



УДК 541.183

Кинетические особенности сорбции соединений гликозидной и пептидной структуры на сверхсшитом сорбенте MN-200

Шкутина И.В.¹, Мироненко Н.В.², Стоянова О.Ф.², Селеменев В.Ф.²¹ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург²ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 21.09.2015 г.

На примере полученных кинетических кривых тритерпенового сапонина и α -амилазы рассмотрены закономерности сорбции указанных веществ на сверхсшитом сорбенте MN-200. Показано, что определяющую роль при этом играют межмолекулярные взаимодействия, характер и сила которых преимущественно зависят от наличия и стехиометрии определенных функциональных групп сорбатов. Рассчитаны значения эффективных коэффициентов диффузии для сапонина и α -амилазы.

Ключевые слова: сапонин, альфа-амилаза, сорбция, Н-связи, коэффициент диффузии

Kinetic peculiarities of sorption of compounds of glucoside and peptid structure on hypercrosslinked sorbent MN-200

Shkutina I.V.¹, Mironenko N.V.², Stoyanova O.F.², Selemenev V.F.²¹State chemical- pharmaceutical academy, St. Petersburg²Voronezh State University, Voronezh

Comparative assessment of the sorption capacity of macroporous polymer hydrophobic structure with respect to the compounds of the triterpenic (saponin) and protein nature (amylase) was carried out. The influence of the structural features of these substances in their sorption characteristics was examined. It is shown that the decisive role in the formation of such macromolecular structures is played by intermolecular interactions, the nature and strength of which depends on the presence of functional groups, and the stoichiometry of the sorbates. With the help of graphical method the limiting stage of sorption saponin and amylase on the sorbent MN-200 is set. The diffusion coefficients of the compounds, the order of which is $10^{-8} \text{ cm}^2 / \text{s}$, which corresponds to the diffusion coefficient of adsorbed organic molecules cited in the literature are counted.

Keywords: saponin, α -amylase, sorption, H-bond, the diffusion coefficient

Введение

Многочисленные исследования биологической активности, фармакологического действия широкого спектра природных соединений определили одну из наиболее сложных задач в области химии – получение их как путем синтеза, так и классическими методами выделения из растительного материала.

Сосуществование в образцах препаратов близких по структуре и свойствам индивидуальных веществ значительно затрудняет дальнейший анализ и формирует отдельный необходимый этап очистки их от побочных примесей. Традиционные экстракционные методы потеряли свою значимость и эффективность при работе с микроколичествами смесей органических соединений, отличающихся друг от друга наличием или отсутствием определенных единичных функциональных групп.

Сорбционные методы позволяют провести более глубокую и тонкую очистку исследуемых веществ. Однако в настоящее время такие способы требуют теоретического обоснования процесса сорбции для рационального выбора сорбента, подходящего определенному соединению или классу веществ. Для раскрытия механизмов взаимодействия сорбент-сорбат необходимо изучать как сорбцию одного соединения на различных сорбентах, так и наоборот [1-3].

В настоящей работе предпринята попытка обобщить имеющиеся экспериментальные данные по взаимодействию соединений тритерпеновой (сапонина) и белковой природы (амилазы) с макропористым сорбентом гидрофобной структуры с целью исследования влияния структурных особенностей данных веществ на их сорбционные характеристики. Можно предположить, что определяющую роль в формировании подобных высокомолекулярных структур играют межмолекулярные взаимодействия, характер и сила которых зависят от наличия и стехиометрии функциональных групп сорбатов. Первым этапом данного исследования является изучение кинетических особенностей сорбции, позволяющих с течением времени определить характер образующихся структур «сорбент-сорбат».

