

ВЛИЯНИЕ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА И ПОЛИОКСИЭТИЛЕНА НА АДСОРБЦИЮ БЕЛКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОКРЕМНЕЗЕМА

А.П. Василенко¹, Н.В. Гузенко¹, М.Л. Малышева², Е.Ф. Воронин¹

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164, e-mail: e.voronin@rambler.ru

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко ул. Владимирская 60, 01033 Киев, e-mail: maria_malysheva@univ.kiev.ua

В работе исследовано влияние модифицирования поверхности аморфного непористого высокодисперсного наноразмерного кремнезема (нанокремнезема) апротонными водорастворимыми полимерами – поливинилпирролидоном (ПВП, $M = 12000$) и полиоксиэтиленом (ПОЭ, $M = 20000$) – на его адсорбционную способность по отношению к белкам – желатину и бычьему сывороточному альбумину (БСА). Установлено, что присутствие в растворах апротонных водорастворимых полимеров (ПВП, ПОЭ) приводит к уменьшению величины адсорбции обоих белков на поверхности кремнезема, как при последовательном, так и при одновременном введении адсорбтивов в суспензию. Определено, что ПВП и ПОЭ способны вытеснять из поверхностного слоя, предварительно адсорбированные молекулы белков.

Введение

Адсорбционное модифицирование полимерами позволяет придавать нанокремнезему такие физико-химические свойства, которые необходимы для создания на его основе новых препаратов или новых лекарственных форм, в частности, готовые суспензии и мази [1]. Было показано, что модифицирование поливинилпирролидоном (ПВП) способствует иммобилизации на поверхности кремнезема биологически активных соединений [2, 3], позволяет регулировать вязкостные характеристики его водных суспензий [4], снижает повреждающее действие на красные кровяные тела, т.е. повышает биосовместимость [5].

Вместе с тем остается невыясненным вопрос о влиянии модифицирования нанокремнезема высокомолекулярными соединениями на его адсорбционные свойства по отношению к белкам, имеющий очень важное значение, поскольку именно протеонектические свойства кремнезема (т.е. способность связывать белки) и определяют его фармацевтическую активность [1, 6]. Поэтому цель настоящей работы состояла в исследовании влияния модифицирования нанокремнезема апротонными водорастворимыми полимерами – поливинилпирролидоном и полиоксиэтиленом (ПОЭ) – на адсорбцию на его поверхности фибриллярного и глобулярного белков – желатина и бычьего сывороточного альбумина (БСА). Выбор модификаторов обусловлен тем, что ПВП и ПОЭ широко используются в фармации в качестве компонентов лекарственных препаратов [7].

Экспериментальная часть

Основным объектом исследования в работе выступал нанокремнезем с величиной удельной поверхности по азоту $230 \text{ м}^2/\text{г}$ и содержанием главных адсорбционных центров – свободных силанольных групп ($\equiv\text{Si-OH}$) – $0,62 \pm 0,02 \text{ ммоль/г}$ (производство Калушского опытного завода ИХП НАН Украины).

Используемые полимеры – фармакопейные ПВП и ПОЭ (производство Россия) – имели молекулярные массы соответственно ~ 12000 и ~ 20000 Д, а белки – желатин и БСА (проспект фирмы "Мерк") – ~ 25000 и ~ 68000 Д.

Адсорбционные исследования проводились при $\text{pH} = 5$ из буферных растворов, содержащих $0,1$ М лимонную кислоту и $0,2$ М Na_2HPO_4 [8], в статических условиях при комнатной температуре. Для этого в колбы, содержащие навеску образца кремнезема, добавляли 1% -ый раствор вещества с таким расчетом, чтобы соотношение сорбент – раствор было постоянным и составляло $100 \text{ мг} : 10 \text{ мл}$. Через 1 ч контакта смесь центрифугировали при 6000 об/мин на протяжении 30 мин.

Величины адсорбции полимеров и белков (A , мг/г) рассчитывали по разнице их исходных ($C_{\text{исх}}$, мг/100 мл) и равновесных ($C_{\text{равн}}$) концентраций в V мл раствора до и после контакта с сорбентом, отнесенных к массе навески (m , г), по уравнению [9]: $A = (C_{\text{исх}} - C_{\text{равн}}) V / m$.

