



УДК 66.081.312:57.088.3

Кинетико-динамические параметры процесса сорбции и основные характеристики композиционного целлосорбента с включенной микродисперсией наноалмазов в качестве сорбирующего материала

Сухова А.А., Меленевский А.Т., Павлова Е.Н.,
Никифорова Е.С., Демин А.А.

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Россия, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 16.06.2013 г.

Аннотация

Синтезированы композиционные сорбенты, сочетающие в себе положительные свойства целлюлозной матрицы и наноалмазов, что позволяет использовать наноалмазы в качестве сорбента-наполнителя и проводить сорбцию белков с высокой эффективностью в режиме колоночной хроматографии. Проведенные исследования позволили определить оптимальное соотношение диацетат целлюлозы-наноалмазы для получения образцов сорбентов с наилучшими кинетико-динамическими характеристиками.

Ключевые слова: сорбент на основе наноалмазов, очистка биологически активных веществ

Composite sorbents were synthesized that combine the positive properties of the cellulose matrix and nano-diamonds. Nano-diamonds can be used as a sorbent-filler and carry out the sorption of proteins with high efficiency in the mode of column chromatography. The research allowed to determine the optimal ratio of cellulose-diacetate/nanodiamonds to obtain samples of sorbents with the best kinetic-dynamic characteristics.

Keywords: nanodiamond-included cellulose matrix composite, purification of Biologically active substances

Введение

Разрабатываемый композиционный сорбент представляет собой инертную целлюлозную матрицу, в которую включены микродисперсии немодифицированных наноалмазов (НА), имеющие на своей поверхности широкий ряд реакционноспособных групп [1]. Целью исследования являлась разработка условий синтеза, позволяющих получить сорбент, на котором возможно проведение колоночного хроматографического процесса в регулярном режиме. Оценка регулярности процесса сорбции проводилась на основе расчета критерия регулярности [2].

Исследования, приведенные в статье, включают данные по изотермам сорбции и кинетическим кривым, рассчитаны средние времена сорбции, коэффициенты диффузии и критерии регулярности для двух образцов.

Изотерма, соответствующая типу изотермы Лэнгмюра [3], описывает процесс, в котором происходит мономолекулярная сорбция, где к одному активному центру присоединяется одна молекула и соседние активные центры не оказывают влияния друг на друга. Чтобы проверить соответствие изотермы типу Лэнгмюра необходимо представить график в обратных координатах, если полученная зависимость будет иметь линейный вид, то данная изотерма – изотерма Лэнгмюра.

В уравнении обобщенной длины колонки (или критерии регулярности) отражается влияние скорости проведения процесса сорбции на форму выходных кривых сорбции и регулярность процесса [2]. В соответствии с формулой (1) при увеличении скорости проведения процесса сорбции в два раза происходит уменьшение критерия регулярности процесса сорбции так же в два раза, т.е. происходит смещение процесса в сторону нерегулярного режима сорбции. Считается, что регулярный режим имеет место при значении критерия регулярности более 1.

$$\lambda = \frac{3 \cdot (1 - \varepsilon) \cdot K_d \cdot \bar{D} \cdot x}{l^2 \cdot v}, \quad (1)$$

где λ – обобщенная длина колонки, ε – доля свободного объема сорбента в колонке, $l=R$ для сферического зерна (R – радиус зерна сорбента, см), K_d – коэффициент распределения, определяемый отношением равновесной концентрации белка в сорбенте к равновесной концентрации белка в растворе, \bar{D} – коэффициент диффузии, см²/с, x – высота слоя сорбента, см; v – скорость течения раствора над слоем сорбента, мл/(с·см²)

Для упрощения расчета \bar{D}/R^2 можно заменить на $\frac{1}{(15 \cdot (1+w) \cdot \bar{t}_1)}$, исходя из формулы для расчета среднего времени сорбции в предположении, что лимитирующей стадией является внутренняя диффузия (2).

Критериальный подход к оценке динамических процессов сорбции был разработан Самсоновым, Елькиным и Меленевским [2]. Эта теория была использована и расширена также другими авторами [4,5,6,7].