Эксперимент

В качестве объектов исследования в работе использовали тритерпеновый сапонин («Вектон») и α -амилазу *Aspergillus awamori* («Диаэм»). Молекула сапонина состоит из углеводной части и агликона, связанных гликозидной связью. Агликон сапонина представляет собой пентациклический терпеноид, относящийся к типу β -амирина, в основе которого лежит углеродный скелет олеана. α -амилаза *Aspergillusawamori* (α -1.4-глюкан-4-глюканогидролаза, К.Ф. 3.2.1.1) - водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина. Фермент гидролизует крахмал и гликоген до декстринов, мальтозы и глюкозы, являясь эндоамилазой, вызывающей расщепление гликозидных связей внутри высокополимеризованного субстрата. Амилаза относится к слабокислотным белкам, 25% массы которой составляют аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты, также в достаточно большом количестве содержит остатки гистидина, тирозина, триптофана (табл. 1) [4].

Таблица 1. Характеристики тритерпенового сапонина и α -амилазы

Характеристика	сапонин	α –амилаза
Молекулярная масса	2000 г/моль	45000 Да
Изоэлектрическая точка, рН	4.8-5.0	4.7-5.0
Растворимость, г/100 мл H ₂ O	40	0.3 -3.5 (в зависимости от рН среды)
Критическая концентрация мицеллообразования (диапазон), ммоль/дм ³	0.6-0.8	-

В качестве сорбента выступал сверхсшитый полимер MN-200 из класса «Стиросорб» (табл. 2). Хотя полимерная матрица сорбента MN-200 гидрофобна, в его составе содержится относительно большое количество кислорода, порядка 5-6 масс. %, который может находиться в виде кетонов, эфиров или спиртов. Кроме того, MN-200 содержит около 1% хлора в виде хлорметильных групп, образовавшихся в результате побочных процессов гидролиза или окисления.

Для подготовки сорбента к работе проводили его фракционирование, в эксперименте использовали фракцию 0.5-1.0 мм. Навески сорбента заливали ацетоном и выдерживали до набухания 1 час. Набухший сорбент отмывали от ацетона дистиллированной водой до его полного отсутствия в промывных водах. Контроль содержания ацетона в растворе вели спектрофотометрически при $\lambda=211$ нм. Подготовленный сорбент хранили под слоем воды в набухом состоянии.

Таблица 2. Характеристики полимерного сорбента MN-200

Удельная поверхность, m^2/g	800-1000
Удельный объем, мл/г	1-1.1
d микропоры, Å	15
d мезо и макропоры, Å	850-950
Влажность, %	30-36

Кинетические кривые сорбции снимали методом ограниченного объема. Для этого навески сорбента массой 1.0 г помещали в конические колбы с притертой пробкой объемом 1000 мл и заливали соответственно раствором сапонины и α -амилазы с различными концентрациями. Контакт осуществляли в режиме непрерывного перемешивания. На анализ отбирали пробы каждого из растворов через определенные промежутки времени от начала опыта. Концентрации веществ определяли спектрофотометрически: сапонины по методике, описанной ранее [5], α -амилазы по методу Лоури. Процесс считался завершенным, если с течением времени содержание вещества в растворе не изменялось. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0.05.

Для получения ИК-спектров образцы препаратов сапонины и амилазы высушивали до постоянной массы при 50-60°C и запрессовывали с KBr (соотношение 1:100). ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Bruker VERTEX-70 в интервале частот 400-4000 cm^{-1} .

Обсуждение результатов

В работах [6-8] неоднократно было отмечено, что сверхсшитые полистиролы более эффективны для концентрирования органических веществ, чем полимерные сорбенты других классов. Поэтому особый интерес представляет изучение кинетики сорбции на сорбентах данного класса, в частности, - MN-200. На рис. 1 представлены кинетические кривые сорбции сапонины и α -амилазы. Обе кривые характеризуются только одним перегибом, выходящим на плато через 30 минут для сапонины, через 80 минут – для амилазы.

На скорость формирования мономолекулярного слоя большое влияние оказывает молекулярная масса и структура сорбата. Гликозидное строение сапонины позволяет практически беспрепятственно сформировать дисперсионные взаимодействия между агликоном (системой конденсированных колец) – олеаноловой кислотой и бензольными кольцами полимерного сорбента. Подобный

тип взаимодействия с анионообменниками уже рассматривался авторами данной статьи в [9].

