

УДК 541.64:547(781+391.1)

СОПОЛИМЕРЫ 1-ВИНИЛИМИДАЗОЛА И АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ БИОСЕПАРАЦИИ¹

© 2004 г. Е. Н. Даниловцева, В. В. Анненков, А. И. Михалева, Б. А. Трофимов

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского
Сибирского отделения Российской академии наук
664033 Иркутск, ул. Фаворского, 1

Поступила в редакцию 10.06.2003 г.
Принята в печать 01.10.2003 г.

Радикальной сополимеризацией 1-венилимидазола с натриевой солью акриловой кислоты получены новые полимерные амфоролиты, константы сополимеризации мономеров составляют 0.54 ± 0.06 и 1.3 ± 0.3 соответственно. Положение изоэлектрической точки полиамфоролов плавно возрастает в интервале pH 3–7 при увеличении содержания 1-венилимидазола в сополимере. Синтезированные сополимеры способны взаимодействовать с бычьим сывороточным альбумином и лизоцимом с образованием как растворимых, так и нерастворимых комплексов. Использование смешанного сополимера позволяет эффективно разделять модельную белковую смесь.

Исследование взаимодействия синтетических полимеров с макромолекулами биологического происхождения актуально при создании систем для иммобилизации ферментов и олигонуклеотидов, разделения и очистки биополимеров, при разработке новых физиологически активных препаратов. Особое значение среди водорастворимых и водонабухающих полимеров имеют полиамфороловы, способные к полимер-полимерным взаимодействиям как с полианионами, так и с поликатионами в зависимости от pH [1–3]. Значительное влияние на свойства полиамфоролов оказывает природа и соотношение кислотных и основных групп, которые определяют положение изоэлектрической точки. Большинство известных синтетических полиамфоролов содержит кислотные карбоксильные и основные аминогруппы. При этом зависимость pH изоэлектрической точки от состава сополимера имеет вид кривой с резким перегибом в области pH 4–8 [4, 5], т.е. используя данные функциональные группы, крайне трудно плавно регулировать положение изоэлектрической точки в области нейтральных pH.

Цель настоящей работы – синтез сополимеров 1-венилимидазола (ВИ) и акриловой кислоты (АК). Меньшая основность имидазольных звеньев ($pK_{BH^+} 5–6$ [6]) по сравнению с аминогруппами делает их перспективными для получения полиамфоролов с изоэлектрическими точками, близкими к нейтральной области. Изучение комплексообразования полиамфоролов ВИ–АК с белками (бычий сывороточный альбумин, лизоцим) позволило продемонстрировать эффективность сополимеров в разделении белковых макромолекул.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

ВИ и АК очищали вакуумной перегонкой. Натриевую соль АК (Na-АК) получали смешением 10%-ного этанольного раствора АК с эквимольным количеством NaOH. Выпавший осадок Na-АК отделяли фильтрованием, промывали этианолом и сушили в вакууме. В работе использовали лизоцим и бычий сывороточный альбумин (БСА), полученные от фирмы “Sigma”.

Сополимеры ВИ и Na-АК синтезировали радикальной сополимеризацией в 10%-ном водном растворе под действием ДАК (1% от массы мономеров) в ампулах в атмосфере аргона при 60°C. Сополимеры очищали диализом через целлофановую мембрану относительно воды, получен-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта НШ = 2241. 2003.3), Отделение химии и наук о материалах РАН (проект 4.4.1.) и фонда INTAS (грант 00-113).

E-mail: annenkov@home.isu.ru (Анненков Вадим Владимирович).

ный раствор сушили лиофильно. При диализе происходит частичный гидролиз звеньев Na-AK, что приводит к появлению звеньев АК в сополимере, поэтому их состав определяли на основе данных элементного анализа (азот) и потенциометрического титрования. Данные спектроскопии ЯМР ^1H (δ , м. д.: 1.0–2.5 – CH_2 ; 6.5–8.3 – имидазол, 3Н) подтверждают соотношение имидазольных и акрилатных звеньев. Константы сополимеризации мономеров вычисляли по методике [7], используя линейный интегральный метод [8], модифицированный в соответствии с работой [9].

