

УДК 541(64+49+183)

СТАБИЛИЗАЦИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИАНИОНОВ В НЕЙТРАЛЬНЫХ И СЛАБОКИСЛЫХ СРЕДАХ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА НЕЕ

© 2007 г. В. А. Изумрудов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Химический факультет
119992 Москва, Ленинские горы
Поступила в редакцию 12.10.2006 г.
Принята в печать 09.11.2006 г.

Методом турбидиметрического титрования изучена устойчивость нерастворимых полиэлектролитных комплексов, образованных различными карбоксилсодержащими полианионами с положительно заряженным партнером – линейным поликатионом или белком. В подавляющем большинстве случаев подкисление среды приводит к существенному упрочнению комплексов по отношению к действию вводимой соли, которое наблюдали в нейтральных или слабокислых средах. Полученные данные по влиянию химической природы полимерных компонентов, а также степени полимеризации, плотности заряда и структуры их цепей на pH-зависимые профили разрушения комплексов свидетельствуют в пользу того, что этот эффект обусловлен стабилизацией полиэлектролитного комплекса системой водородных связей, формируемой карбоксильными группами частично заряженного полиамиона, включенного в состав комплекса. Обнаруженное резкое и обратимое изменение устойчивости систем при благоприятных для функционирования биополимеров pH и ионной силе раствора (белков, ферментов, антител, нуклеиновых кислот и т.п.) делает поликарбоксилатные полиэлектролитные комплексы особенно привлекательными для решения важных практических задач, например в биотехнологии для разделения биологических смесей.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, какую важную роль играет низкомолекулярный электролит в межмакромолекулярных реакциях, протекающих в водных средах с участием полиэлектролитных компонентов. Его присутствие является обязательным для осуществления интерполиэлектролитного обмена в смесях разбавленных растворов разноименно заряженных полиионов, приводящего к образованию водорастворимых нестехиометрических полиэлектролитных комплексов (НПЭК), а концентрация и природа добавляемых низкомолекулярных ионов могут определять направление и скорость конкурентных интерполиэлектролитных реакций в растворах НПЭК [1]. Как правило, введение больших количеств низкомолекулярного электролита приводит к диссоциации полиэлектролитных комплексов, построенных из высоко-заряженных полимерных компонентов, которая

завершается в достаточно концентрированных водно-солевых растворах. Поскольку введение соли является универсальным средством разрушения комплексных частиц, стабильность полиэлектролитных комплексов обычно оценивают по их устойчивости в водно-солевых средах.

Другим способом воздействия на комплексообразование может быть изменение кислотности среды, влияющее на состояние пар полиионов, в которых один или оба полимерных компонента представляют собой слабые полиэлектролиты. Наличие во взаимодействующих цепях ионогенных групп с pH-зависимой ионизацией делает такие комплексы чувствительными к изменению кислотности среды и приводит к их диссоциации и полному разрушению в той области pH, где один из полимерных компонентов теряет свой заряд. Значимость pH как фактора, контролирующего стабильность полиэлектролитных комплексов, заметно возрастает, если в качестве слабого полиэлектролита использовать полимер, способ-

E-mail: izumrud@genebee.msu.su (Изумрудов Владимир Алексеевич).

ный образовывать водородные связи. Так, в трехкомпонентных системах, содержащих слабую карбоксилсодержащую поликислоту (полиакриловую или полиметакриловую), слабое полиоснование (поли-2-винилпиридин или олигоэтиленимин) и полимер, способный образовывать водородные связи (полиэтиленгликоль), реакционная способность полимерных компонентов и природа образующихся комплексов существенно зависят от pH раствора [2]. В кислой среде, где слабая поликислота находится преимущественно в недиссоциированной форме, ее взаимодействие с полиэтиленгликолем приводит к возникновению комплекса, стабилизированного межмолекулярными водородными связями. В нейтральной области и слабая поликислота, и слабое полиоснование частично заряжены, и это создает условия для образования еще и полиэлектролитного комплекса. В щелочной среде, где слабая поликислота полностью ионизована, а слабое полиоснование незаряжено, взаимодействие между компонентами отсутствует вовсе.

Способность карбоксильных групп поликарбоновых кислот взаимодействовать друг с другом за счет образования водородных связей открывает дополнительные возможности регулирования стабильности полиэлектролитных комплексов изменением кислотности среды. В настоящей работе исследованы пары, составленные из различных карбоксилсодержащих полианионов и их положительно заряженных партнеров. В подавляющем большинстве случаев они обладали высокой чувствительностью к изменению pH, существенно упрочняясь в нейтральных и слабокислых средах. Совокупность полученных в работе данных дополняет результаты проведенных ранее исследований [3–5] и свидетельствует в пользу того, что этот эффект обусловлен стабилизацией полиэлектролитного комплекса системой водородных связей, формируемой карбоксильными группами частично заряженного полианиона. Резкое и обратимое изменение устойчивости систем при благоприятных для функционирования биополимеров pH и ионной силе раствора (белков, ферментов, антител, нукleinовых кислот и т.п.) делает поликарбоксилатные полиэлектролитные комплексы особенно привлекательными для решения важных прикладных задач, например в

биотехнологии для разделения биологических смесей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Буферные соли MES (2-[N-морфолино]этансульфоновая кислота), HEPES (N-[2-оксиэтил]пiperазин-N'-[2-этансульфоновая кислота]) и TRIS (три(гидроксиметил)аминометан), а также NaCl и NaOH фирмы "Sigma" (США) использовали без дополнительной очистки. Растворы готовили в бидистilledированной воде.