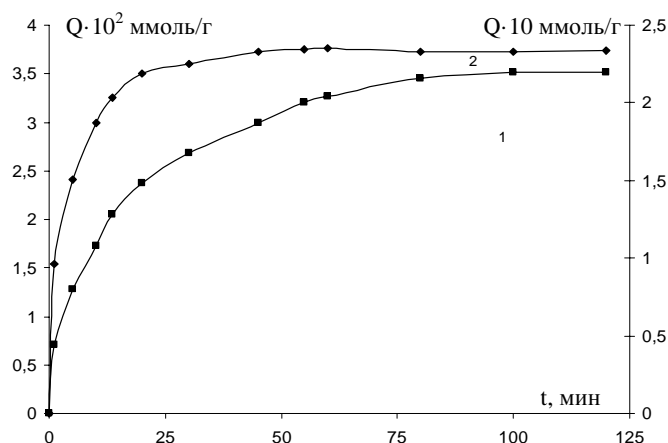


Рис. 1. Кинетическая кривая сорбции α-амилазы (1) и сапонина (2) на полимерном сорбенте MN-200.

При сорбции α-амилазы можно предположить формирование аналогичных связей между гетероциклами гистидина, триптофана, бензольным кольцом тирозина и бензольными кольцами сорбента. Однако с учетом сложности структуры и конформации молекулы α-амилазы скорость образования и сила подобных связей значительно ниже. Таким образом, высокая удельная поверхность данного сорбента обуславливает возможность проявления π-π-электронного взаимодействия между сорбируемым соединением и матрицей сорбента. ИК – спектры образцов сорбента, насыщенного сапонином, и сорбента, насыщенного α-амилазой, показали увеличение полосы поглощения в области 2890-2870 см⁻¹, свидетельствующее об образовании дисперсионных связей с участием СН- и СН₂-групп сорбента как сапонина, так и амилазы [10]. Известно, что сорбент MN-200 может сорбировать вещества также и по ионообменному механизму. Анионообменные свойства сорбента MN-200 связаны с наличием карбонильных групп на его поверхности. Причем как в случае сорбции сапонина, так и α-амилазы ионообменный характер сорбции обусловлен наличием карбоксильных групп в структуре агликона и аминокислот, входящих в состав фермента, соответственно. Но поскольку доля ионного обмена мала, по сравнению с необменным поглощением, в настоящей работе она не рассматривается.

При контакте сапонина с концентрацией в растворе 1-3 ммоль/дм³ с сорбентом сорбция возрастает за счет взаимодействий типа сорбат-сорбат, при этом происходит перестройка сорбированных молекул и реализация супрамолекулярных комплексов (рис. 2, а). Сорбция приобретает кооперативный характер за счет полифункциональных взаимодействий рядом расположенных молекул, и происходит постепенная модификация поверхности сорбента, которая становится более гидрофильной. Поверхностная активность сапонина позволяет реализовать слоистое расположение его на поверхности MN-200 (второй перегиб на кинетической кривой). При связывании α-амилазы с сорбентом ход кривых сорбции из растворов различных концентраций имеет одинаковый характер (рис. 2, б). Третичная структура амилазы в ходе сорбции на MN-200 упрочняется, и сорбент выступает в роли дополнительной ее сшивки, препятствуя деформационному разворачиванию

белковой макромолекулы. Таким образом, структура образующихся комплексов в случае сапонина определяется геометрией сорбента, в случае α -амилазы-третичной структурой сорбата.