Равновесную концентрацию обоих белков и ПВП определяли колориметрически на приборе КФК-2МП: белков – с помощью биуретового реагента (оптическую плотность раствора измеряли на длине волны 540 нм), а ПВП – иода ($\lambda = 590 \text{ нм}$). Равновесную концентрацию ПОЭ определяли методом вискозиметрии [10].

ИК-спектральные исследования адсорбционного слоя проводили на спектрометре "Спекорд М80" (Карл Цейс, Германия). Для этого предварительно прогретые при 80°C образцы нанокремнезема прессовали в пластинки размером $8 \times 28 \text{ мм}$ и массой $20 \pm 0,5 \text{ мг}$.

Изменение поверхностной свободной энергии Гиббса (ΔG) в результате адсорбции исследуемых соединений рассчитывали по уравнению [9]: $-\Delta G = RT \ln k$, где R – универсальная газовая постоянная, $8,314 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$; T – абсолютная температура, К; а k – константа равновесия. ΔG выражается в килоджоулях на 1 моль мономерных звеньев сорбированных высокомолекулярных соединений. Молекулярную массу одного звена белков принимали равной 100 Д [11].

Результаты и их обсуждение

Изотермы адсорбции ПВП, ПОЭ, желатина и БСА на поверхности нанокремнезема (рис. 1) хорошо описываются уравнением Ленгмюра $C/A = 1/A_m \cdot k + C/A_m$; в координатах $C/A - C$ они имеют вид прямых линий, что позволяет определить величины максимальной адсорбции, или емкость монослоя A_m и константу равновесия k .

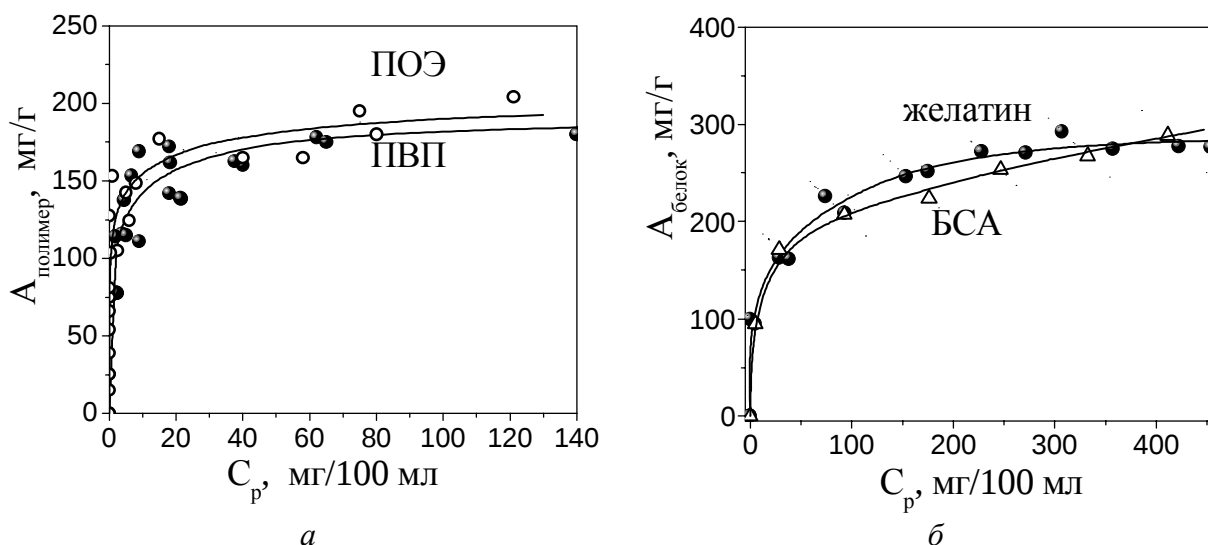


Рис. 1. Изотермы адсорбции исследуемых полимеров (а) и белков (б) на поверхности нанокремнезема.

Как известно [11 – 14], взаимодействие исследуемых полимеров и белков с кремнеземом происходит в основном за счет образования водородных связей между макромолекулой и свободными силанольными группами поверхности. Согласно теоретическим расчетам вклад дисперсионных сил при адсорбции, например, ПОЭ составляет всего примерно 10 % [15].

В результате такого взаимодействия в ИК-спектрах нанокремнезема с адсорбированным мономолекулярным слоем указанных соединений наблюдается исчезновение узкой полосы поглощения свободных силанольных групп 3750 см^{-1} и появление широкой полосы возмущенных групп $\equiv\text{Si-OH}$ с максимумом примерно у 3350 см^{-1} (рис. 2).