Поликатионы

3,3-, 6,6- и 10,10-Ионен бромиды. Образцы ионен бромидов с среднечисленной степенью полимеризации 80, 110 и 100 соответственно были синтезированы, фракционированы и охарактеризованы по методике [6].

Поли-N-этил-4-винилпиридиний бромиды (ПЭП-β). Образцы ПЭП-β с различной степенью алкилирования β получали алкилированием поли-4-винилпиридина бромистым этилом. Использовали фракции поли-4-винилпиридина со средневесовыми степенями полимеризации 100, 340 и 900, измеренными светорассеянием, а также олигомерные фракции со среднечисленными степенями полимеризации 10, 20 и 30, определенными эбуллиоскопией. Степень алкилирования полимеров определяли ИК-спектроскопией [7].

Полианионы

Полиметакриловая кислота. Использовали олигомерный образец ПМАК фирмы "Fluka" (Швейцария) среднечисленной степени полимеризации 80 (ПМАК₈₀) и относительно высокомолекулярные образцы ПМАК₂₁₅ и ПМАК₁₈₄₀ фирмы "Polysciences" (США).

Полиакриловая кислота. Исследовали образцы ПАК степени полимеризации 30, 70 и 2360 фирмы "Aldrich" (США).

Сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида (ДИВЭМА). Образец гидролизованного ДИВЭМА средневесовой степени полимеризации 820 был синтезирован из соответствующих

мономеров по реакции радикальной циклосополимеризации. Полимер получен и охарактеризован М.Ю. Горшковой (ИНХС им. А.В. Топчиева РАН).

Полигалактуроновая кислота (ПГК) и полиглутаминовая кислота (ПИК). Использовали образец ПГК фирмы "Aldrich" (США) и образец ПИК фирмы "Polysciences" (США).

Глобулярные белки

Использовали коммерческие препараты лизоцима (Lys) из куриных яиц, а также бычьего γ -глобулина (IgG) и рибонуклеазы A (RNase) из поджелудочной железы быка фирмы "Sigma-Aldrich" (США) в виде лиофилизованных образцов 95–98%-ной чистоты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Турбидиметрическое титрование

Турбидиметрическое титрование осуществляли на спектрофотометре "Hitachi 150-20" (Япония) последовательным добавлением концентрированного раствора хлористого натрия в смесь растворов полимерных компонентов с интервалом в 2 мин. Титрование проводили непосредственно в кварцевой кювете при постоянном перемешивании и комнатной температуре, измеряя оптическую плотность при длине волны 320 нм. В отдельных опытах в качестве титранта использовали раствор буфера.

Полиэлектролитные комплексы готовили непосредственно перед измерением, смешивая в кювете равные объемы растворов поликарбоксилатного аниона и поликатиона в буфере (MES, HEPES или TRIS). Буфер предварительно доводили до нужного значения pH добавлением концентрированных растворов HCl или NaOH. Для исследования слабокислых растворов использовали 0.05 M растворы MES, а нейтральные и слабощелочные растворы компонентов готовили в 0.05 M растворах HEPES и TRIS соответственно. Концентрация карбоксильных групп полианиона в смесях составляла 4×10^{-4} моль/л.

Комплексы с белками готовили аналогичным образом, но предварительно находили соотноше-

ние белок/поликислота, соответствующее максимальной мутности. Для этого проводили турбидиметрическое титрование раствора поликарбоксилатного аниона концентрированным раствором белка (0.05 M HEPES, pH 6.0). Найденное соотношение компонентов использовали приготовлении смесей белок/поликислота. Концентрация карбоксильных групп полианиона в смесях составляла 4×10^{-4} моль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность комплексов оценивали по их устойчивости в растворах хлористого натрия. Для этого проводили турбидиметрическое титрование растворов смесей полионов, содержащих эквимольные количества ионогенных групп, концентрированным раствором соли. Точку, соответствующую полному исчезновению мутности, определяли спектрофотометрически по отсутствию оптического поглощения при длине волны 320 нм, т.е. в области спектра, где ни один из полимерных компонентов не поглощал свет. Мольную концентрацию соли, при которой достигалось полное растворение, обозначали $[NaCl]^*$. В специальных экспериментах ту же точку находили титрованием раствором буфера прозрачных смесей полимерных компонентов, заранее приготовленных в концентрированных солевых растворах. Значения $[NaCl]^*$ при прочих равных условиях не зависели от использованного титранта (соли или буфера). Это свидетельствует о том, что за время проведения опытов в системах успевало установиться равновесное состояние, и дает основание использовать значения $[NaCl]^*$, найденные из турбидиметрических кривых, в качестве критерия устойчивости полиэлектролитного комплекса. Отметим, что этот критерий не является строгим. По данным флуориметрического титрования и скоростной седиментации [8], полное разделение компонентов полиэлектролитного комплекса достигается при более высокой концентрации вводимого низкомолекулярного электролита, а при концентрации $[NaCl]^*$ происходит только растворение комплекса из-за глубокого разрушения системы межмолекулярных солевых связей. Однако разница в концентрации соли, соответствующей этим двум критическим точкам, невелика и составляет обычно 10–15%,