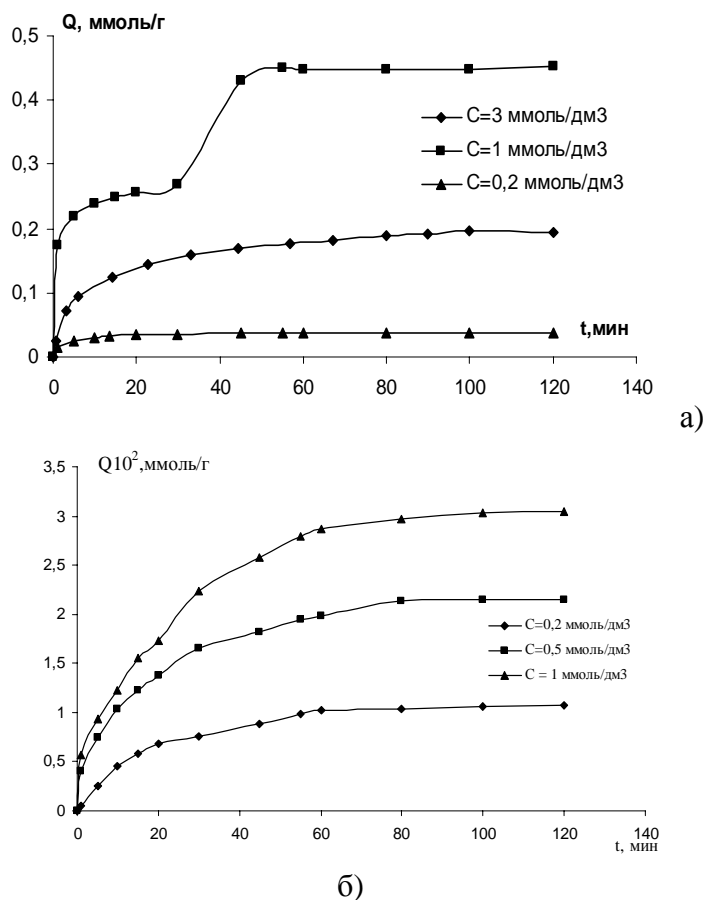


Рис. 2. Кинетические кривые сорбции сапонина (а) и α -амилазы (б) на полимерном сорбенте MN-200 из растворов различных концентраций.

В работе [11] предполагается, что при взаимодействии сверхсшитого полимера с физиологически активными веществами принимают участие пограничные слои воды. Взаимодействия сорбент – вода и сорбат – вода являются процессами, с одной стороны конкурирующими с процессом взаимодействия сорбент – сорбат, с другой – позволяющими формировать водородные связи в данной системе. Вода может образовывать водородные связи как с гидрофильными группами $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ сорбатов, так и с карбонильными группами стиролдивинилбензольного каркаса MN-200. Были исследованы инфракрасные спектры образцов Стиросорба, сапонина и амилазы, а также спектры после взаимодействия сорбента с сорбатами. Сопоставляя частоты колебаний, принадлежащие определенным пространственным конфигурациям воды [12], можно отметить, что адсорбция веществ сопровождается изменением структуры гидратной воды.

Полосы поглощения, отвечающие частично (3307 см^{-1}) и полностью ассоциированной воде (3400 см^{-1}) в спектрах сорбированных веществ, смещены в сторону меньших частот колебаний ($3290\text{-}3285 \text{ см}^{-1}$) и ($3374\text{-}3390 \text{ см}^{-1}$), соответственно, по сравнению со спектрами индивидуальных веществ. Причем интенсивности полос поглощения воды уменьшаются с ростом количества связанного вещества. Данный факт может свидетельствовать об усилении

взаимодействий в системе сорбент-сорбат и подтверждает участие воды в процессе сорбции. Исключение растворителя из области связывания сорбент-сорбат приводит к увеличению количества центров адсорбции.

