

УДК 541(64+13)

ГИДРОФИЛЬНЫЕ ГЕТЕРОСЕТЧАТЫЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТЫ С ВАРЬИРУЕМЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП¹

© 2004 г. К. П. Папукова, Е. С. Никифорова, А. А. Демин,
А. Т. Меленевский, Е. Б. Чижова

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

Поступила в редакцию 09.12.2003 г.

Принята в печать 19.04.2004 г.

и ионогенного мономера (метакрилата

оногенного мономера (метакрилата натрия).

етакриламида и N,N'-этилен

Путем тройной сополимеризации ионогенного мономера (метакриловой кислоты или метакрилоилаланина), N-(2-гидроксипропил)метакриламида и N,N'-этилендиметакриламида в водном растворе уксусной кислоты получены гидрофильные сетчатые сорбенты гетерогенной структуры с различным содержанием ионогенных групп. Исследовано их взаимодействие с модельными белками (лизоцимом и рибонуклеазой). Сорбенты на основе метакрилоилаланина при уменьшении содержания ионогенных звеньев обеспечивают переход от синергетического механизма сорбции белка к конкурентному.

ВВЕДЕНИЕ

Работы по многокомпонентной сорбции и хроматографии базируются на представлениях о взаимовлиянии компонентов раствора при взаимодействии с веществом твердой фазы [1]. Это взаимовлияние может осуществляться в виде конкуренции за ограниченное число сорбционных центров или в виде синергизма. К синергизму приводит взаимодействие белков в фазе сорбента, которое может осложнить хроматографическое разделение многокомпонентных смесей белков [2, 3].

вание идет за счет межбелковых взаимодействий. В динамических условиях при последовательном нанесении белков на колонку вытеснения одного белка другим не происходит.

При ослаблении взаимодействия белок–сорбент, которого можно добиться уменьшением степени ионизации ионогенных групп сорбента [7] или уменьшением концентрации ионогенных групп, наблюдается переход от синергизма к конкуренции. При реализации конкурентного механизма сорбции повышается эффективность разделения белковых смесей в хроматографических процессах [8].

В работе [9] уменьшения концентрации ионогенных групп сорбента достигали за счет изменения соотношения между звеньями ионогенного мономера и сшивающего агента. Увеличение содержания сшивающего агента приводило к существенным изменениям в структуре полиэлектролитных сеток и к необратимой сорбции белка.

Ранее нами был осуществлен синтез гидрофильных гетеросетчатых полиоснований с различным содержанием ионогенных групп на основе N-диметиламинопропилметакриламида (ДМАМ), N-(2-гидроксипропилметакриламида) (ГПМА) и N,N'-этилендиметакриламида (ЭДМА) [10]. Снижения концентрации ионогенных групп достигали за счет включения в полимерную сетку неио-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 03-03-322710).

E-mail: demin@imc.macro.ru (Демин Александр Александрович)

ногенного мономера при сохранении фиксированного содержания сшивающего агента. Уменьшение содержания ДМАМ приводит к переходу от синергизма в процессах многокомпонентной сорбции к конкуренции, т.е. сорбция белков в данных условиях становится полностью обратимой [11].

Цель настоящей работы – синтез сорбентов с различным содержанием карбоксильных групп, на которых при уменьшении содержания карбоксилодержащего мономера может быть достигнут переход от синергизма к конкуренции в процессе сорбции белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез метакрилоилаланина (МАА) проводили аналогично ацилированию аминокислот в щелочной среде в присутствии NaOH. В колбу, снабженную мешалкой, термометром и двумя капельными воронками, загружали 44.5 г (0.5 моля) β -аланина, 250 мл 2 N водного раствора NaOH (0.5 моля) и 1.25 г NaNO₃ в качестве ингибитора реакции полимеризации. После охлаждения образовавшегося раствора соли до -5°C при интенсивном перемешивании постепенно добавляли попеременно 60.5 мл (0.63 моля) хлорангидрида метакриловой кислоты (МАК) и 160 мл 4 N NaOH так, чтобы температура реакционной смеси не превышала 5°C. Время введения реагентов для данной загрузки 1 ч. Затем реакционную смесь выдерживали еще в течение 1 ч и подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH 1–2. Подкисленную реакционную смесь переносили в делительную воронку и экстрагировали этилацетатом. Чистый МАА получали после удаления этилацетата и промывки кристаллов диэтиловым эфиром. Выход МАА 48.5 г (62%).