Эксперимент

Исследование сорбционных свойств разрабатываемого сорбента проводилась по белкам (в работе представлены данные, полученные для инсулина, но некоторые эксперименты проводились также и для рибонуклеазы). Первоначальное исследование сорбентов состоит в получении выходных кривых сорбции белков, с целью выбора наиболее перспективных образцов для дальнейшей работы. Известно, что S-образная форма выходной кривой сорбции свидетельствует о близости к регулярному режиму сорбции.

Необходимо отметить, что все образцы, с которыми в настоящее время ведется работа, получены на основе переосажденного диацетата целлюлозы (ДАЦ). Несмотря на удорожание и трудоемкость такого метода, полученные таким образом образцы сорбента обладают лучшими характеристиками по сравнению с аналогичными, но на основе промышленного сырья.

Сорбцию инсулина проводили при концентрации белка в исходном растворе 1 мг/мл из ацетатного буферного раствора с рН=2,5. Стандартная скорость проведения сорбции была выбрана равной 33 мл/(час·см²). Измерение оптической плотности проводили спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Выходные кривые сорбции представлены в безразмерных координатах, где по оси ординат отложено отношение концентрации белка в пробе к исходной концентрации, а по оси абсцисс отложено отношение разности суммарного объема фракций и доли свободного объема к объему сорбента в мл.

Определение полной обменной емкости (ПОЕ) по Na⁺ проводилось путем титрования образцов. Для этого определенный объем сорбента помещался на ночь в пробирку с 0,1 н фиксанальной NaOH, на следующий день проводилась оттитровка аликвоты 0,1 н H₂SO₄.

Построение изотерм сорбции осуществлено путем проведения экспериментов по сорбции белка в статических условиях (опыты проведены для концентраций белка от 0,2 до 15 мг/мл). При этом по оси абсцисс отложена равновесная концентрация вещества в растворе, а по оси ординат соответствующая ей равновесная концентрация вещества в сорбенте.

По методике подробно изложенной в работе [2] были определены средние времена сорбции и рассчитаны коэффициенты диффузии для двух образцов. Кинетические кривые построены в координатах $F=f(t)$, где F – степень завершенности процесса, а t – время контакта сорбента с раствором белка. Для определения среднего времени сорбции высчитывалась площадь над кинетической кривой.

$$F = Q_t / Q_\infty \quad (2)$$

где F – степень завершенности процесса сорбции; Q_t , Q_∞ – количества сорбтива, поглощенные ионитом к моменту времени t от начала процесса и в состоянии равновесия соответственно.

Далее, в предположении, что лимитирующей стадией сорбции является внутренняя диффузия, была использована соответствующая формула для нахождения коэффициента диффузии:

$$\bar{D} = \frac{R^2}{15(1+w)t_1}, \quad (3)$$

где \bar{D} – коэффициент диффузии, см²/с, R – радиус зерна сорбента, см; t_1 – среднее время сорбции, с; $w = \bar{V}c/Vc$ – параметр ограниченности раствора; \bar{V} , V – объемы сорбента и раствора соответственно, \bar{c} , c – концентрации в состоянии равновесия в сорбенте и растворе соответственно.

Изучение кинетики проводили методом ограниченного объема. Для этого брали имеющийся объем, уравновешенного ацетатным буферным раствором с рН=2,5, сорбента и приливали определенный объем раствора инсулина в ацетатном буферном растворе с рН=2,5 и концентрацией инсулина 1 мг/мл. Перемешивание вели в течение суток. Через определенные промежутки времени отбирали пробы раствора белка, определяли оптическую плотность и рассчитывали среднее время сорбции и величину коэффициента диффузии, также были построены выходные кривые сорбции при разных скоростях.

Обсуждение результатов

Был получен ряд образцов с одинаковыми параметрами синтеза за исключением загрузки НА. Соотношения ДАЦ:НА для этого ряда находятся в диапазоне от 1:2X до 1:0,25X (рис. 1), где X - некое стандартное количество НА.