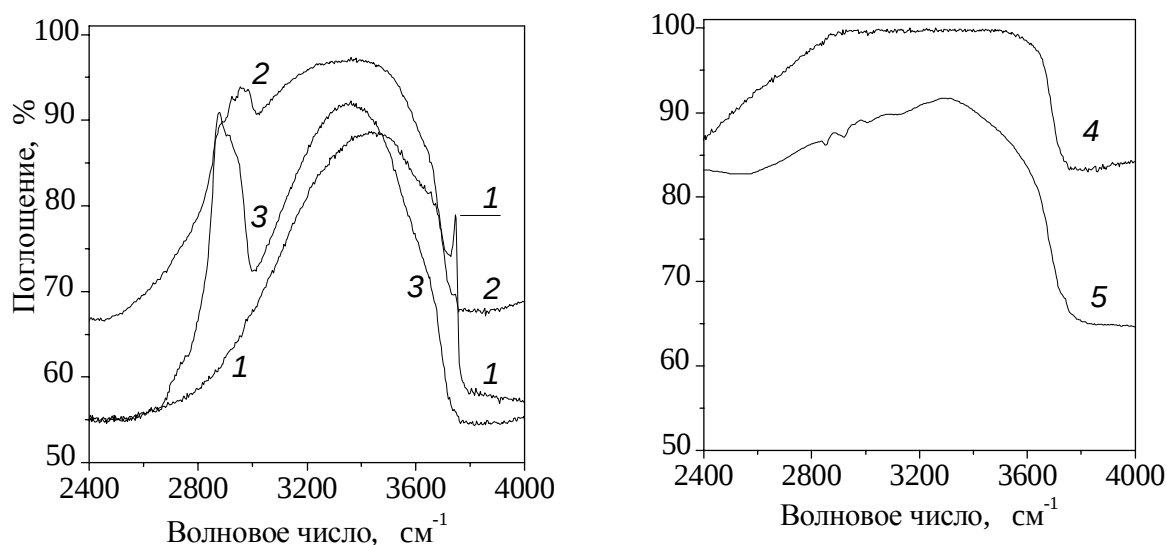


Рис. 2. ИК-спектры нанокремнезема: исходного (1) и после адсорбции ПВП (2), ПОЭ (3), БСА (4) и желатина (5) в количестве, равном емкости монослоя.

По смещению частоты $\Delta\nu_{\equiv\text{Si-OH}}$ по формуле [16]: $\Delta H = 1,906 \cdot (\Delta\nu)^{1/2} + K$, где ΔH – энтальпия взаимодействия в кДж/моль, $\Delta\nu$ – смещение частоты полосы поглощения в см^{-1} , K – коэффициент, равный 9,6 кДж/моль для эфирных групп и 12,6 кДж/моль для карбонильных [16], была оценена энергия взаимодействия исследуемых соединений с поверхностью нанокремнезема (таблица).

Таблица. Некоторые параметры адсорбционного слоя исследуемых полимеров и белков на поверхности нанокремнезема

№	Адсорбат	максимальная адсорбция			– ΔG , кДж/моль		– ΔH , кДж/моль	
		получено		лит. данные	получено	лит. данные	получено	лит. данные
		мг/г	мг/м ²	мг/м ²				
1	ПВП	185±15	0,80	0,5-1,0 [17]	15,8	~ 15 [19]	50	
2	ПОЭ	176±15	0,77	0,5-1,0 [18]	13,5	14 [15]	45	41,4 [15]
3	Желатин	290±20	1,26	1,0-2,0 [20]	14,4		50	
4	БСА	316±20	1,37	1,0-2,0 [20]	14,4	~ 10 [15]	50	

Из данных таблицы видно, что изменение свободной энергии Гиббса и величины энтальпии адсорбции всех соединений примерно одинаковы. Это позволяло ожидать от них примерно одинаковую адсорбционную активность по отношению к кремнезему. Для проверки данного предположения взаимодействие желатина и БСА с поверхностью кремнезема в присутствии ПВП и ПОЭ было исследовано в трех вариантах: а) адсорбция

белков из смесей с полимерами, б) вытеснение белков с поверхности нанокремнезема полимерами и в) влияние преадсорбции полимеров на адсорбцию белков. Исследование проводили путем сравнения величин адсорбции желатина и БСА из их растворов с содержанием белков 500 мг/100мл. Предыдущий опыт (рис. 1) показывает, что при такой начальной концентрации белков полученное значение A попадает на горизонтальный участок изотермы, т.е. близко емкости монослоя.