Сополимеризацию МАК и ГПМА с ЭДМА, МАА и ГПМА с ЭДМА проводили в 10%-ном водном растворе уксусной кислоты при концентрации мономеров в растворе 20% под действием окислительно-восстановительной системы персульфат аммония–бисульфит натрия в токе аргона при комнатной температуре. Образовавшийся блок-сополимер прогревали при 80°C в течение 1 ч. После охлаждения блок-сополимер измельчали, отмывали водой до pH 6–7, сушили на воздухе. Для исследования отбирали фракцию с размерами 100–200 мк в сухом виде.

Потенциометрическое титрование сорбентов осуществляли методом отдельных навесок [12] 0.1 N раствором KOH в 0.1 N KCl. Навески воздушно-сухого сорбента (100 мг) помещали во флаконы и заливали различным количеством раствора щелочи, доводя объем раствора до 10 мл 0.1 N раствором KCl. Периодически измеряли pH раствора до тех пор, пока значения не достигали постоянных величин.

Кажущиеся константы ионизации сорбентов определяли по кривым потенциометрического титрования, построенным в координатах Гендersona–Гессельбаха [13].

Качественной мерой взаимодействия полимерной сетки с растворителем является коэффициент набухания $K_{\text{наб}}$, равный отношению объемов набухшего и сухого сорбента. Для всех образцов получены коэффициенты набухания в воде. Кроме того, поскольку очень важной характеристикой при эксплуатации сорбентов (катионитов) является изменение их объема при переходе из водородной в солевую форму, определены относительные коэффициенты набухания $K_{\text{отн}}$ как отношение $K_{\text{наб}}$ в Na-форме (при pH 6.8) к $K_{\text{наб}}$ H-формы.

Сорбцию лизоцима и рибонуклеазы из растворов с концентрацией 1 мг/мл осуществляли на стальной колонке 2 × 62 мм, заполненной набухшим сорбентом; скорость подачи раствора 50 мкл/мин. Сорбцию проводили в 0.1 M фосфатном буфере при pH 5.8. При таком значении pH поглощение лизоцима и рибонуклеазы близко к максимуму [11]. Регистрацию оптической плотности растворов на выходе из колонки осуществляли при длине волны 210 нм с записью на самописце. После пропускания раствора первого белка до насыщения сорбента (о насыщении судили по прекращению изменения концентрации белка на выходе) через колонку пропускали раствор второго белка. Десорбцию белков проводили 0.3%-ным раствором α -фосфорной кислоты, собирая на выходе из колонки фракции по 500 мкл. Компонентный состав фракций анализировали на микроколоночном хроматографе “Милихром”. Условия анализа смеси белков описаны в работе [4].

Таблица 1. Характеристики сорбентов, синтезированных при различном соотношении МАК и ГПМА

Мольное соотношение МАК : ГПМА	$K_{\text{наб}}$ в воде	$K_{\text{отн}}$	Емкость по Na^+ , мг-экв/г	
			рассчитано	найдено
1 : 0	6.0	1.5	9.81	9.69
1 : 1	6.2	1.8	3.85	4.29
1 : 5	6.6	1.2	1.12	1.26
0 : 1	6.6	0.94	—	—

Примечание. Растворитель при сополимеризации – 10%-ный водный раствор уксусной кислоты. Концентрация ЭДМА 7.5 мол. %.

Таблица 2. Сетчатые полиэлектролиты на основе МАА с ЭДМА

ЭДМА, мол. %	$K_{\text{наб}}$	Емкость по Na^+ , мг-экв/г		$K_{\text{отн}}$
		рассчитано	найдено	
5	9.7	5.98	5.48	2.2
7.5	8.7	5.78	5.30	1.8
10	6.6	5.59	5.06	1.6
15	5.7	5.52	5.05	1.4
20	5.3	4.85	4.62	1.4

Примечание. Растворитель при сополимеризации – 10%-ный водный раствор уксусной кислоты. Концентрация смеси мономеров в растворе 20%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гетеросетчатые сорбенты формируются в процессе гетерофазной сополимеризации в растворителях, являющихся осадителями образую-

щихся сополимеров. Гетеросетчатые сорбенты представляют собой полимерные сетки, в которых сочетаются плотно сшитые участки, включающие микроглобулы, с разреженными участками полимерных цепей. Такая структура содержит значительную массу растворителя, что обеспечивает транспорт макромолекул к сорбционным центрам.