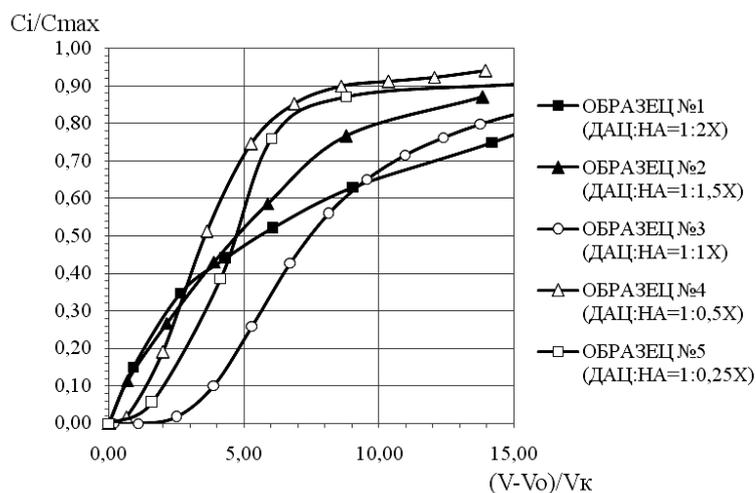


Рис. 1. Выходные кривые сорбции инсулина на образцах композиционного сорбента, синтезированных на основе очищенного ДАЦ, с соотношением ДАЦ:НА от 1:2X до 1:0

Из рис. 1 видно, что выходные кривые сорбции характеризуются все более выраженной S-образной формой кривой симбатно с уменьшением загрузки наноалмазов в синтезе.

Проведены расчет сорбционной обменной емкости (СОЕ) образцов по инсулину и титрование этих образцов с целью получения данных о ПОЕ (табл. 1).

Таблица 1. Емкости образцов по инсулину и ПОЕ по Na^+

Образец №	Соотношение ДАЦ:НА	ПОЕ, мг-экв/мл	СОЕ по белку не менее, мг/мл
1	1:2X	0.2	8
2	1:1.5X	0.25	6
3	1:1X	0.2	9
4	1:0.5X	0.15	5
5	1:0.25X	0.15	5

Из представленных образцов наибольший интерес представляет образец №3, характеризующийся S-образной выходной кривой сорбции и самой высокой в этом ряду емкостью по инсулину. В то же время следует изучить один из образцов с минимальной загрузкой НА (образец №4 или 5), т.к. эти образцы также характеризуются S-образными выходными кривыми сорбции, причем с более резким подъемом, чем у образца №3. Также происходит быстрое насыщение этих образцов до 90-95%. Тем не менее, необходимо отметить, что их емкость по белку значительно ниже, чем у образца №3.

Несимбатное изменение ПОЕ, а также емкости по белку в зависимости от загрузки НА может быть связано с особенностью структуры сорбента. Возможно, что при увеличении загрузки НА в процессе синтеза формируются более плотные микродисперсии НА, а при малых загрузках – напротив, более рыхлые структуры

включений. Тогда число доступных центров для взаимодействия с малым ионом может оказаться примерно одинаковым для рыхлой структуры (малые загрузки НА) и более плотной (большие загрузки НА). Для плотных структур сорбция, вероятно, идет только в поверхностных слоях; а для более рыхлых – часть белка, по всей видимости, может проникать внутрь включений.

Для дальнейшей работы были выбраны два образца с соотношениями ДАЦ:НА=1:1X и 1:0,5X.

Построены изотермы сорбции и кинетические кривые для получения данных о критерии регулярности и коэффициенте диффузии.