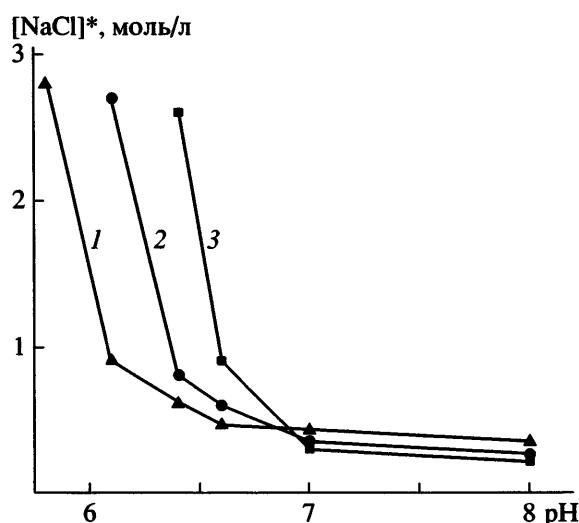


Рис. 1. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПМАК₁₈₄₀ и ПЭП-β₃₄₀ со степенью алкилирования β = 95 (1), 55 (2) и 40% (3). c_{ПМАК} = 4 × 10⁻⁴ осново-моль/л. T = 20°.

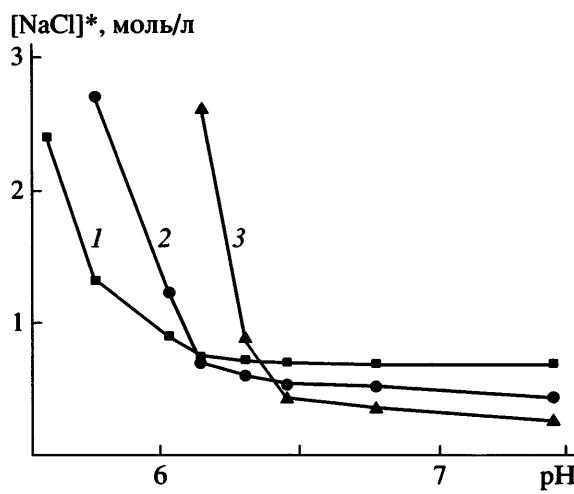


Рис. 2. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПМАК₁₈₄₀ и n,n-ионен бромида, имеющего n = 3 (1), 6 (2) и 10 (3). c_{ПМАК} = 4 × 10⁻⁴ осново-моль/л. T = 20°.

что позволяет использовать данные турбидиметрического титрования для оценки стабильности полиэлектролитных комплексов.

На рис. 1 приведены результаты турбидиметрического титрования эквимольных смесей ПМАК с высокомолекулярным поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом одинаковой степени полимеризации (ПЭП-β₃₄₀), но различной степени алкилирования β. Данные представлены в виде зависимости концентрации соли, отвечающей точкам помутнения, от pH раствора. Видно, что в нейтральных средах при pH > 6.9 значения [NaCl]^{*} практически не зависят от pH, а расположение кривых 1–3 соответствует ожидаемому росту стабильности комплексов с ростом β, т.е. с увеличением плотности заряженных четвертичных пиридиниевых групп на цепях поликатионов. Ситуация меняется на прямо противоположную при pH < 6.9, где подкисление среды вызывает резкое возрастание значений [NaCl]^{*}, а более устойчивыми к действию соли оказываются комплексы, образованные поликатионами с меньшей β. В этом легко убедиться, сравнивая значения [NaCl]^{*}, полученные для различных ПЭП-β при фиксированном pH. С увеличением β стабилизация комплексов происходит в более кислой среде, хотя даже в случае практически полностью алки-

лированного ПЭП-95 (кривая 1) она наблюдается в близком к нейтральной области интервале 5.7 < pH < 6.1. Ранее [3] мы уже отмечали значительное упрочнение водорастворимого НПЭК (ПМАК/ПЭП-β) в слабокислых средах, которое также было выражено наиболее ярко для поликатионов с наименьшей степенью алкилирования. Этот эффект связывали с протонированием неалкилированных звеньев поликатиона, включенного в состав НПЭК и со стабилизацией комплекса за счет вновь образующихся ионных пар с карбоксилатными анионами. Высказывалось также предположение о возникновении комплексов с переносом заряда между карбоксильной группой ПМАК и неалкилированной пиридиновой группой ПЭВП-β. Эти комплексы могли вносить свой вклад в упрочнение комплексных частиц. Однако результаты исследований смесей ПМАК с n,n-ионен бромидами (рис. 2) свидетельствуют о том, что не эти факторы лежат в основе стабилизации комплексов. Ионеновые поликатионы несут в основных цепях исключительно четвертичные аминогруппы, разделенные последовательностями из n-метиленовых групп. Такие аминогруппы заряжены при любом pH и потому могут принимать участие лишь в кулоновских взаимодействиях. Тем не менее, приведенные на