Судить о механизме кинетического процесса очень сложно, так как он определяется многими факторами. Среди них – тип адсорбента, степень его сшитости, пористость, набухаемость, температура, реакция среды и т.д. [13]. В то же время, вопросу установления механизма уделяется много внимания в связи с тем, что правильное определение его позволяет интенсифицировать процесс сорбции исключением одной из конкурирующих диффузионных стадий. Появляется возможность теоретически обоснованно выбрать сорбент с требуемыми физико-химическими свойствами (емкостью, пористостью, размером зерна и т.д.). Лимитирующая стадия в кинетике сорбции может меняться при изменении внешних условий, поэтому, учитывая сложный характер процесса сорбции, ее определение возможно только на начальных стадиях процесса [13]. В данной работе представление экспериментальных данных в виде зависимости $F - \sqrt{t}$ и $-\ln(1-F) - t$ позволяет сделать предварительную оценку стадии лимитирования, для подтверждения которой необходимы дополнительные экспериментальные данные.

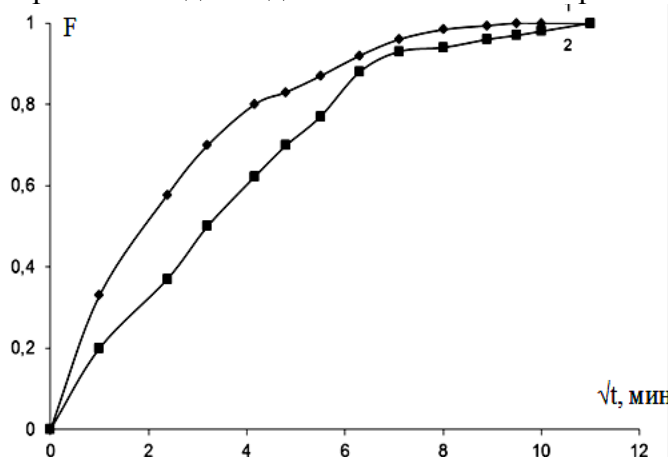


Рис. 3. Зависимость степени заполнения F от \sqrt{t} при сорбции сапонины (1) и α -амилазы (2) на MN-200.

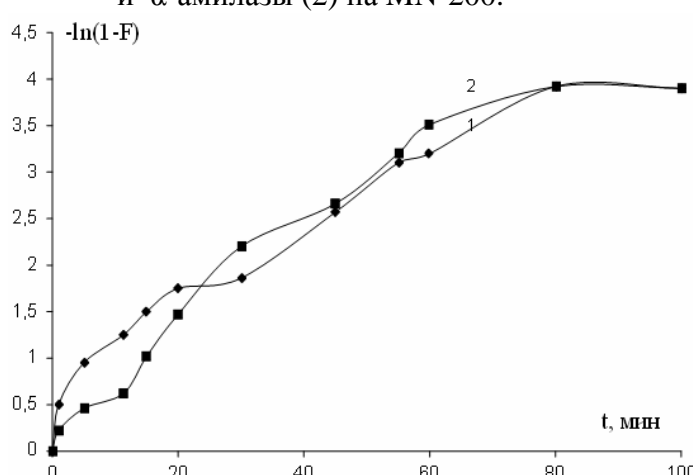


Рис. 4. Логарифмическая зависимость степени заполнения сорбента от времени при сорбции сапонины (1) и α -амилазы (2) на MN-200.

Графическое определение лимитирующей стадии по форме кривых, представленных в функциональных координатах $F - \sqrt{t}$ и $-\ln(1-F) - t$, позволило

отметить линейную зависимость $F - \sqrt{t}$ при малых значениях F и нелинейную зависимость кривой в координатах $-\ln(1-F) - t$, что позволяет сделать вывод о лимитирующей стадии внутренней диффузии (рис. 2-3).

По формулам, предложенным Знаменским [14], были рассчитаны эффективные коэффициенты диффузии сапонина в фазе сорбента MN-200.

$$D = -\frac{2 \cdot R^2 \cdot F \cdot \lg(1-F)}{\pi^2 \cdot t},$$

где F - доля ионов в сорбенте к моменту времени t , сек; r -радиус частиц полимера, см; D - коэффициент диффузии сорбированного иона, $\text{см}^2/\text{с}$.

