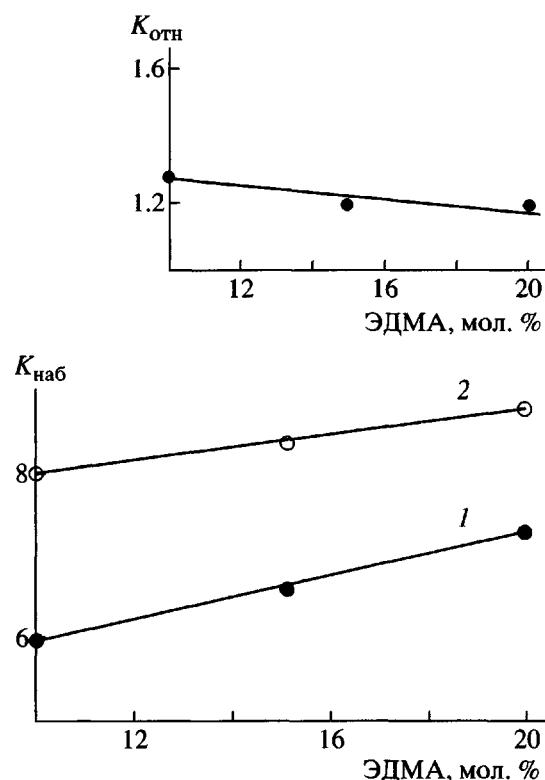


Рис. 1. Зависимость коэффициента набухания $K_{\text{наб}}$ и $K_{\text{отн}}$ СПО от содержания ЭДМА для OH-формы (1) и HCl-формы (2).

мономера использовали N-(2-гидроксипропил)метакриламид (ГПМА), приближающийся по реакционной способности к ДМАМ и ЭДМА.

Сополимеризацию ДМАМ и ГПМА проводили в воде при концентрации смеси мономеров 20%. Обменную емкость СПО по иону хлора варьировали изменением соотношения ДМАМ и ГПМА. Содержание кросс-агента при этом не изменялось и составляло 10 мол. %. Характеристики синтезированных СПО приведены в таблице. Как видно из рис. 2 и таблицы, наблюдается пря-

Характеристики СПО, синтезированных при различном соотношении ДМАМ : ГПМА

СПО*	Мольное соотношение ДМАМ : ГПМА	Обменная емкость по Cl^- , мг-экв/г		$pK_{\text{хар}}$	$K_{\text{отн}}$
		вычислено	найдено		
АДЭ-10	1 : 0	5.22	5.11	9.0	1.3
АДГЭ-10-1	1 : 1	2.81	2.80	8.9	1.2
АДГЭ-10-4	1 : 4	1.20	1.22	8.7	1.2
АДГЭ-10-10	1 : 10	0.55	0.47	8.5	1.0
АДГЭ-10-20	1 : 20	0.29	0.29	–	1.0

* В обозначении СПО первое число означает количество ЭДМА (мол. %), второе – количество молей ГПМА на 1 моль ДМАМ.

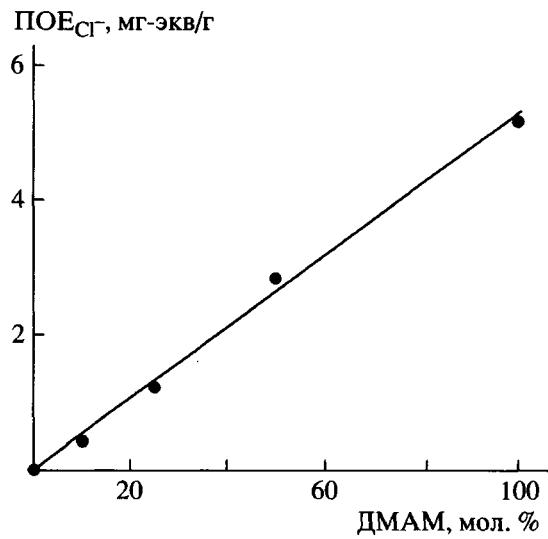


Рис. 2. Зависимость полной обменной емкости (ПОЕ) СПО АДГЭ по иону хлора от содержания ДМАМ в сополимере.