Сшитый сополимер ВИ–АК получали сополимеризацией ВИ с трибутиламониевой солью АК при соотношении мономеров 1 : 1 в 1,2-диметоксиэтане (30% от массы мономеров). В качестве сшивателя использовали дивиниловый эфир диэтиленгликоля (1.2 мас. %), инициатор ДАК (2 мас. %). Реакцию проводили в ампуле в атмосфере аргона при 60°C в течение 8 ч. Полученный сополимер помещали в воду, после его набухания добавляли 5%-ный HCl до pH 3 и промывали водой до нейтральной реакции. Далее сополимер переводили в натриевую форму с помощью 0.1 M NaOH (pH 10.5); после набухания геля до равновесного состояния его отмывали свежими порциями воды от примесей щелочи и растворимых полимерных фракций. Полноту промывки контролировали по измерению pH и отсутствию мутности промывных вод при pH 4 с добавлением полиакриловой кислоты или поли-1-винилимидазола. Очищенный гель промывали ацетоном и сушили в вакууме до постоянной массы. Выход сшитого полимера 23%, содержание ВИ 37.5 мол. %. Степень набухания полiamфолита определяли гравиметрически.

Потенциометрические измерения проводили на ионометре “Мультитест”, используя комбинированный стеклянный электрод в терmostатируемой ячейке при $20 \pm 0.02^\circ\text{C}$ в 0.1 M NaCl в атмосфере аргона. В случае титрования растворов сополимеров их pH доводили до 11.5 используя 0.1 M NaOH; в качестве титранта использовали 0.1 M HCl, концентрация сополимеров составляла 0.010–0.012 моль/л в расчете на все ионизуемые группы. При потенциометрическом исследовании взаимодействия полiamфолитов с белками концентрации сополимеров и белков составляли

1.2 г/л, pH изменяли от 2.5 до 9.5 в случае БСА и от 2.5 до 11.5 для лизоцима.

Вязкость растворов полiamфолитов измеряли с помощью вискозиметра Уббелоде при $20 \pm 0.02^\circ\text{C}$, характеристическую вязкость определяли в 0.1 M NaOH с добавлением 1 моль/л KBr. Спектры ЯМР ^1H получали на спектрометре DPX-400 фирмы “Bruker” (рабочая частота 400.13 МГц) в D_2O , используя 4,4-диметилсиапентансульфонат натрия в качестве стандарта. ИК-спектры снимали в таблетках с KBr на спектрометре “Bruker IFS25”, УФ-спектры – на спектрофотографе “Specord UV-VIS” в кварцевых кюветах толщиной 2 и 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сополимеризация ВИ с АК приводит к сополимерам, загрязненным мономером ВИ, связанным со звеньями АК солевыми связями. Кроме того, данная реакция может осложниться отклонениями от классического механизма из-за координации молекул мономеров с полимерной цепью, что снижает эффективную концентрацию мономеров, а также может стимулировать побочные реакции, например матричную полимеризацию [10]. В этой связи сополимеры ВИ–АК синтезировали используя натриевую соль АК. Получены водорастворимые продукты белого цвета, содержащие, по данным ИК-спектроскопии, звенья ВИ (1500, 1406, 1286 и 1228 cm^{-1} – валентные колебания азольного цикла; 1110 и 1082 cm^{-1} – полосы азольных C–H; 917, 827 и 744 cm^{-1} – деформационные колебания гетероцикла) и АК (1710 и 1582 cm^{-1} – валентные колебания C=O в $\sim\text{COOH}$ и $\sim\text{COO}^-$ соответственно). Полосы поглощения винильной группы (1650, 1008, 961 cm^{-1}) в ИК-спектрах сополимеров отсутствуют.

Сополимеры ВИ–Na-AK обеднены звеньями ВИ по сравнению с исходной мономерной смесью (табл. 1). Выход сополимеров уменьшается, а вязкость возрастает при увеличении содержания Na-AK в исходной смеси. Константы сополимеризации ВИ и Na-AK составляют 0.54 ± 0.06 и 1.3 ± 0.3 соответственно.

Потенциометрическое титрование большинства полiamфолитов ВИ–Na-AK сопровождается опалесценцией и мутностью раствора при определенных pH (табл. 1). Учитывая известный состав

Таблица 1. Сополимеризация ВИ с Na-AK

Сополи- мер, №	ВИ в исходной смеси, мол. %	Время, ч	Выход, %	Состав сополимера, мол. %			[η], дл/г	рI (0.1 M NaCl)	Интервал мутности, рН
				ВИ	Na-AK	АК			
1	80.8	15	47	77.3	11.0	11.7	0.52	6.7	Отсутствует
2	71.0	15	45	53.5	37.7	8.8	1.30	5.0	5.1–5.9
3	51.7	8	24	41.6	45.3	13.1	2.28	4.8	3.4–5.5
4	31.5	8	16	20.1	65.0	14.9	3.40	3.2	1.9–4.8
5	21.9	8	6.4	17.5	66.1	16.4	6.16	3.0	1.9–4.11

сополимеров, значения рН в изоэлектрической точке (рI) определяли используя данные потенциометрического титрования следующим образом.