Результаты зависимости коэффициентов диффузии от степени завершенности процесса представлены на рис. 5. Порядок величин полученных коэффициентов диффузии составляет $10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$, что соответствует величинам коэффициентов диффузии сорбированных органических молекул, приводимых в литературе [15-16]. Уменьшение величины коэффициента диффузии, вероятно, связано со снижением проницаемости полимера по мере его заполнения сорбируемым веществом из-за сжатия зерна и уменьшения размеров ячеек матрицы. Причиной уменьшения коэффициента также может быть более сильное взаимодействие сорбированных частиц с сорбентом за счет образования дополнительных связей.

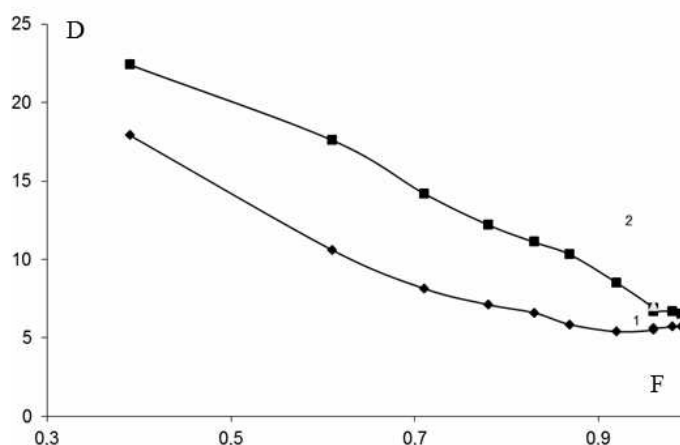


Рис. 5. Зависимости коэффициентов диффузии D от степени завершенности процесса F при сорбции сапонина (1) и α -амилазы (2) на MN-200.

D – коэффициент диффузии, $10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенных исследований выявлена высокая сорбционная способность полимера MN-200 по отношению к сапонину и α -амилазе. Полученные результаты могут быть использованы для разработки сорбционных и хроматографических методов выделения, концентрирования данных веществ и веществ подобной структуры.

Список литературы

1. Самсонов Г.В., Меленевский А.Т. физико-химической биотехнологии. Сорбционные и хроматографические методы Ленинград, Наука, 1986, 229 с.

2. Филиппов О.А., Тихомирова Т.И., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. // *Журн. аналитической химии*. 2003. Т. 58, № 5. С. 454-479.
3. Писарев О.А., Кручина-Богданов И.В., Глазова Н.В., Быченкова О.В. // *Журн. физической химии*. 1999. Т. 73, № 9. С.1634-1637.
4. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. Воронеж: Изд-во Воронеж. у-та, 2001, 184 с.
5. Мироненко Н.В., Брежнева Т.А., Селеменев В.Ф. // *Химия растительного сырья*. 2011. № 3. С.153-157.
6. Tsyurupa M.P., Davankov V.A. // *Reactive and Functional Polymers*. 2002. Vol. 53. pp. 193 -203.
7. Проскурина Н.А. Автореф. канд. хим. наук. Москва, 2009, 23 с.
8. Шкутина И.В. и др. // *Химико-фармацевтический журнал*. 2009. Т. 43. № 9. С.50-52.
9. Мироненко Н.В., Михина И.В., Брежнева Т.А., Селеменев В.Ф. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2008. Т. 8. Вып. 3. С. 513-520.
10. Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971, 264 с.
11. Орос Г.Ю. и др. // *Журнал физической химии*. 1998. Т. 72. № 8. С. 1461-1463.
12. Юхневич Г.В. Инфракрасная спектроскопия воды. М.: Наука. 1973. 208 с.
13. Тошевилов В.П., Тошевилова А.Ю., Писарев О.А. // *Журнал физической химии*. 2006. Т. 80. № 2. С. 303-307.
14. Знаменский Ю.П., Бычков Н.В. Кинетика ионообменных процессов. Обнинск: Принтер, 2000, 204 с.
15. Кокотов Ю.А., Пасечник В.А. Равновесие и кинетика ионного обмена. Л.: Химия, 1970, 336 с.
16. Самсонов Г.В., Тростянская Е.Б., Елькин Г.Э. Ионный обмен. Сорбция органических веществ. Л.: Наука. 1969. 335 с.