мая зависимость обменной емкости СПО по Cl⁻ от содержания ДМАМ.

Обменные емкости, рассчитанные по составу сомономеров и определенные по кривым потенциометрического титрования, близки; это свидетельствует о том, что состав сополимера соответствует составу исходной мономерной смеси.

На кривых потенциометрического титрования СПО (рис. 3) имеется характерный скачок, соответствующий кривым титрования аминов алифатического ряда. По данным потенциометрического титрования, представленных в координатах Гендерсона-Гассельбаха, определены значения кажущихся констант ионизации pK_{хар} (рис. 4) в зависимости от состава СПО. С уменьшением емкости СПО кажущаяся константа ионизации падает с 9.0 до 8.5. Степень набухания СПО незначительно зависит от соотношения ДМАМ и ГМПА. Коэффициент набухания OH⁻-формы СПО при увеличении содержания ДМАМ с 25 до 100% увеличивается с 5.2 до 5.8. При переходе OH⁻-формы СПО в HCl-форму наблюдается такая же зависимость коэффициента набухания (рис. 5).

Структурную устойчивость СПО также оценивали по величине относительного коэффициента набухания K_{отн}. Как видно из таблицы, K_{отн} с уменьшением содержания ДМАМ практически не изменяется и приближается к единице, что свидетельствует о стабильности структуры СПО в процессе ионизации.

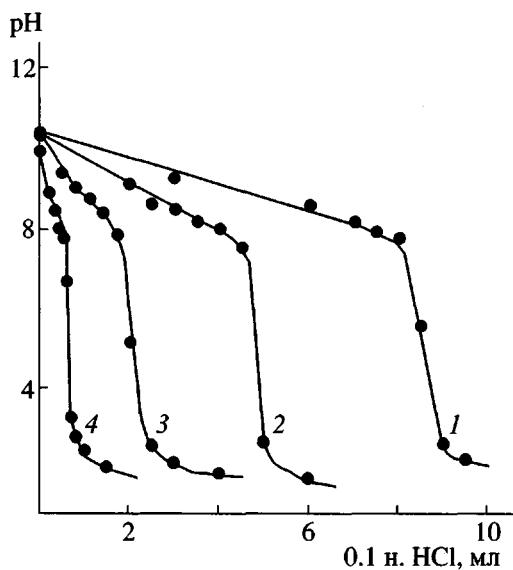


Рис. 3. Кривые потенциометрического титрования СПО с содержанием ДМАМ 100 (1), 50 (2), 25 (3) и 10 мол. % (4).

Таким образом, сополимеризация ДМАМ и ГПМА с ЭДМА в 20%-ном водном растворе приводит к образованию структурно устойчивых СПО, обладающих значительным набуханием независимо от состава терполимера.

Изучение взаимодействия СПО с модельными белками (инсулином и овальбумином) показало, что емкость сорбентов по белку падает пропорционально уменьшению содержания ионогенного мономера (рис. 6). Поскольку структура сорбентов не зависит от соотношения мономеров, очевидно, что связывание белков с сорбентами данного типа идет за счет ион-ионных взаимодействий.

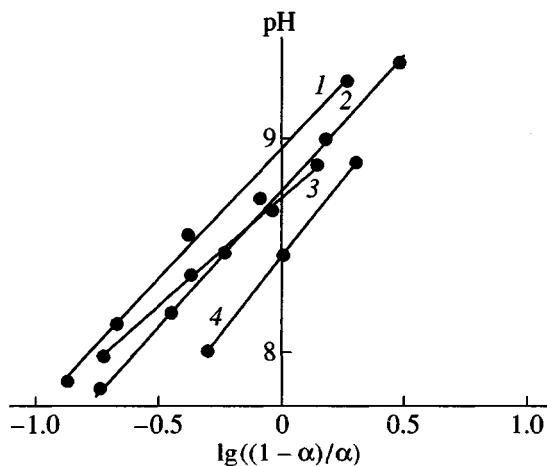


Рис. 4. Потенциометрическое титрование СПО в координатах Гендерсона-Гассельбаха.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