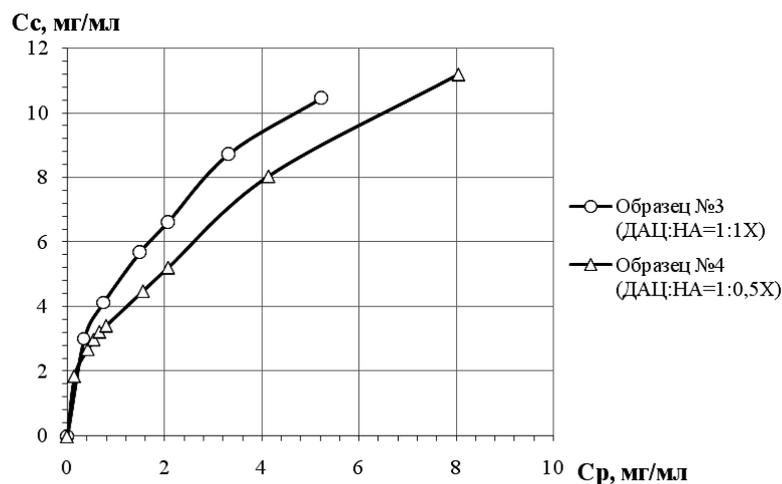


Рис. 2. Изотермы сорбции для образцов №3 и №4

Для проверки соответствия полученных изотерм форме изотермы Лэнгмюра на рис. 3 представлены изотермы в обратных координатах.

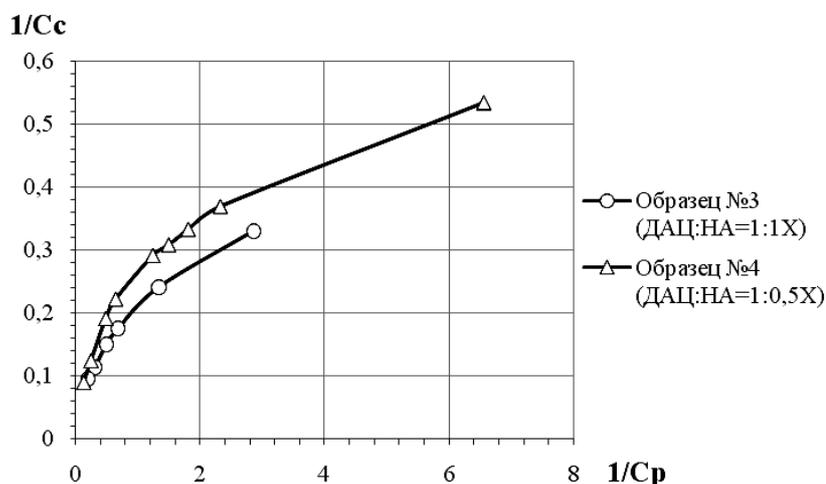


Рис. 3. Изотермы сорбции для образцов №3 и №4 в обратных координатах

Установлено, что полученные изотермы не соответствуют форме изотерм Лэнгмюра. Вероятно, это связано со сложным механизмом сорбции белковых молекул на данном типе сорбента. Вместе с тем из рис. 2 видно, что выхода на плато не происходит даже при высоких концентрациях белка в растворе (до 15 мг/мл в исходном растворе), следовательно, данный тип сорбентов может работать достаточно эффективно и при высоких концентрациях белка в растворе.

Динамические эксперименты проводились до достижения степени насыщения сорбента порядка 80-90% от максимальной, при этом время эксперимента не превышало 100 мин для всех образцов сорбентов.

Кинетические кривые для двух образцов представлены на рис.4.

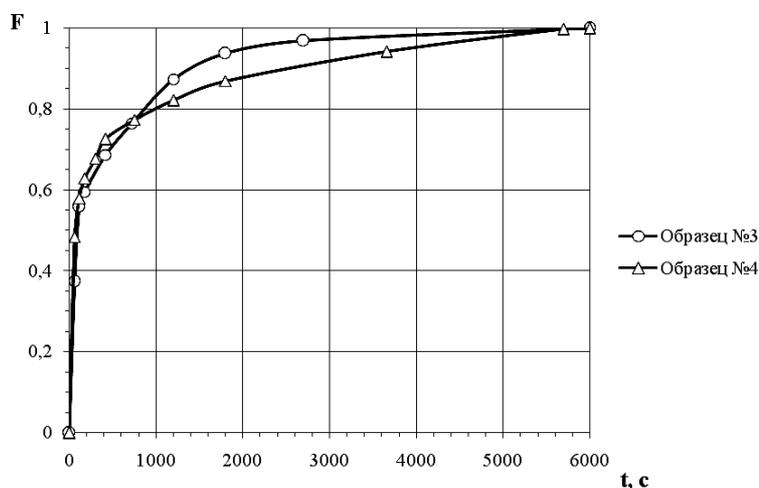


Рис. 4. Кинетические кривые сорбции инсулина на образцах композиционного целлосорбента