рис. 2 профили устойчивости комплексов ПМАК с ионен бромидами, различающимися плотностью заряда на цепях, подчиняются тем же закономерностям. Плотность заряда ионенов определяется количеством метиленовых групп в развязках, и увеличение их числа от трех (кривая 1) до шести (кривая 2) и, наконец, до десяти (кривая 3) приводит к тем же последствиям, что и уменьшение степени алкилирования ПЭП- β (рис. 1), а именно: при фиксированном рН в нейтральных средах значения $[NaCl]^*$ закономерно уменьшаются, тогда как в слабокислых средах наблюдаются резкий рост стабильности комплексов и инверсия хода кривых.

Для понимания механизма такой стабилизации комплексов важными являются результаты работ по изучению полизелектролитных многослойных пленок [4, 5]. Пленки, сформированные многократной попеременной адсорбцией на подложку ПЭП- β и ПМАК из их разбавленных растворов, проявляли высокую устойчивость к действию хлористого натрия в слабокислых средах. Профили разрушения пленок и комплексов, составленных из тех же компонентов (рис. 1), практически совпадают. У пленок, приготовленных из ПЭП- β и полиакриловой кислоты, наблюдалась та же зависимость изменения стабильности от степени алкилирования поликатиона, но профили разрушения смешались почти на единицу рН в кислую область. Наиболее интересный результат получен при анализе состояния ионогенных групп поликислот в пленках. Оказалось, что если массив данных по разрушению пленок ПАК/ПЭП- β или ПМАК/ПЭП- β представить в виде зависимости критической концентрации соли от степени ионизации поликислоты, то экспериментальные точки укладываются на общую кривую, причем резкое упрочнение пленок наступает, когда доля ионизованных групп поликислоты снижается до половины [4]. Иными словами, стабильность комплекса определяется степенью ионизации поликарбоксилатного аниона, включенного в комплекс. Следует особо отметить, что степень ионизации поликислоты в комплексе, как правило, не совпадает со степенью ионизации свободной поликислоты в растворе. Будучи в связанном с поликатионом состоянии и испытывая влияние его положительно заряженных групп, слабая поликислота ионизуется в более кислых

средах [1]. С ростом плотности заряда на цепях поликатиона это влияние возрастает, что находит свое отражение в сдвиге профилей разрушения комплексов в кислые среды (рис. 1, 2). Очевидно также, что в случае поликарбоксилатного полимера с большей кислотностью его ионизация в комплексе должна осуществляться при меньших значениях рН. Соответственно профили разрушения комплексов на основе полиакриловой кислоты, имеющей (по разным данным) $pK_a \approx 5-6$, располагаются в более кислой области по сравнению с аналогичными кривыми, полученными для ПМАК с $pK_a \approx 6-7$.

Совокупность этих данных позволяет отнести наблюдаемый эффект за счет формирования системы водородных связей, включающей в себя протонированные карбоксильные группы, которая армирует полизелектролитный комплекс и препятствует его разрушению под воздействием вводимой соли. В основе такого механизма стабилизации лежит известная способность поликарбоновых кислот образовывать устойчивые водородные связи, циклические димеры и олигомерные ассоциированные структуры, которые обнаруживаются не только в пленках [9], но и в водных растворах [10].

Мы исследовали пары полионов, состоящие из ПЭП-95 и различных карбоксилодержащих поликислот (рис. 3). Во всех случаях, кроме одного (кривая 5), наблюдался тот же эффект значительного упрочнения комплексов при подкислении растворов. Расположение кривых 1–4 по оси абсцисс следует упомянутому выше принципу, смешавшись влево с уменьшением pK_a поликислот, образующих комплекс. Однако ход кривых, будучи практически тем же для комплексов ПАК (кривая 3) и ПМАК (кривая 2), в остальных случаях отличается. Так, для ПГК, имеющей $pK_a \approx 5$ [11], упрочнение комплекса осуществляется наиболее кооперативно, тогда как в нейтральных средах этот комплекс оказывается наименее устойчивым к действию соли (кривая 4). И то и другое может быть обусловлено действием стерического фактора. Как известно, цепь ПГК отличается высокой жесткостью. Это должно препятствовать подстраиванию компонентов комплекса друг к другу и, следовательно, снижать его стабильность из-за увеличения расстояния между