N-(2-гидроксипропил)метакриламид синтезировали ацилированием 1-аминопропанола-2 хлорангидридом метакриловой кислоты по видоизмененной методике [13]. В колбу, снабженную мешалкой, термометром и капельной воронкой, загружали 111 г (1.5 моля) 1-аминопропанола-2 и 300 мл ацетонитрила. Образовавшийся раствор охлаждали до -15°C и постепенно при энергичном перемешивании добавляли 78 г (0.75 моль) хлорангидрида в 325 мл ацетонитрила так, чтобы температура реакционной смеси не поднималась выше -10°C . После прикапывания хлорангидрида метакриловой кислоты температуре реакционной смеси доводили до 20°C и выдерживали при этой температуре в течение 15 мин. Выпавшие кристаллы 1-аминопропанол-2 гидрохлорида отделяли фильтрованием, фильтрат охлаждали до -40°C и выпавшие кристаллы переосаждали из смеси метанол–диэтиловый эфир (3 : 1) и кристаллизовали из ацетона (растворением при 25°C с последующим охлаждением до -25°C). Выход 61 г (60%), $T_{\text{пл}} = 67^{\circ}\text{C}$.

N-Диметиламинопропилметакриламид синтезировали аналогично N-диметиламиноэтилметакриламиду [14]. N,N'-Этилендиметакриламид получали методом конденсации на поверхности раздела фаз этилендиамина и хлорангидрида метакриловой кислоты [15]. Выход 54%, $T_{\text{пл}} = 114\text{--}115^{\circ}\text{C}$.

Сополимеризацию ДМАМ и ГПМА с ЭДМА проводили в водном растворе при удельной доле мономеров 0.2 под действием ДАК при 60°C до образования геля – блока молочного цвета с последующим прогреванием его при 80°C в течение 45 мин. После охлаждения блок СПО измельчали и последовательно обрабатывали 1.0 н. раствором HCl, деминерализованной водой, 0.5 н. раствором NaOH, отмывали водой до pH 6–7.

Потенциометрическое титрование СПО осуществляли 0.1 н. HCl в 0.1 н. KCl методом отдельных навесок. Фракция СПО для титрования и определения сорбционных характеристик составляла 100–200 мкм в сухом состоянии.

Равновесные процессы сорбции изучали в статических условиях при 22°C и pH 8.0. При таком pH связывание инсулина и овальбумина с СПО максимально. В стеклянные флаконы заливали по 10 мл белкового раствора с различными концентрациями, затем во флаконы добавляли навески сорбента. Экспериментально установлено, что через 48 ч после начала эксперимента не наблюдается изменений концентрации белка в растворе. После перемешивания в течение этого

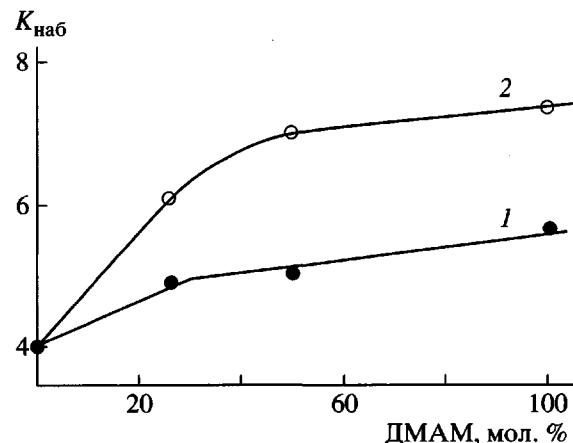


Рис. 5. Зависимость коэффициента набухания СПО АДГЭ от содержания DMAA в сополимере для OH-формы (1) и HCl-формы (2).