Полиамфолит можно представить в виде полимерной кислоты с кислотными группами двух типов: НА – карбоксильные и НВ – протонированные имидазольные звенья. Титрование происходит из щелочной области (рН 11.5) и точка, соответствующая полной нейтрализации всех кислотных групп, определяется по перегибу на кривой титрования. В кислой области, отвечающей протонированию всех звеньев, перегиб не наблюдался, и соответствующую точку V_0 получали исходя из массы и состава сополимера. Степень ионизации сополимера α , рассматриваемого в качестве кислоты, вычисляли используя известную формулу для поликислот [11]

$$\alpha = ([\text{NaOH}] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) / c_0$$

Здесь [NaOH] соответствует концентрации добавленной щелочи относительно точки V_0 , c_0 – общая концентрация ионизуемых звеньев.

В случае полиамфолитов значения α отражают только общую степень ионизации кислотных звеньев и сопряженной кислоты основных звеньев. Более важной является величина среднего заряда полимерных цепей q (в расчете на одно ионизуемое звено). Очевидно,

$$q = hb - a$$

$$\alpha = b + a,$$

где a , hb и b – мольные доли кислотных анионов, протонированных и непротонированных основных звеньев соответственно. Суммируя эти уравнения, получаем $\alpha + q = b + hb$. Учитывая, что $b + hb$ соответствует мольной доле основных звеньев в

сополимере, имеем $q = (\text{мольная доля ВИ}) - \alpha$. Таким образом, из потенциометрических данных можно получить зависимость q от рН и определить значение рI в точке $q = 0$. Как следует из табл. 1, изоэлектрические точки исследуемых полиамфолитов смещаются в область низких рН при уменьшении содержания ВИ. В случае полностью растворимого сополимера 1 величина рI, по данным вискозиметрии, составляет 6.5, что достаточно близко к результатам потенциометрии. Следует отметить, что в отличие от полиамфолитов с аминогруппами [4, 5] рI сополимеров ВИ–АК равномерно изменяется от 3 до 7, позволяя плавно регулировать положение изоэлектрических точек в этом интервале.

Для изучения взаимодействия синтезированных полиамфолитов с белковыми макромолекулами в качестве объектов использовали БСА и лизоцим, рI которых составляют 4.7 и 11.0 соответственно [12]. При смешении растворов белков и полиамфолитов наблюдалось образование осадка при определенных рН (табл. 2). Области

Таблица 2. Области гетерогенности растворов комплексов сополимеров ВИ–АК с БСА (числитель) и лизоцимом (знаменатель)

Сополи- мер, №	ВИ в сополи- мере, мол. %	рI	Интервал гетерогенности, рН*
1	77.3	6.7	Отсутствует/6.5–10.1
3	41.6	4.8	4–5.3/3.8–9.9
4	20.1	3.2	3–5.7/2.5–9.7

* БСА не выпадает в осадок в изученном интервале рН (2.5–9.5), лизоцим нерастворим при рН 10.5–11.1. рI 4.7 (БСА) и 11.0 (лизоцим).