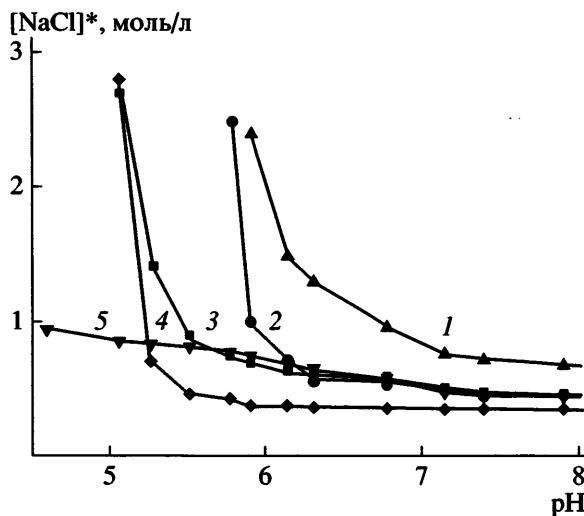


Рис. 3. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПЭП-95₉₀₀ и полиионона ПИК (1), ПМАК (2), ПАК (3), ПГК (4) и ДИВЭМА (5). $c_{\text{ПЭП-95}} = 4 \times 10^{-4}$ осново-моль/л. $T = 20^\circ$.

зарядами в ионных парах. По той же причине жесткость цепей ПГК может затруднять образование армирующей сетки водородных связей в комплексе, формирование которой сдвигается в кислые среды. Как следствие, на кривой 4 практически отсутствует переходная область с постепенным возрастанием стабильности комплекса, которая предшествует его резкому упрочнению.

Такая переходная область присутствует на остальных кривых и выражена наиболее ярко в случае полигидроксокислоты (рис. 3, кривая 1), имеющей $pK_a \approx 7.2$ [12]. В повторяющихся звеньях ПИК у одного атома углерода присутствуют α - и β -COOH-группы. Иными словами, в этой поликислоте такой же интервал между карбоксильными группами вдоль хребта макромолекулы, как в ПАК или ПМАК, но плотность заряда в 2 раза больше. Поскольку обе карбоксильные группы звена ПИК стерически доступны для межмолекулярного взаимодействия, стабильность ее комплекса с поликатионом относительно велика, а переходная область, отражающая зарождение и рост фрагментов армирующей сетки водородных связей, расположена в нейтральных средах (кривая 1). Особым образом вел себя комплекс, в котором роль поликислоты играл гидролизованный сополимер дивинилового эфира и малеинового

ангирида. Плотность карбоксильных групп в цепях ДИВЭМА, имеющего $pK_a \approx 7$ [13], сравнима и даже выше, чем в цепях ПАК и ПМАК. Тем не менее вместо ярко выраженного упрочнения в этой системе наблюдается относительно невысокий рост стабильности комплекса при подкислении раствора (кривая 5). Этот результат легко объясним в рамках предложенного механизма стабилизации комплекса, если учесть склонность соседних по цепи карбоксильных групп ДИВЭМА образовывать пары, стабилизированные водородными связями [14]. Очевидно, что участие таких связанных групп в формировании прочной пространственной сетки в комплексе затруднительно, если вообще возможно.

Полученные нами данные по влиянию степени полимеризации полимеров на устойчивость полиэлектролитных комплексов (рис. 4–6) также согласуются с предлагаемым механизмом их стабилизации. В системе ПЭП-95/ПАК (рис. 4) при использовании высокомолекулярной поликислоты ПАК₂₃₆₀ обсуждаемый эффект наблюдается вполне отчетливо (кривая 3). Однако для относительно коротких цепей ПАК₇₀ (кривая 2) и ПАК₃₀ (кривая 1) профили разрушения комплекса вырождаются в плавкие кривые, располагающиеся друг под другом в соответствии с уменьшающейся ММ поликислоты. Похожим образом ведут себя комплексы ПЭП-95/ПМАК (рис. 5), но для них резкий рост устойчивости реализуется для образцов поликислоты ПМАК₁₈₄₀ (кривая 3) и ПМАК₂₁₅ (кривая 2), а вырождение наступает в случае короткой ПМАК₈₀ (кривая 1).

Таким образом, для надежной стабилизации комплексов необходимо использовать поликислоты, цепи которых содержат не менее двухсот звеньев. Если учитывать, что резкое упрочнение комплексов наступает при содержании в них примерно равных количеств ионизованных и неионизованных карбоксильных групп [4], и полагать, что карбоксилатные анионы электростатически связаны с поликатионами и не участвуют в образовании водородных связей, то минимальное число неионизованных карбоксильных групп, способных стабилизировать комплекс, снижается до сотни. Иными словами, даже такая грубая оценка приводит к числу карбоксильных групп 50–100, обеспечивающему поликислотам их кооператив-