Адсорбция желатина из смесей с полимерами. Для этого в раствор желатина добавляли различное количество ПВП или ПОЭ, выдерживали в течение определенного времени, а затем приводили в контакт с кремнеземом. Полученные зависимости, приведенные на рис. 3, показывают, что введение в исходные растворы полимеров снижает адсорбцию желатина, очевидно, в результате конкурентной адсорбции белка и полимеров. При начальном содержании в растворе 200 мг/г ПВП или ПОЭ (при такой $C_{\text{нач}}$ они образуют монослойное покрытие, рис. 1а) величина адсорбции желатина составляет около половины от монослоя 120 – 130 мг/г, т.е. адсорбционный слой содержит примерно равные количества белка и полимера.

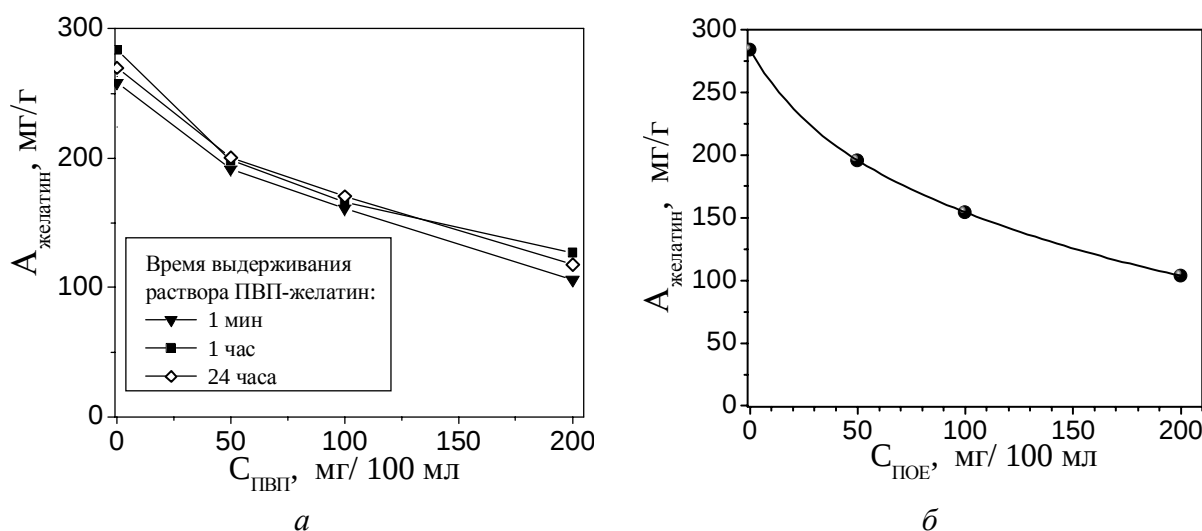


Рис. 3. Зависимость величины адсорбции желатина на поверхности кремнезема от концентрации ПВП (а) и ПОЭ (б) при одновременном добавлении белка и полимера в суспензию.

Для выявления влияния возможного образования интерполимерных комплексов полимер-белок на адсорбцию желатина мы варьировали время жизни раствора желатин-полимер от момента приготовления до момента контакта с сорбентом, которое составляло – 1 мин, 1 ч и 1 сут. Оказалось, что во всех случаях величина адсорбции желатина одинакова в пределах ошибки (рис. 3, а), т.е. такое взаимодействие вряд ли имеет место.

Вытеснение белков с поверхности нанокремнезема полимерами. Преадсорбция одного из адсорбтивов создает ему определенные преимущества в формировании поверхностного слоя, что позволяет выявить роль стерических и термодинамических факторов в установлении адсорбционного равновесия при взаимодействии исследуемых соединений с поверхностью нанокремнезема. Поэтому было исследовано влияние ПВП и ПОЭ на взаимодействие желатина и БСА с нанокремнеземом в условиях, когда белки уже адсорбировались на поверхности. Для этого в несколько емкостей, содержащих буферный раствор белков ($C_{\text{нач}} = 500$ мг/100 мл), вносили навеску нанокремнезема, выдерживали 1 ч, затем добавляли определенное

количество полимеров, выдерживали еще 1 ч и определяли равновесные концентрации белков.