Ранее нами было показано, что проведение сополимеризации МАК с ЭДМА в водно-органических растворителях приводит к образованию полиэлектролитов гетеросетчатой структуры, которые обладают высокой проницаемостью в набухшем состоянии и обратимо с высокой емкостью (до 1880 мг/г) сорбируют молекулы белков [14].

Учитывая полученные данные по сополимеризации МАК с ЭДМА в водных растворах уксусной кислоты, синтез сетчатых полиэлектролитов с варьируемым содержанием карбоксильных групп осуществляли путем тройной сополимеризации МАК и ГПМА с ЭДМА в 10%-ной уксусной кислоте. В табл. 1 приведены условия синтеза и некоторые характеристики полученных карбоксилсодержащих сорбентов. Значения $K_{\text{отн}}$, характеризующие устойчивость сорбента, для гетеросетчатых сорбентов не превышают двух, что значительно ниже значений, измеренных для гелевых однородных сорбентов [14].

Для выяснения условий синтеза, необходимых для получения гетеросеток, была проведена сополимеризация МАА с различным содержанием ЭДМА в 10%-ном водном растворе уксусной кислоты. В результате были синтезированы гидрофильные гетеросетчатые полиэлектролиты, коэффициент набухания которых уменьшается от 9.7 до 5.3 при увеличении содержания ЭДМА от 5 до 20 мол. % (рис. 1). $K_{\text{отн}}$ при этом изменяется от 2.2 до 1.4 и остается постоянным при содержании ЭДМА в интервале 15–20 мол. % (табл. 2).

На основании полученных данных по сополимеризации МАА с ЭДМА тройную сополимеризацию МАА, ГПМА и ЭДМА проводили также в 10%-ной уксусной кислоте при концентрации мономерной смеси 20%. Соотношение МАА и ГПМА варьировали от 1 : 0 до 1 : 5 при содержании сшивющего агента ЭДМА 20 мол. %. В табл. 3 приведены условия синтеза и некоторые характеристики синтезированных сополимеров. Как вид-

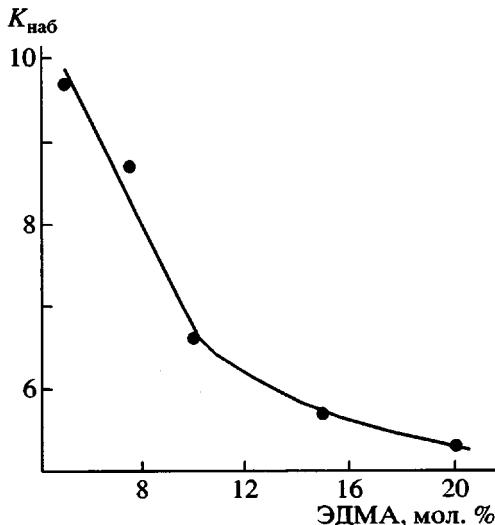


Рис. 1. Зависимость коэффициента набухания $K_{\text{наб}}$ сополимеров МАА-ЭДМА в воде от содержания ЭДМА.

Таблица 3. Условия синтеза и некоторые характеристики сополимеров МАА, ГПМА и ЭДМА

Мольное соотношение МАА : ГПМА	Емкость по Na^+ , мг-экв/г		$K_{\text{наб в воде}}$	$K_{\text{отн}}$
	рассчитано	найдено		
1 : 0	4.85	4.62	5.3	1.4
1 : 1	2.52	2.40	5.5	1.1
1 : 5	0.86	0.92	5.8	1.0

но, обменные емкости, вычисленные из соотношения сомономеров и определенные из данных потенциометрического титрования, близки, что позволяет высказать предположение о доступности большей части ионогенных групп. При таком содержании ЭДМА формируются сшитые структуры с близкими коэффициентами набухания в водородной и солевой формах. Это показывает, что сорбенты имеют стабильную структуру. Коэффициент набухания сорбента в воде (рис. 2а) увеличивается незначительно от 5.3 до 5.8 при повышении содержания неионогенного мономера ГПМА и соответственном уменьшении содержания МАА. При степени ионизации $\alpha = 0.5$ значение $K_{\text{отн}}$ падает до 1.0 при уменьшении содержания МАА (рис. 2б).