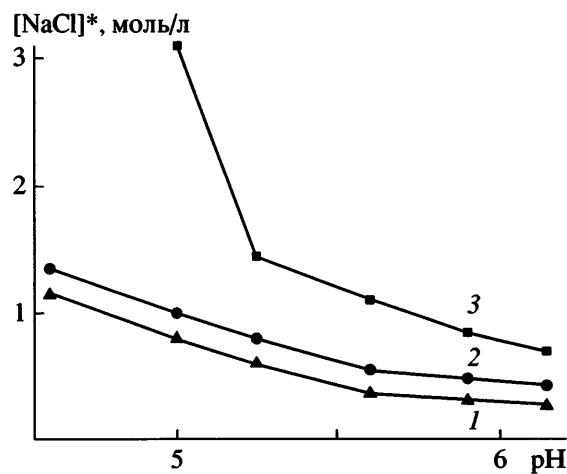


Рис. 4. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПЭП-95₉₀₀ и ПАК степени полимеризации 30 (1), 70 (2) и 2360 (3). $c_{\text{ПЭП-95}} = 4 \times 10^{-4}$ основомоль/л. $T = 20^\circ$.

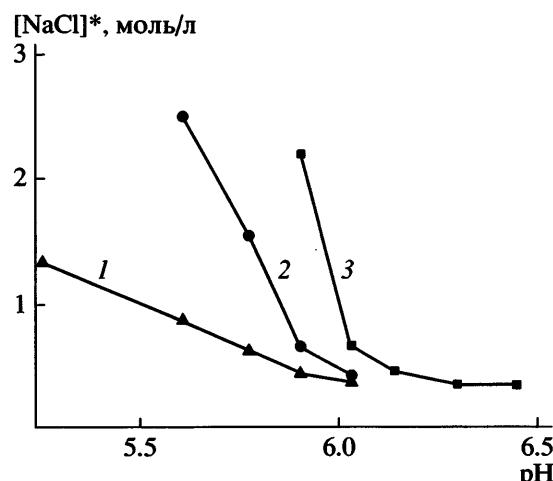


Рис. 5. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПЭП-95₁₀₀ и ПМАК степени полимеризации 80 (1), 215 (2) и 1840 (3). $c_{\text{ПЭП-95}} = 4 \times 10^{-4}$ основомоль/л. $T = 20^\circ$.

ное связывание с партнерами за счет водородных связей [15]. Следовательно, поликислоты, состоящие из двухсот звеньев, уже способны взаимодействовать между собой в полиэлектролитном комплексе, армируя его достаточно прочной сеткой водородных связей.

Другим аргументом в пользу рассматриваемого механизма является принципиально иное поведение комплексов, образованных высокомолекулярной ПМАК₁₈₄₀ и ПЭП-95 различной длины (рис. 6). Снижение степени полимеризации поликатиона с 900 (кривая 5) до 100 (кривая 4) не только не приводит к отмене эффекта стабилизации, но и практически не влияет на расположение профиля разрушения комплекса по оси абсцисс. Более того, при переходе к олигомерным положительно заряженным цепям, содержащим 30, 20 и даже 10 звеньев (кривые 3, 2 и 1 соответственно), явление резкого роста устойчивости комплексов сохраняется, хотя уменьшение степени полимеризации сопровождается последовательным сдвигом кривых в кислую область. Этот результат еще раз подчеркивает главенствующую роль поликислот в стабилизации комплекса, которая, по всей вероятности, осуществляется по изложенному выше механизму. Для высокомолекулярного полимера с достаточным количеством неионизованных карбоксильных групп хватает всего не-

скольких положительно заряженных групп у партнера, чтобы связаться с ним и образовать устойчивый комплекс, даже если в нейтральных средах, где поликислота полностью ионизирована, такой комплекс разрушается при введении первых порций соли (рис. 6, кривая 1).

В полном соответствии с этим выводом находятся результаты аналогичных экспериментов, проделанных нами с комплексами высокомолекулярных ПМАК₁₈₄₀ и ПАК₂₃₆₀, в которых партнерами поликислот служили не синтетические поликатионы, а глобулярные белки (рис. 7). Наряду с лизоцимом (pI 11.0) и рибонуклеазой (pI 9.4), отличающимися высокими значениями изоэлектрических точек, в качестве модельного белка использовали иммуноглобулин G с pI 6.5. На поверхности белковых глобул находится сравнительно небольшое количество ионогенных групп, способных к образованию солевых связей с поликислотами. Так, для Lys и RNase, имеющих близкие ММ (14306 и 13682 Да), число таких групп одинаково и равно 19. Подкисление растворов вызывает существенное упрочнение комплексов белок/поликислота, которое и в этом случае происходит в более кислых средах при замене ПМАК (рис. 7а) на ПАК (рис. 7б). Судя по результатам определения степени ионизации поликислот в многослойных пленках, приготовлен-

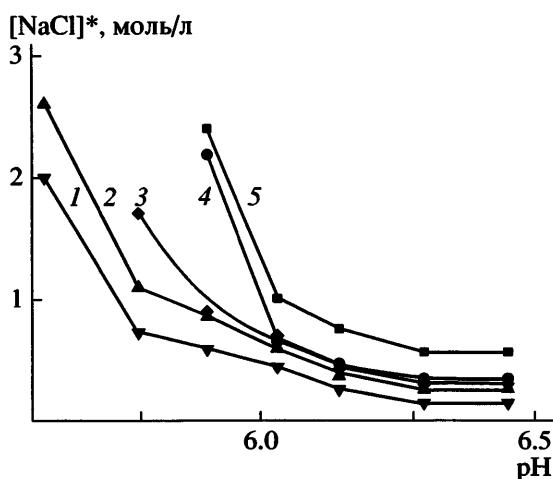


Рис. 6. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПМАК₁₈₄₀ и ПЭП-95 степени полимеризации 10 (1), 20 (2), 30 (3), 100 (4) и 900 (5). $c_{\text{ПМАК}} = 4 \times 10^{-4}$ осново-моль/л. $T = 20^\circ$.