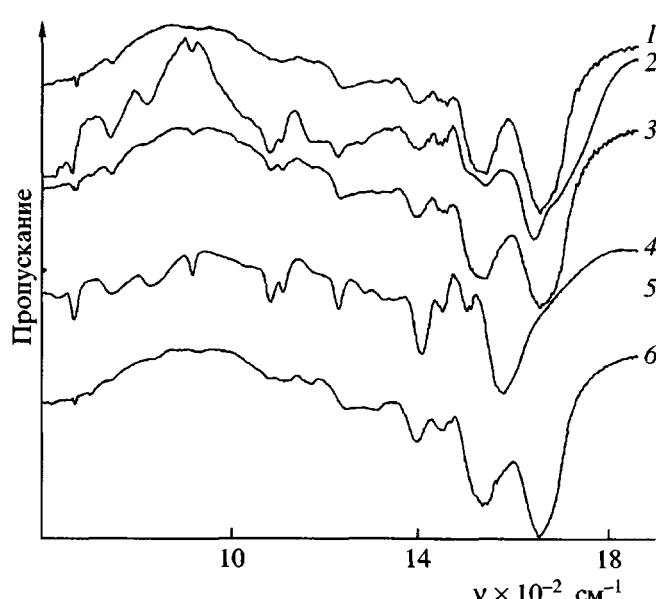


Рис. 1. ИК-спектры лизоцима (1), комплексов лизоцима с сополимером 3 при pH 5.7 (2) и 9.5 (3), сополимера 3 (4), комплекса БСА с сополимером 3 (5) при pH 5.0, а также БСА (6).

гетерогенности смесей с БСА и чистых полиамфолитов близки, как и величины их рI. Данные ИК-спектроскопии (рис. 1) свидетельствуют о том, что образующие осадки содержат как синтетический полимер, так и белок. В спектре сохраняются основные полосы поглощения имидазольных звеньев (1110, 1080, 827 и 744 см⁻¹) и полоса поглощения валентных колебаний C=O в амидных связях БСА (1660 см⁻¹). Результаты, полученные для лизоцима (рис. 1, спектры 2 и 3), указывают на понижение содержания белка в комплексе при уменьшении pH. Очевидно, в области между изоэлектрическими точками полиамфолита и лизоцима взаимодействие между ними осуществляется преимущественно за счет отрицательно заряженных карбоксилатных анионов сополимеров и положительно заряженных групп белка. Понижение pH уменьшает общий отрицательный заряд на макромолекулах полиамфолита, что приводит к увеличению его содержания в комплексе.

На основании полученных данных можно предположить следующую схему разделения модельной смеси БСА и лизоцима: осаждение лизоцима в виде комплекса с полиамфолитом ВИ-АК при высоких значениях pH, отделение осадка,

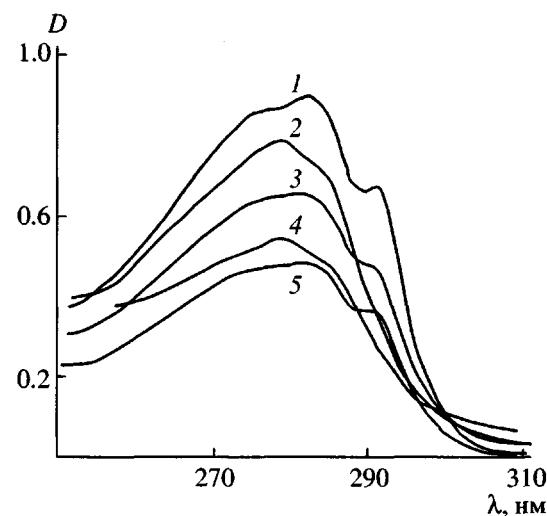


Рис. 2. УФ-спектры растворов: 1 – лизоцим (0.333 мг/мл), 2 – БСА (1 мг/мл), 3 – смесь лизоцим–БСА (по 1 мг/мл), 4 – то же после обработки сшитым сополимером ВИ–АК (3 мл раствора и 1 мг сополимера, набухшего в 0.35 мл воды), 5 – раствор после обработки сшитого сополимера ВИ–АК 3 мл цитратно-фосфатного буфера с pH 4. Толщина поглощающего слоя 1 см (1, 2, 4) и 0.2 см (3, 5).



Рис. 3. Зависимость степени набухания от pH для сшитого сополимера ВИ–АК.

разрушение комплекса при pH, близком к рI сополимера с переходом лизоцима в раствор. Для контроля за содержанием белков в растворе использовали УФ-спектроскопию (рис. 2); для БСА характерен максимум поглощения при 279 нм ($\epsilon = 0.73$ см²/мг), для лизоцима – при 281 нм ($\epsilon = 2.66$ см²/мг) и плечо при 291 нм ($\epsilon = 2.02$ см²/мг), что позволяет количественно определять данные белки при их совместном присутствии, поскольку

Таблица 3. Извлечение лизоцима из водных растворов сополимерами ВИ-АК

Лизоцим : сополимер	pH	Степень извлечения, %
Сополимер 4		
1 : 1	10	82.0
1 : 1	9	81.3
1 : 1	8	77.6
1 : 1	7	75.1
1.3 : 1	8	76.2
2 : 1	8	78.6
4 : 1	8	75.4
10 : 1	8	66.9
Сополимер 3		
1 : 1	8	58.1
2 : 1	8	62.1
4 : 1	8	75.9
10 : 1	8	73.3
20 : 1	8	59.7
Сшитый сополимер ВИ-АК		
3 : 1	8	100

раствор БСА слабо поглощает при 291 нм ($\varepsilon = 0.35 \text{ см}^2/\text{мг}$).