Величина степени завершенности процесса сорбции для образцов №3 и №4 рассчитывалась как отношение концентрации белка в пробе в момент времени t к конечной концентрации при $t = 100$ мин.

Предполагая, что лимитирующей стадией сорбции является внутренняя диффузия, по первому моменту кинетической кривой было определено среднее время сорбции и рассчитан коэффициент диффузии по формуле (4).

Установлено, что для приведенных образцов вне зависимости от загрузки в синтезе НА средние времена сорбции соизмеримы. Расчетные данные указывают на близость коэффициентов диффузии (табл.2).

Таблица 2. Таблица средних времен сорбции и коэффициентов диффузии образцов №3, 4.

Образец №	Соотношение ДАЦ:НА	Среднее время сорбции, с	Коэффициент диффузии, $\text{см}^2/\text{с}$
3	1:1X	500	$7.1 \cdot 10^{-9}$
4	1:0.5X	680	$6.9 \cdot 10^{-9}$

Для образцов №3 и №4 зависимость формы выходной кривой сорбции от скорости проведения процесса сорбции представлена на рис. 5, 6.

Из рис. 5 видно, что выходные кривые, полученные при скорости 33 и 16,5 $\text{мл}/(\text{час} \cdot \text{см}^2)$ характеризуются режимом сорбции близком к регулярному. Известно, что при регулярном режиме сорбции выходные кривые имеют S-образный вид и начальное плато сорбции.

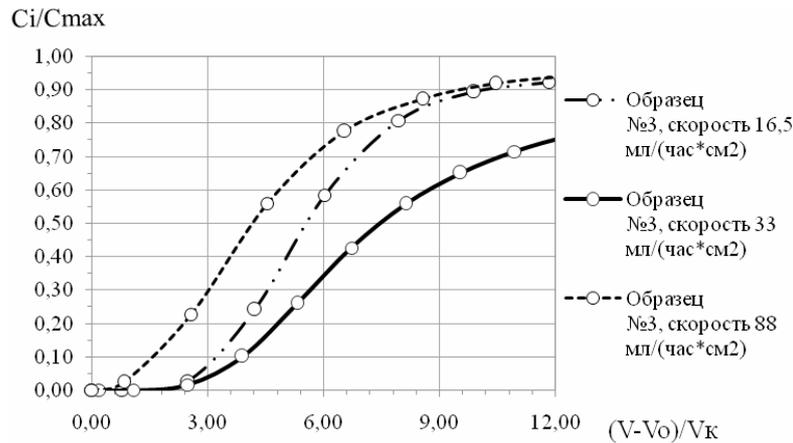


Рис. 5. Выходные кривые сорбции инсулина на образце композиционного сорбента с соотношением ДАЦ:НА=1:1X при разных скоростях