ных из пар, содержащих белки [5], стабилизация белковых комплексов, как и комплексов поликатион/поликислота [4], целиком контролируется этим параметром. Однако для таких систем критическая степень ионизации поликислоты в комплексе оказалась гораздо ниже 50% и не превышала 10–20% для разных пар белок/поликислота. Столь значительное различие в степени ионизации поликислот, стабилизирующих тот или иной комплекс, разумно объяснить разницей в конформациях их партнеров. При одном и том же числе заряженных групп на белковой глобуле и на линейном полиэлектролите количество ионных пар белок/поликислота меньше, чем может реализоваться при взаимодействии гибких комплементарных высокозаряженных цепей. Кроме того, жесткая фиксация ионогенных групп на поверхности белковой глобулы затрудняет образование максимального числа их контактов с цепью. А если принимать во внимание еще и сравнительно невысокое содержание ионогенных групп в белках, становится понятной низкая устойчивость их комплексов в нейтральных средах (рис. 7). Тем не менее даже такого малого числа групп, доступных для взаимодействия с высокомолекулярной поликислотой, оказывается достаточным для образования прочных белок-полиэлектролитных комплексов в слабокислых

средах. Однако, как и в случае олигомерных катионов (рис. 6, кривая 1), для стабилизации столь чувствительных к ионной силе комплексов требуется более плотная сетка водородных связей, которая формируется при более низких значениях pH (рис. 7).

Таким образом, из полученных в работе данных следует, что рассматриваемый эффект стабилизации комплексов носит общий характер, он присущ широкому кругу систем, составленных из пар обычно используемых поликарбоксилатных анионов и их положительно заряженных партнеров. Важно, что этот эффект проявляется в слабокислых и нейтральных средах и полностью обратим. В специальных опытах мы установили, что введение в реакционные смеси раствора щелочи или кислоты практически не влияет на профиль разрушения комплексов.

Оба эти обстоятельства делают поликарбоксилатные комплексы особенно привлекательными для решения прикладных задач молекулярной биологии и биотехнологии. Поскольку включение фермента в НПЭК путем его ковалентного связывания с одним из полиэлектролитов не приводит ни к заметной потере катализитической активности, ни к изменению свойств самого НПЭК [16], можно ожидать, что фермент, иммобилизованный таким образом в комплекс поликарбоксилатного аниона с поликатионом, тоже будет проявлять высокую чувствительность к изменению pH. Более того, если изоэлектрическая точка белка достаточно высокая, трудоемкую стадию его ковалентного связывания с полианионом можно избежать. Простым добавлением раствора поликарбоновой кислоты можно придать такому белку (ферменту) ту же способность обратимо переходить из осадка в раствор в узком интервале изменения pH, причем в условиях, благоприятных для функционирования биополимеров (ферментов, антител, нуклеиновых кислот и т.п.). Ранее [16] мы использовали кооперативность фазовых переходов в растворах НПЭК для создания обратимо растворимых иммобилизованных ферментов, позволяющих осуществлять ферментативную реакцию в растворе, пользуясь всеми преимуществами гомогенного катализа, а затем выводить иммобилизованный фермент из сферы реакции небольшим изменением pH. По всей видимости, в смесях с высокомолекулярным поли-

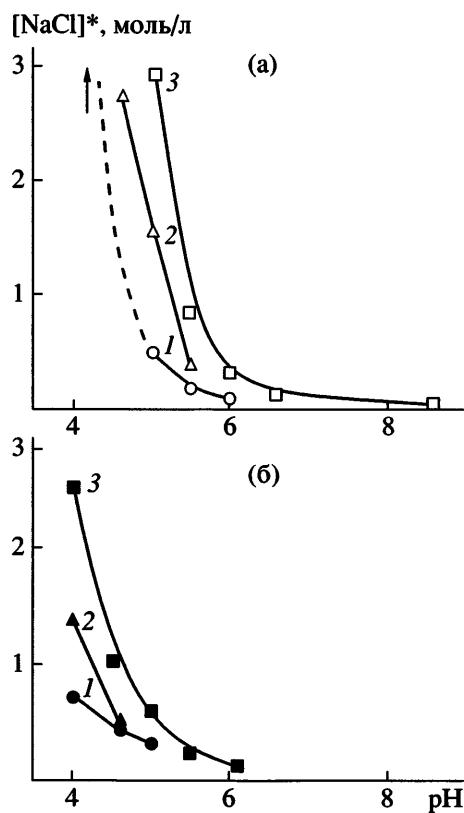


Рис. 7. pH-Зависимость критической концентрации хлористого натрия, соответствующей полному растворению смесей ПМАК₁₈₄₀ (а) или ПАК₂₃₆₀ (б) и глобулярного белка RNase (1), IgG (2) и Lys (3). $c_{\text{ПМАК}} = c_{\text{ПАК}} = 4 \times 10^{-4}$ осново-моль/л. $T = 20^\circ$.