О близости структур синтезированных сополимеров свидетельствуют кривые потенциометрического титрования (рис. 3); значения рK для всех трех образцов одинаковы и составляют 6.15 ± 0.05 .

Как указано выше, в динамическом режиме при последовательном нанесении растворов двух белков на колонку синергетические эффекты выражаются в отсутствии вытеснения одного белка другим. При реализации конкурентного механизма сорбции нанесение на колонку раствора второго белка приводит к полному вытеснению предварительно сорбированного белка. В табл. 4 сведены данные по последовательной сорбции лизоцима и рибонуклеазы на всех исследованных образцах. Как видно, на серии сорбентов с различным содержанием МАК не выявлено перехода от синергизма к конкуренции по мере уменьшения содержания ионогенных звеньев в сорбенте. В динамическом режиме при последовательном пропускании через колонку растворов лизоцима и рибонуклеазы при любом порядке нанесения не происходит замещения одного белка

Таблица 4. Последовательная сорбция лизоцима и рибонуклеазы на катионитах с различным соотношением МАК : ГПМА и МАА : ГПМА

Опыт, №	Мольное соотношение МАК : ГПМА (опыты 1–3), МАА : ГПМА (опыты 4–6)	Емкость по Na^+ , мг-экв/г
1	1 : 0	9.69
2	1 : 1	4.29
3	1 : 5	1.26
4	1 : 0	4.62
5	1 : 1	2.40
6	1 : 5	0.92

Примечание. В опытах 1–5 вытеснения нет, в опыте 6 – вытеснение есть.

другим. При десорбции в собранных фракциях содержатся два белка.

Эксперименты до последовательной сорбции лизоцима и рибонуклеазы в динамике на серии

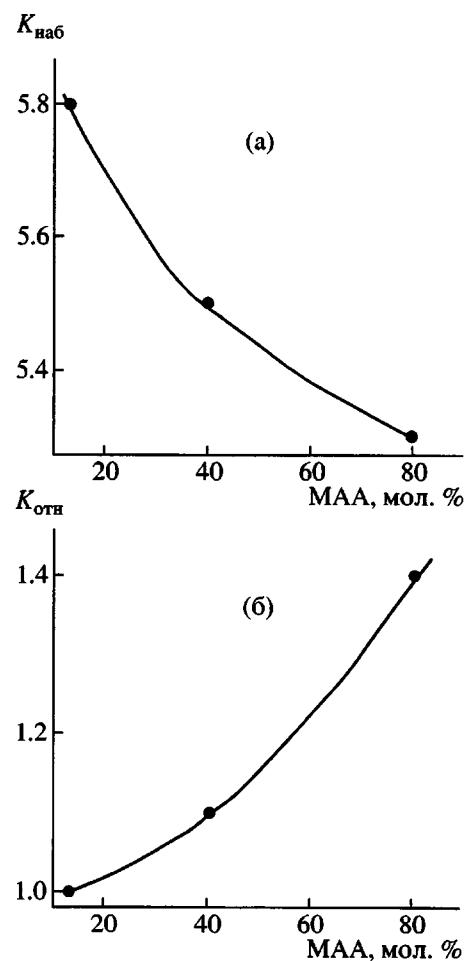


Рис. 2. Влияние количества МАА в сополимерах МАА-ГПМА-ЭДМА на набухание в воде (а) и относительное набухание (б) при степени ионизации $\alpha = 0.5$.