Из зависимостей, приведенных на рис. 4, видно, что по мере добавления в систему ПВП или ПОЭ, содержание желатина и БСА на поверхности нанокремнезема снижается, т.е. оба полимера вытесняют предварительно адсорбированные белки.

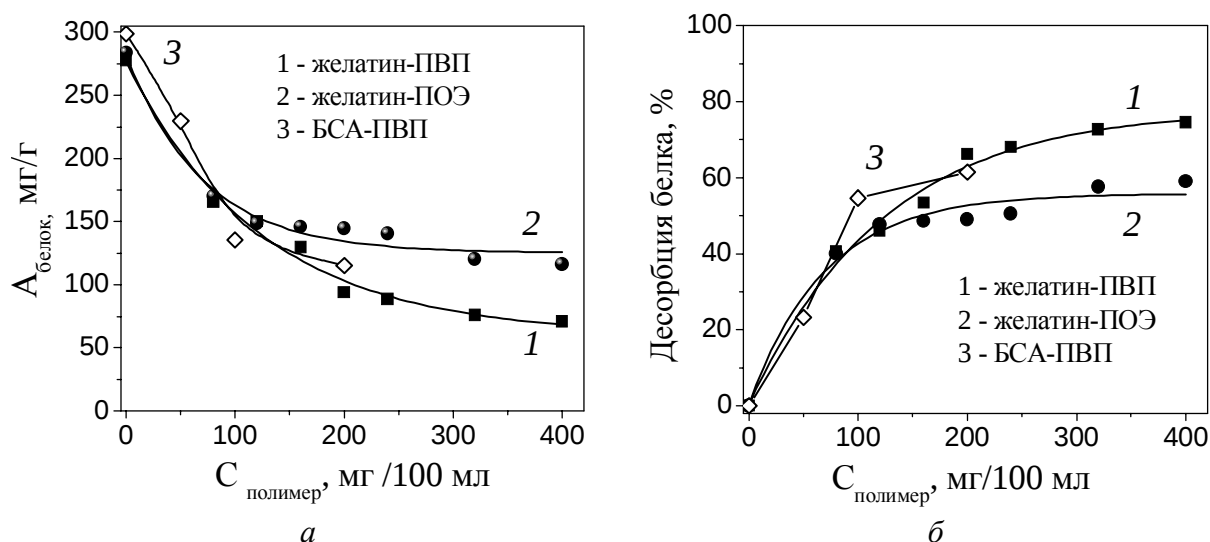


Рис. 4. Зависимость величины адсорбции (а) и степени десорбции (б) желатина (1, 2) и БСА (3) от количества добавленных в систему ПВП (1, 3) и ПОЭ (2).

Из сравнения рис. 3 и 4 можно видно, что зависимости величин адсорбции белков от содержания в системе полимеров примерно одинаковы для вариантов как одновременного введения адсорбтивов, так и последовательного – белок-полимер.

Влияние преадсорбции полимеров на адсорбцию белков. Совершенно иная картина наблюдается в этом случае. Было обнаружено, что предварительное введение в суспензию как поливинилпирролидона, так и полиоксиэтилена сопровождается довольно резким снижением величины адсорбции обоих белков вплоть до их нулевого значения (рис. 5).