карбоксилатным анионом, в которых фермент может быть использован как сам по себе, так и в виде конъюгата с поликатионом, гомогенный катализ можно проводить в нейтральных или слабо-кислых средах, если концентрация соли достаточно высока. В этом случае отделение иммобилизованного (или химически не связанных) белка от продукта ферментативной реакции легко осуществимо, поскольку фермент можно перевести в осадок незначительным подкислением среды или простым разбавлением реакционной смеси.

Возможность существования поликарбоксилатных комплексов в растворах с высокой ионной силой может быть положена в основу разработки еще одного интересного и важного практического приложения, связанного с выделением нуклеиновых кислот из биологических смесей. Не обладающие способностью к стабилизации комплексов по упомянутому выше механизму,

нуклеиновые кислоты должны терять связавшиеся с ними компоненты (гистоны, белки и т.п.) при достаточно высокой концентрации соли, когда те же компоненты образуют устойчивые комплексы с поликарбоновой кислотой. Подбором pH и ионной силы растворов может быть реализовано наиболее полное отделение целевой нуклеиновой кислоты (например, плазмиды). Результаты предварительных экспериментов по исследованию конкурентных интерполиэлектролитных реакций в таких смесях подтверждают плодотворность этого подхода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
2. Abe K., Koide M., Tsuchida E. // Macromolecules. 1977. V. 10. № 6. P. 1259.
3. Изумрудов В.А., Рыкунова А.И., Синицын А.А. // Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия 1993. Т. 34. С. 405.
4. Izumrudov V.A., Sukhishvili S.A. // Langmuir. 2003. V. 19. № 13. P. 5188.
5. Izumrudov V.A., Kharlampieva E., Sukhishvili S.A. // Biomacromolecules. 2005. V. 6. № 3. P. 1782.
6. Zelikin A.N., Akritskaya N.I., Izumrudov V.A. // Macromol. Chem. Phys. 2001. V. 202. № 15. P. 3018.
7. Starodubtsev S.G., Kirsh Yu.E., Kabanov V.A. // Eur. Polym. J. 1977. V. 10. № 3. P. 739.
8. Izumrudov V.A., Wahlund P.-O., Gustavsson P.-E., Larsson P.-O., Galaev I.Yu. // Langmuir. 2003. V. 19. № 11. P. 4733.
9. Dong J., Ozaki Y., Nakashima K. // Macromolecules. 1997. V. 30. № 4. P. 1111.
10. Tanaka N., Kitano H., Ise N. // Macromolecules. 1991. V. 24. № 10. P. 3017.
11. Мейчик Н.Р., Ермаков И.П. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 5. С. 556.
12. Kawaguchi S., Nishikawa Y., Kitano T., Ito K. // Macromolecules. 1990. V. 23. № 10. P. 2710.
13. Levine H.I., Mark E.H., Fiel R.J. // Arch. Biochem. Biophys. 1977. V. 184. P. 156.
14. Горшкова М.Ю., Лебедева Т.Л., Стоцкая Л.Л. // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 7. С. 1719.
15. Papisov I.M., Litmanovich A.A. // Adv. Polym. Sci. 1989. V. 90. P. 139.
16. Margolin A.L., Sherstyuk S.F., Izumrudov V.A., Svedas V.K., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. № 3. P. 625.

Polyelectrolyte Complexes of Carboxyl-Containing Polyanions: Stabilization in Neutral and Weakly Acidic Media and Factors Affecting This Phenomenon

V. A. Izumrudov

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia
e-mail: izumrud@genebee.msu.su*

Abstract—The stability of insoluble polyelectrolyte complexes formed by various carboxyl-containing polyanions with a positively charged partner—a linear polycation or protein—has been studied by means of turbidimetric titration. In most cases, acidification of the reaction medium leads to a significant strengthening of complexes toward the action of the added salt in neutral or weakly acidic media. The data concerning the effect of the chemical nature of polymer components, the degree of polymerization, the density of charge, and the structure of their chains on the pH-dependent profiles of complex dissociation provide evidence that this effect is related to stabilization of the polyelectrolyte complex through the system of hydrogen bonds formed by carboxyl groups of a partially charged polyanion incorporated into the complex. Owing to a sharp and reversible change in the stability of systems at a pH and ionic strength of solution that are favorable for functioning of biopolymers (proteins, enzymes, antibodies, and nucleic acids), polycarboxylate polyelectrolyte complexes offer promise for solving practically important problems, for example, in biotechnology for separation of biological mixtures.