References

1. Samsonov G.V., Melenevskij A.T., Sorbcionnye i hromatograficheskie metody fiziko-himicheskoj biotekhnologii, Leningrad, Nauka, 1986, 229 p.
2. Filippov O.A., Tihomirova T.I., Cizin G.I., Zolotov Yu.A., *Zhurn. Analiticheskoy himii*, 2003, Vol. 58, No 5. pp. 454-479.
3. Pisarev O.A., Kruchina-Bogdanov I.V., Glazova N.V., Bychenkova O.V., *Zhurn. Fizicheskoy himii*, 1999, Vol. 73, No 9. pp. 1634-1637.
4. Korneeva O.S. Karbogidrazy: preparativnoe poluchenie, struktura i mehanizm dejstva na oligo- i polisaharidy. Voronezh: Izd-vo Voronezh. u-ta, 2001, 184 p.
5. Mironenko N.V., Brezhneva T.A., Selemenev V.F., *Himija rastitel'nogo syr'ja*, 2011, No 3, pp. 153-157.
6. Tsyurupa M.P., Davankov V.A., *Reactive and Functional Polymers*, 2002, Vol. 53, pp. 193 -203.
7. Proskurina N.A. Avtoref. kand. him. nauk. Moskva, 2009, 23 p.
8. Shkutina I.V. et al., *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*, 2009, Vol. 43, No 9, pp. 50-52.
9. Mironenko N.V., Mihina I.V., Brezhneva T.A., Selemenev V.F., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2008, Vol. 8, No 3, pp. 513-520.
10. Kazicyna L.A., Kupletskaja N.B., Primenenie UF-, IK- i ЯMR-spektroskopii v organicheskoy himii, M.: Vysshajashkola, 1971, 264 p.
11. Oros G.Yu. et al., *Zhurnal fizicheskoy himii*, 1998, Vol. 72, No 8, pp. 1461-1463.
12. Juhnevich G.V., Infrakrasnaja spektroskopija vody, M.: Nauka, 1973, 208 p.
13. Toshhevnikov V.P., Toshhevnikova A.Ju., Pisarev O.A., *Zhurnal fizicheskoy himii*, 2006, Vol. 80, No 2, pp. 303-307.
14. Znamenskij Yu.P., Bychkov N.V. Kinetika ionoobmennyh processov. Obninsk: Printer, 2000, 204 p.
15. Kokotov Yu.A., Pasechnik V.A. Ravnovesie i kinetika ionnogo obmena, L.: Himija, 1970, 336 p.
16. Samsonov G.V., Trostjanskaja E.B., El'kin G.Je. Ionnyj obmen. Sorbcija organicheskikh veshhestv. L.: Nauka, 1969, 335p.

Шкутина Ирина Викторовна - к.б.н., старший преподаватель кафедры аналитической химии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, г. Санкт-Петербург;

Мироненко Наталья Владимировна - ассистент кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Стоянова Ольга Федоровна - к.х.н., доцент кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Селеменев Владимир Федорович - д.х.н., проф., зав. кафедрой аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Shkutina Irina V. - lecturer of analytical chemistry of State chemical-pharmaceutical academy, St. Petersburg

Mironenko Natalia V. - assistant of analytical chemistry department of chemical faculty Voronezh State University, *e-mail:* natashamir@yandex.ru

Stoyanova Olga F. - lecturer of analytical chemistry, department of chemical faculty Voronezh State University.

Selemenev Vladimir F. - the professor, head of analytical chemistry department of chemical faculty Voronezh State University.