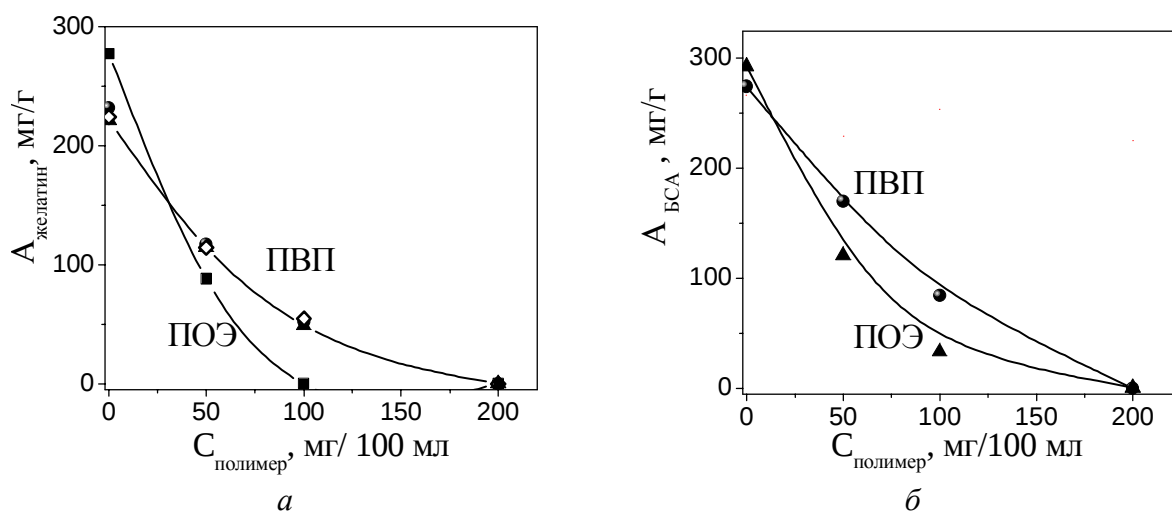


Рис. 5. Зависимость величины адсорбции желатина (а) и БСА (б) на поверхности кремнезема от количества предварительно введенных ПВП (1) и ПОЭ (2).

По нашему мнению, это может быть обусловлено изменением химии поверхности нанокремнезема в результате адсорбции полимеров. Поверхности таких адсорбционно модифицированных кремнезёмов в качестве активных центров вместо исходных свободных силанольных групп, которые теперь участвуют во взаимодействии с молекулами ПВП или ПОЭ, содержат соответственно карбонильные или эфирные группы звеньев адсорбированных макромолекул, значительная часть которых ориентирована наружу (рис. 6). Ранее нами было показано, что параметр p , характеризующий долю звеньев адсорбционного слоя полимеров [21], при полном покрытии поверхности для систем нанокремнезем-ПВП и нанокремнезем-ПОЭ составляет соответственно $\sim 0,35$ и $\sim 0,19$ [22]. Это означает, что в монослой ПВП наружу направлено $\sim 65\%$ звеньев, а в случае ПОЭ – $\sim 80\%$.

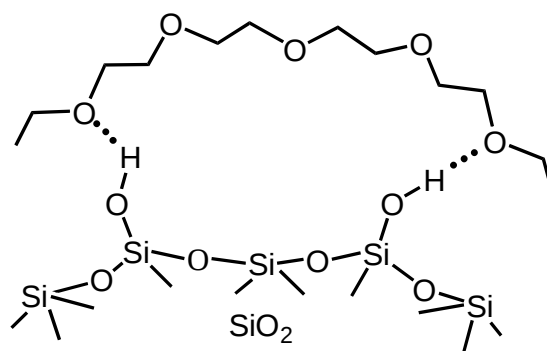


Рис. 6. Схематическое изображение адсорбционного слоя полимеров на поверхности нанокремнезема (на примере ПОЭ).

Таким образом, кремнезем, который в нативном состоянии относился по классификации А.В. Киселева [23] к специфическим адсорбентам т.н. "второго типа", т.е. имел поверхность, содержащую протолитические группы, в данном случае – гидроксильные (кислотные центры Бренстеда), после модифицирования становится адсорбентом "третьего типа", содержащим на поверхности только апротонные электронодонорные группы (основные центры Льюиса). Электронодонорные карбонильные группы в пептидных связях белков значительно больше по размеру, чем электроноакцепторные аминные, поэтому именно они определяют возможность взаимодействия с поверхностью кремнезема. При наличии на поверхности исходного кремнезема свободных силанольных групп происходит образование многочисленных водородных связей между ними и карбонильными атомами кислорода пептидных группировок, что и обеспечивает прочную адсорбцию белков [11, 14]. Замена силанольных групп на карбонильные или эфирные приводит к взаимному отталкиванию молекул желатина или БСА и модифицированной поверхности кремнезема, а в результате к снижению или полному отсутствию адсорбции белка. Из всей совокупности полученных данных можно предположить, что нулевое значение адсорбции белков на поверхности нанокремнезема, содержащей монослой ПВП или ПОЭ, обусловлено не термодинамическими, а, вероятнее всего, структурными факторами, т.е. сформировавшийся слой полимера просто не позволяет молекулам белков подойти к поверхности.

Возникает естественный вопрос – а почему преадсорбция белков не приводит к аналогичному результату относительно ПВП и ПОЭ. Дать исчерпывающий ответ на него в настоящее время затруднительно. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено более жестким строением макромолекул исследуемых белков [24], и, соответственно, иной структурой адсорбционного слоя. Вероятно, адсорбированные белки создают более

рыхлые, чем ПВП и ПОЭ поверхностные слои, поэтому молекулы полимеров способны проникать сквозь них и замещать собою часть белковых молекул.

Выводы

1. Преадасорбция водорастворимых апротонных полимеров ПВП и ПОЭ на поверхности нанокремнезема сопровождается монотонным снижением величины адсорбции как фибриллярного белка – желатина, так и глобулярного – БСА вплоть до ее нулевого значения.

2. Из совместных растворов с ПВП или ПОЭ величина адсорбции желатина меньше, чем из своих чистых растворов, однако не снижается до нуля.

3. ПВП и ПОЭ способны частично вытеснять с поверхности кремнезема адсорбированные белки – желатин и БСА.

4. Полученные результаты свидетельствуют о том, что модифицирование нанокремнезема поливинилпирролидоном или полиоксиэтиленом оказывает существенное влияние на его адсорбционную активность по отношению к белкам, поэтому к соединению в одном лекарственном препарате кремнезема как субстанции и указанных полимеров следует относиться весьма осторожно, поскольку при этом возможна потеря фармацевтических свойств сорбента.

Литература

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. НАН Украины А.А. Чуйко. – К.: Наук. думка, 2003. – 416 с.
2. УФ-спектральные исследования взаимодействия иода с поливинилпирролидоном и белком в растворе и на поверхности кремнезема / Н.В. Гузенко, О.Е. Воронина, Н.Н. Власова, Е.Ф. Воронин // Журн. прикл. спектр. – 2004. – Т. 71, Вып. 2. – С. 141 - 144.
3. Взаимодействие кварцетина с высокодисперсным кремнеземом в водных суспензиях / О.А. Казакова, В.М. Гунько, Н.А. Липковская, Е.Ф. Воронин, В.К. Погорелый // Коллоид. журн. – 2002. – Т. 64, Вып. 4. – С. 461 - 467.
4. Влияние модифицирования поливинилпирролидоном на вязкость водных суспензий высокодисперсного кремнезема / Н.В. Гузенко, О.Е. Воронина, Е.М. Пахлов, Е.Ф. Воронин // Хим. фарм. журн. – 2001. – Т. 35, Вып. 1. – С. 46 - 49.
5. Дослідження взаємодії еритроцитів з поверхнею ентеросорбенту „Силікс”, модифікованого водорозчинними полімерами / Л.С. Андрійко, О.Л. Габчак, В.І. Зарко, Є.П. Воронін, В.М. Гунько, О.О. Гацький, І.І. Геращенко // Фарм. журн. – 2007. – Т. 1. – С. 83 - 87.
6. Кремнеземы в медицине и биологии / Сб. тр. под ред. акад. АН Украины А.А. Чуйко. – Киев-Ставрополь, 1993. – 259 с.
7. Полимеры в фармации / под ред. А.И. Тенцовой, М.Т. Алюшина. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
8. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
9. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии / Под ред. Ю.Г. Фролова и А.С. Гродского. – М.: Химия, 1986. – 216 с.
10. Устойчивость суспензий нитрида кремния. 2. Адсорбция полиоксиэтилена и ее влияние на устойчивость водных суспензий / Б.В. Еременко, М.Л. Малышева, Т.Н. Безуглая, А.Н. Савицкая // Коллоид. журн. – 1997. – Т. 59, № 1. – С. 38 - 46.
11. Айлер Р. Химия кремнезема: пер с англ. – М.: Мир, 1982. – 1127 с.
12. Тарасевич Ю.И., Смирнова В.А., Монахова Л.И. Адсорбция альбумина на кремнеземе // Коллоид. журн. – 1978. – Т. 40, № 6. – С. 1214 - 1216.

13. Тарасевич Ю.И. Взаимодействие глобулярных белков с поверхностью кремнезёмов // Теор. и эксперим. химия. – 2001. – Т. 37, № 2. – С. 95 – 99.
14. Адсорбция из растворов на поверхностях твердых тел: Пер. с англ. / Под ред. Г. Парфита, К. Рочестера. – М.: Мир, 1986. – 488 с.
15. Interaction of poly(ethylene oxide) with fumed silica / E.F. Voronin, V.M. Gun'ko, N.V. Guzenko, E.M. Pakhlov, L.V. Nosach, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zięba, M.L. Malysheva, M.V. Borysenko, A.A. Chuiko // J. Colloid Interface Sci. – 2004. – V. 279. – P. 326 - 340.
16. Hair M.L. Infrared Spectroscopy in Surface Chemistry. – N.Y.: Marcell Dekker, 1967. – 258 p.
17. A study of water-soluble polymers adsorption onto surface of high-disperse silica by IR spectroscopy / M.L. Malysheva, E.F. Voronin, E.M. Pakhlov, N.V. Guzenko // 4th Intern. Conf. CERECO-2003, Hungari, 2003. – P. 337 – 344.
18. Еременко Б.В., Сергиенко З.А. Адсорбция полиоксидилену из водних растворов на поверхности высокодисперсного кремнезема. Влияние добавок нерастворителей // Адсорбция и адсорбенты. – 1979. – № 7. – С. 39 – 44.
19. Successive interaction of pairs of soluble organics with nanosilica in aqueous media / V.M. Gun'ko, V.I. Zarko, E.F. Voronin, E.V. Goncharuk, L.S. Andriyko, N.V. Guzenko, L.V. Nosach, W. Janusz // J. Colloid Interface Sci. – 2006. – V. 300, № 1. – P. 20 – 32.
20. Геращенко И.И. Физико-химическое обоснование, разработка и изучение новых лекарственных средств на основе высокодисперсного кремнезема: Автореф. дис. ... докт. фарм. наук – Винница, 1997. – 40 с.
21. Липатов Ю.С., Сергеева Л.М. Адсорбция полимеров. – К.: Наук. думка, 1992. – 248 с.
22. Гузенко Н.В. Вплив модифікування полівінілпіролідом на властивості високодисперсного кремнезему: Автореф. дис...канд.хим.наук: 01.04.18 / Ін-т хімії поверхні НАН України. – К., 2003. – 20 с.
23. Киселев А.В., Лыгин В.И. Инфракрасные спектры поверхностных соединений. – М.: Наука, 1972. – 459 с.
24. Основы биохимии. / под ред. А.А. Анисимова. – М.: Высшая шк., 1986. – 551 с.

EFFECT OF POLYVINYLPIRROLIDONE AND POLYOXYETHYLENE ON PROTEINS ADSORPTION ON NANOSILICA SURFACE

A.P. Vasilenko¹, N.V. Guzenko¹, M.L. Malysheva², E.F.Voronin¹

¹*O.O. Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Science of Ukraine
17, General Naumov Str., 03164 Kyiv, Ukraine, e-mail: e.voronin@rambler.ru*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrs'ka Str., 01033 Kyiv, Ukraine*

The paper studies the effect of modification of the surface of amorphous nonporous high-disperse nano-sized silica (nanosilica) with aprotic watersoluble polymers – polyvinylpyrrolidone (PVP, $M \approx 12000$) and polyethylene oxide (PEO, $M = 20000$) – on its ability of proteins adsorption – gelatine and bovine serum albumin (BSA). The presence of aprotic watersoluble polymers (PVP, PEO) in a solution was found to diminish the value of adsorption of these proteins on silica surface both at stepwise and simultaneous adsorbate introduction into a suspension. It was established that PVP and PEO was able to displace previously adsorbed protein molecules from the surface layer.

ВПЛИВ ПОЛІВІНІЛПІРОЛІДОНУ І ПОЛІОКСІЕТИЛЕНУ НА АДСОРБЦІЮ БІЛКІВ НА ПОВЕРХНІ НАНОКРЕМНЕЗЕМУ

А.П. Василенко¹, Н.В. Гузенко¹, М.Л. Малишева², Є.П. Воронін¹

¹*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова 17, 03164 Київ-164, e-mail: e.voronin@rambler.ru*

²*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська 60, 01033 Київ*

В роботі досліджено вплив модифікування поверхні аморфного непористого вискодисперсного нанорозмірного кремнезему (нанокремнезему) апротонними водорозчинними полімерами – полівінілпіролідом (ПВП, $M = 12000$) та поліоксіетиленом (ПОЕ, $M = 20000$) – на його адсорбційну здатність стосовно білків – желатину і бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Встановлено, що присутність у рррозчинах апротонних водорозчинних полімерів (ПВП, ПОЕ) призводить до зменшення величини адсорбції обох білків на поверхні кремнезему як при послідовному, так і при одночасному введенні адсорбтивів у суспензію. Визначено, що ПВП і ПОЕ здатні витіснити з поверхневого шару попередньо адсорбовані молекули білків.