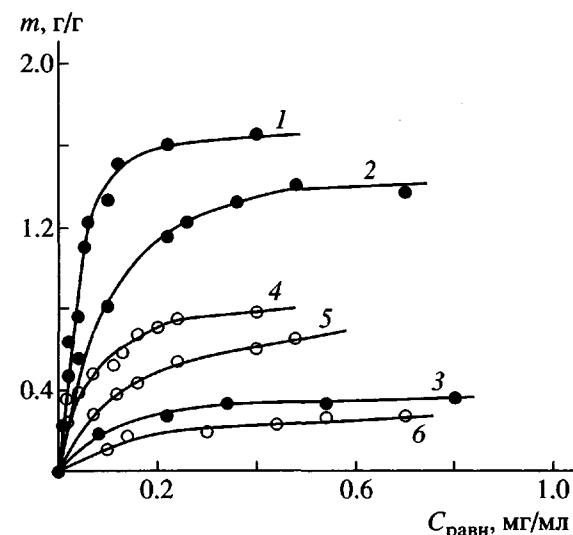


Рис. 6. Изотермы сорбции инсулина (1–3) и овальбумина (4–6) на СПО: 1, 4 – АДЭ-10, 2, 5 – АДГЭ-10-1, 3, 6 – АДГЭ-10-4.

времени определяли равновесную концентрацию белка в растворе по оптической плотности при длине волны 278 нм и рассчитывали концентрацию белка в сорбенте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зимина Л.А., Иорданский А.Л., Полищук А.Я., Григорян Г.Л., Мусеев Ю.В., Заиков Г.Е. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 9. С. 2143.
- Иорданский А.Л., Уланов Б.П., Зимина Л.А., Заиков Г.Е. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 249. С. 480.
- Демин А.А., Дынкина И.М. // Журн. физ. химии. 1995. Т. 69. № 4. С. 718.

4. Демин А.А., Могилевская А.Д., Самсонов Г.В. // Журн. физ. химии. 1996. Т. 70. № 11. С. 2059.
5. Демин А.А., Могилевская А.Д., Самсонов Г.В. // Журн. прикл. химии. 1996. Т. 69. С. 31.
6. Demin A.A., Mogilevskaya A.D., Samsonov G.V. // J. Chromatogr. 1997. V. 760. P. 105.
7. Демин А.А., Папукова К.П., Никифорова Е.С., Самсонов Г.В. // Журн. физ. химии. 2000. Т. 74. № 4. С. 693.
8. Папукова К.П., Демин А.А., Самсонов Г.В. // Высокомолек. соед. А. 1995. Т. 37. № 10. С. 1644.
9. Демин А.А., Соловьев А.А., Никифорова Е.С., Папукова К.П., Самсонов Г.В. // Журн. прикл. химии. 1996. Т. 69. № 5. С. 759.
10. Кузнецова Н.Н., Папукова К.П., Муравьева Т.Д., Билибина Г.В. // Высокомолек. соед. А. 1978. Т. 20. № 12. С. 1957.
11. Гаврилова Н.Н., Пирогов В.С., Морозова А.Д. // Журн. прикл. химии. 1981. Т. 54. № 5. С. 1190.
12. Samsonov G.V., Kuznetsova N.P. // Adv. Polym. Sci. 1992. V. 104. P. 1.
13. Strohalm J., Kopecek J. // Angew. Makromol. Chem. 1978. B. 70. S. 109.
14. Коломейцев О.П., Кузнецова Н.Н. // Высокомолек. соед. А. 1971. Т. 13. № 8. С. 1899.
15. Шур А.А., Рехтер М.А., Ищенко Р.Н. // Изв. АН МССР. Сер. биол. и хим. наук. 1968. № 6. С. 56.

Heteroreticular Polybases with the Varying Content of Ionogenic Groups Derived from N-(Dimethylaminopropyl)methacrylamide, N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide, and N,N'-Ethylenedimethacrylamide

K. P. Papukova, A. A. Demin, and E. S. Nikiforova

*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

Abstract—Hydrophilic reticular polybases with a heterogeneous structure and differing in content of ionogenic groups were prepared by the tertiary copolymerization of N-(dimethylaminopropyl)methacrylamide, N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, and N,N'-ethylenedimethacrylamide in an aqueous solution. It was shown that the resulting reticular polybases possess a pronounced ability to swell in water and their degree of swelling is independent of the terpolymer composition. The interaction of the reticular polybases with the model albumins (insulin and ovalbumin) was studied, and it was demonstrated that their capacity for albumin drops in a direct proportion to a reduction in the content of the ionogenic monomer. Based on this evidence, it is concluded that the binding of albumins with the synthesized reticular polybases proceeds via ion–ion interactions.