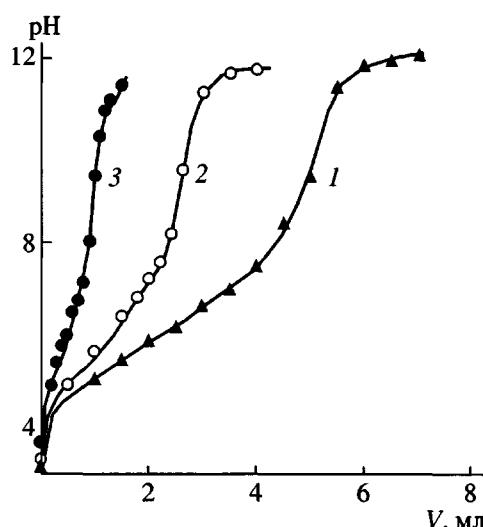


Рис. 3. Кривые потенциометрического титрования образцов с различным содержанием МАА и ГПМА при концентрации ЭДМА 20 мол. %. [МАА] = 80 (1), 40 (2) и 13.3 мол. % (3). [ГПМА] = 0 (1), 40 (2) и 67.7 мол. % (3).

сорбентов с МАА показали, что в случае использования образца с соотношением ионогенных и неионогенных звеньев 1 : 5 мы имеем дело с чисто конкурентным процессом. Можно предположить, что отсутствие перехода от синергизма к конкуренции на серии сорбентов на основе МАК определяется образованием блоков МАК при синтезе. Тогда представляется естественным, что близость структур МАА и ГПМА предопределяет равномерное распределение ионогенных звеньев в объеме сорбента и, следовательно, отсутствие многоточечного связывания белка с сорбентом. Можно сделать вывод, что не только общее содержание ионогенных групп в сорбенте, но и их распределение играет важную роль в реализации того или иного механизма многокомпонентной сорбции белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helfferich F., Klein G. Multicomponent Chromatography: Theory of Interference. New York: Marcel Dekker, 1970.
2. Finette G.V.S., Baharin B.S., Mao Q.-M., Hearn M.T.V. // Biotechnol. Prog. 1997. V. 13. P. 265.
3. Xu W., Regnier F.E. // J. Chromatogr. 1998. V. 828. P. 357.
4. Демин А.А., Дынкина И.М. // Журн. физ. химии. 1995. Т. 65. № 4. С. 718.
5. Demin A.A., Mogilevskaya A.D., Samsonov G.V. // J. Chromatogr. A. 1997. V. 760. P. 105.
6. Меленевский А.Т., Чижова Е.Б., Папукова К.П. // Журн. физ. химии. 2000. Т. 74. № 8. С. 1464.
7. Демин А.А., Папукова К.П., Никифорова Е.С., Самсонов Г.В. // Журн. физ. химии. 2000. Т. 74. № 4. С. 689.
8. Демин А.А., Папукова К.П., Никифорова Е.С., Павлова Е.Н. // Журн. прикл. химии. 2001. Т. 75. № 4. С. 625.
9. Hanter A.K., Carta G. // J. Chromatogr. A. 2000. V. 897. P. 65.
10. Папукова К.П., Демин А.А., Никифорова Е.С. // Высокомолек. соед. Б. 2000. Т. 42. № 11. С. 1936.
11. Demin A.A., Melenevsky A.T., Papukova K.P. // J. Chromatogr. A. 2003. V. 1006. P. 185.
12. Гельферих Ф. Иониты. М.: Изд-во иностр. лит., 1962. С. 86.
13. Полянский Н.Г., Полянская Н.А. Методы исследования ионитов. М.: Химия, 1976.
14. Папукова К.П., Никифорова Е.С., Юрченко В.С., Кузнецова Н.П. // Журн. прикл. химии. 1995. Т. 68. № 12. С. 2033.

Hydrophilic Heteroreticular Polyelectrolytes with Varying Content of Carboxyl Groups

K. P. Papukova, E. S. Nikiforova, A. A. Demin, A. T. Melenevskii, and E. B. Chizhova

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

Abstract—Hydrophilic reticular sorbents that have heterogeneous structures and differ in content of ionogenic groups were prepared by tertiary copolymerization of an ionic monomer (methacrylic acid or methacryloylalanine) with N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide and N,N'-ethylenedimethacrylamide in an aqueous acetic acid solution. The interaction of these sorbents with model proteins (lysozyme and ribonuclease) was studied. As the content of ionogenic units decreases, methacryloylalanine-based sorbents provide the transition from the synergistic to the competitive mechanism of protein sorption.