Исследование зависимости степени извлечения лизоцима из раствора в виде комплекса с сополимером ВИ-АК (табл. 3) показало, что понижение pH увеличивает остаточное содержание белка в растворе, а наибольшая эффективность извлечения наблюдается при 2–4-кратном избытке лизоцима. Повышение количества полимера в смеси приводит к растворам с высокой вязкостью и небольшим количеством трудно отделяемого осадка, очевидно, вследствие образования растворимых комплексов лизоцима с полиамфолитом. В целом, использование сополимеров ВИ-АК не позволяет полностью извлекать лизоцим из раствора.

В этой связи представлялось целесообразным использовать редкосшитый сополимер ВИ-АК, также обладающий полиамфолитными свойствами, что подтверждается характерной зависимостью степени набухания от pH (рис. 3). Действительно, его применение позволяет полностью из-

влекать лизоцим из раствора при pH 8 (табл. 3). Введение геля сшитого сополимера ВИ-АК в смесь БСА с лизоцимом приводит (рис. 2, кривые 3 и 4) к практически полному удалению лизоцима из раствора с сохранением в нем БСА. При обработке комплекса сшитого полиамфолита с лизоцимом буферным раствором с pH 4 происходит коллапс геля и не менее 90% лизоцима выделяется в раствор (рис. 2, кривая 5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudaibergenov S. Polyampholytes: Synthesis, Characterization and Application. Hardbound: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.
2. Patrickios C.S., Jang C.J., Hertler W.R., Hatton T.A. // Macro-ion Characterization. From Dilute Solutions to Complex Fluids / Ed. by Schmitz Kenneth S. Washington: Am. Chem. Soc., 1994. P. 257.
3. Candau F., Joanny J. E. // Polymer Materials Encyclopedia / Ed. by Salamone J.P. Boca Raton: CRC, 1996. P. 5476.
4. Davies D.H., Smith J.D. B., Phillips D.C. // Macromolecules. 1973. V. 6. № 1. P. 163.
5. Patrickios C.S., Hertler W.R., Abbott N.L., Hatton T.A. // Macromolecules. 1994. V. 27. № 4. P. 930.
6. Мазяр Н.Л., Анненков В.В., Круглова В.А., Ананьев С.М., Даниловцева Е.Н., Рохин А.В., Зинченко С.В. // Изв. РАН. Сер. хим. 2000. № 12. С. 2047.
7. Анненков В.В., Лебедева О.В., Даниловцева Е.Н., Михалева А.И. // Высокомолек. соед. Б. 2001. Т. 43. № 9. С. 1560.
8. Kuo J.F., Chen C.J. // J. Appl. Polym. Sci. 1981. V. 26. № 4. P. 1117.
9. Езриелев А.Н., Брохина Э.Л., Роскин Е.С. // Высокомолек. соед. А. 1969. Т. 11. № 8. С. 1670.
10. Van de Grampel H.T., Tan Y.Y., Challa G. // Macromolecules. 1991. V. 24. № 13. P. 3773.
11. Strauss U.P., Barbieri B.W., Wong G.J. // Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 2840.
12. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976.

Copolymers of 1-Vinylimidazole and Acrylic Acid for Bioseparation**E. N. Danilovtseva, V. V. Annenkov, A. I. Mikhaleva, and B. A. Trofimov***Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia*

Abstract—The free-radical copolymerization of 1-vinylimidazole and sodium salt of acrylic acid yielded new polyampholytes; the reactivity ratios of comonomers were estimated to be 0.54 ± 0.06 and 1.3 ± 0.3 , respectively. The position of the isoelectric point of polyampholytes gradually increased in the pH range from 3 to 7 with an increasing content of 1-vinylimidazole in the copolymer. It was shown that the as-synthesized copolymers can interact with bovine serum albumin and lysozyme to afford both soluble and insoluble complexes. The use of the crosslinked copolymer makes it possible to efficiently separate the model protein mixture.