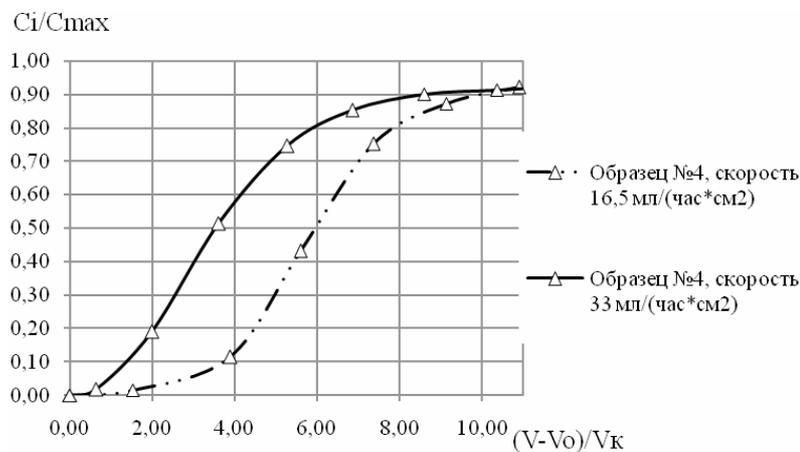


Рис. 6. Выходные кривые сорбции инсулина на образце композиционного сорбента с соотношением ДАЦ:НА=1:0,5X при разных скоростях

Из рисунка 6 видно, что выходная кривая сорбции инсулина, полученная при скорости $16,5 \text{ мл}/(\text{час}\cdot\text{см}^2)$ характеризуется большей S-образностью и имеет более длинное плато сорбции на начальном участке.

Для оценки регулярности процесса сорбции был использован критерий регулярности. Расчет проводился по формуле (1), полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Значения критериев регулярности для образцов, полученных при стандартных условиях синтеза, с соотношениями ДАЦ:НА=1:1X и 1:0,5X соответственно для образцов №3 и №4

Образец №	Критерий регулярности процесса сорбции рассчитанный	
	по начальному участку изтермы сорбции	по Kd при концентрации белка в исходном растворе 1 мг/мл
3	0.60	0.33
4	0.95	0.32

Так как работы по сорбции белка в динамических условиях проводились при концентрации белка в исходном растворе 1 мг/мл, то можно предположить, что при

сорбции в заданных условиях значения критерия регулярности находятся для образца №3 в пределах от 0,33-0,6, для образца №4 от 0,32-0,95.

Заключение

Полученные образцы с соотношениями ДАЦ:НА=1:1X и 1:0,5X обладают удовлетворительными характеристиками для работы с белками. При этом образец с соотношением ДАЦ:НА=1:1X имеет СОЕ по инсулину порядка 9 мг/мл сорбента. Коэффициенты диффузии этих образцов рассчитанные в предположении, что лимитирующей стадией сорбции является внутренняя диффузия, имеют порядок $10^8 \div 10^9$.

Список литературы

1. Чиганова Г.А. Исследование поверхностных свойств ультрадисперсных алмазов // Коллоидный журнал. 1994. Т. 56. №2. С. 266-268.
2. Самсонов Г.В., Меленевский А.Т. Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии. Л.: Наука. 1986. 229 с.
3. Карнаухов А.П. Адсорбция. Текстура дисперсных и пористых материалов. Новосибирск: Наука. Сиб. предприятие РАН. 1999. 470 с.
4. Глазова Н.В., Новикова С.А. Оптимизация процесса сорбции ДНК-азы и Цитохрома С из их смеси // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т.11. Вып. 6. С.820-827.
5. Лебедев Ю.Я. Групповая система режимов неравновесной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т.10. Вып. 2. С.293-313.
6. Лебедев Ю.Я. Критерии реализации режимов движения хроматографической зоны для случая внутридиффузионной кинетики межфазного массообмена // Журнал физической химии. 1993. Т.67. №9. С.1915-1917.
7. Лебедев Ю.Я. Теория хроматографии медленно диффундирующих веществ. Типы режимов // Журнал физической химии. – 1995. Т.69. №6. С.1080-1084.

Демин Александр Александрович – Зав. лабораторией, ст. науч. сотр., д.х.н., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Сухова Арина Анатольевна - инженер-исследователь, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН Санкт-Петербург

Меленевский Александр Тарасович – ст. науч. сотр., к.х.н., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Павлова Екатерина Николаевна - Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН Младший научный сотрудник Санкт-Петербург

Никифорова Елена Сергеевна - науч. сотрудник Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Demin Alexander A. - Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Sukhova Arina A. - Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Melenevsky Alexander T. - Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Pavlova Ekaterina N. - Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Nikiforova Elena S. - Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg