УДК 577.113:616-089.22

Е.В. Короткая

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ КОЛЛОДИЕВЫХ ПЛЕНОК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММОБИЛИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ: ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССА АДСОРБЦИИ ИОНОВ Co^{2+}, Cu^{2+} И Pt^{2+}

Изучена кинетика адсорбции переходных металлов на коллодиевых пленках из водных растворов и определены константы адсорбционного равновесия. Рассмотрено влияние ковалентных характеристик центрального атома на величину предельной адсорбции. Предложен вероятный механизм связывания ионов металлов коллодиевыми пленками за счет комплексообразования с участием гидроксильных и нитратных групп.

Коллодиевые пленки, адсорбция, ионы переходных металлов (Co^{2+}, Cu^{2+}, Pt^{2+}), комплексообразование, фотометрический метод, нуклеиновые кислоты.

Введение

Микропористые мембранные фильтры из нитратов целлюлозы (НЦ) широко используются для иммобилизации белков и нуклеиновых кислот. Фильтры из НЦ представляют собой тесное переплетение волокон НЦ с определенными размерами пор неправильной формы. Такие мембранные фильтры в определенных условиях способны связывать белки и нуклеиновые кислоты. Необходимо отметить, что связывание белков не зависит от ионной силы раствора, а одноцепочечные ДНК прочно удерживаются такими фильтрами только при высокой ионной силе раствора или в щелочных денатурирующих растворах [1–3].

Адсорбция является наиболее простым методом иммобилизации, она практически не требует подготовки компонент сенсора и использования специальных химических реагентов. Однако недостатком данного способа иммобилизации является возможность десорбции биологического материала, что уменьшает чувствительность системы и загрязняет раствор.

Адсорбция представляет собой процесс самопроизвольного перераспределения компонентов системы между поверхностным слоем и объемной фазой. Нуклеиновые кислоты являются полиэлектролитами. Адсорбцию полиэлектролитов на поверхности твердых тел можно разделить на два типа: 1) полиэлектролит и поверхность несут противоположные заряды; 2) полиэлектролит и поверхность заряжены одноименно. Нуклеиновые кислоты являются полианионами, т.е. несут отрицательный заряд на каждом звене своей полимерной цепи. Поверхность пленок из НЦ при их контакте с водой, основываясь на правиле Кена (из двух соприкасающихся фаз положительно заряжается та, которая имеет большую диэлектрическую проницаемость), также заряжается отрицательно. Поэтому при адсорбции нуклеиновых кислот из водных растворов на пленках из НЦ имеет место второй тип адсорбции. При адсорбции полиэлектролитов на одноименно заряженной поверхности сила адсорбции определяется силами Ван-дер-Ваальса, которые по своей природе делятся на диполь-дипольные, индукционные и дисперсионные взаимодействия, а также действием водородных и ионных связей между полиэлектролитом и поверхностью адсорбента. В этом случае присутствие солей металлов способствует увеличению адсорбции нуклеиновых кислот вследствие сильных электростатических взаимодействий между ионами металла и нуклеиновой кислотой. Катионы металла служат, по всей вероятности, связующим звеном между отрицательно заряженной пленкой из НЦ и отрицательно заряженными фосфатными группами молекул нуклеиновых кислот. Молекулы ДНК, как и других нуклеиновых кислот, имеют несколько типов активных центров, координирующих ионы металлов. Прежде всего это ионы кислорода фосфатных групп, несущие отрицательные заряды, некоторые атомы оснований (N_7 – гуанина и аденина, N_3 – цитозина, экзоциклические атомы кислорода гуанина, тимина и цитозина). В случае РНК в связывании может принимать участие кислород рибозы. Связывание ионов металлов с различными центрами на ДНК специфично и сильно зависит от природы иона. Если ионы щелочных (Na^+, K^+) и щелочноземельных (Mg^{2+}, Ca^{2+}) металлов взаимодействуют преимущественно с фосфатными группами ДНК, то ионы переходных металлов (Mn, Zn, Co, Ni, Cd, Cu, Ag, Hg) активно связываются также с основаниями. В образовании этих комплексов существенную роль играют молекулы воды, образующие гидратную оболочку иона и его комплекса.

В настоящее время в литературе представлен обширный экспериментальный материал по сорбции ионов металлов целлюлозосодержащими полимерами из водных растворов их солей [4–6]. Однако эти исследования практически не содержат информации о сорбции ионов металлов на НЦ.

Целью настоящей работы явилось изучение процесса модификации поверхности коллодиевых пленок методом адсорбции солей переходных металлов из их водных растворов для повышения эффективности иммобилизации нуклеиновых кислот.

Материалы и методы

В качестве адсорбента были использованы коллодиевые пленки. Коллодий – 4 % раствор нитрата целлюлозы в эфире с добавлением спирта (обычно в соотношении 7:1). Для получения пленок использовали коллодий р. 67.554.70 (соответствующий требованиям ФС 42-1136-98) производства Промышленной химико-фармацевтической компании ОАО «Медхимпром».

К раствору коллодия добавляли смесь этанола и диэтилового эфира (1:3) и перемешивали 3 мин на магнитной мешалке. Полученный раствор выливали в чашку Петри (d = 9 см) и сушили на воздухе. Толщину пленки определяли оптическим методом [7].

Для модификации поверхности коллодиевых пленок выбраны ионы переходных металлов (Co^{2+}, Cu^{2+}, Pt^{2+}), способные к комплексообразованию. По теории Льюиса, ионы Pt^{2+} являются мягкой кислотой. Ионы Co^{2+} и Cu^{2+}, по теории Льюиса, являются «промежуточными» кислотами, так как реагируют как с жесткими, так и с «промежуточными» донорными атомами оснований. Ионы меди по своим ковалентным характеристикам приближаются к мягким кислотам, однако из-за сравнительно высоких электростатических характеристик реагируют также с донорными атомами аминного азота и кислорода.

Адсорбцию ионов металлов проводили в статических условиях из водных растворов их солей ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $K_2[PtCl_4]$). Для этого коллодиевые пленки массой (m) 0,2557±0,0005 г и толщиной 24±0,2 мкм заливали 10 мл (V) водных растворов солей металлов с различной начальной концентрацией (C_0) ионов металлов (0,005÷0,025 моль/дм^3). При достижении адсорбционного равновесия раствор аккуратно сливали и определяли в нем равновесную концентрацию ионов металлов (C_p). Определение концентрации ионов металлов в растворе проводили фотометрически на КФК-3 при длине волны, отвечающей максимуму поглощения соответствующего раствора. Концентрацию ионов металла в растворе после адсорбции определяли по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика готовили серию растворов солей металлов с известной концентрацией от 0,002 до 0,025 моль/дм^3 и измеряли их оптическую плотность.

Концентрацию ионов Co^{2+} в растворе определяли фотометрическим методом на основании образования комплексных соединений с роданид-ионами. Роданидный комплекс $[Co(SCN)_4]^{2-}$ имеет синюю окраску. К анализируемому раствору прибавляли такое количество роданида аммония, чтобы его концентрация в конечном объеме составляла не менее 5 %. Для усиления окраски роданидного комплекса кобальта в водном растворе использовали ацетон. Концентрация ацетона в конечном объеме составляла 50 %. Оптическую плотность измеряли при длине волны 610 нм, при этой длине волны оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации кобальта вплоть до 50 мкг/мл [8].

Фотометрическое определение меди проводили на основании образования аммиачного комплекса $[Cu(NH_3)_4]SO_4$, имеющего интенсивную синюю окраску [9]. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 630 нм.

Спектрофотометрическое определение платины проводили, используя собственную окраску комплексного соединения $K_2[PtCl_4]$ [10], имеющего максимум поглощения при длине волны 390 нм.

Адсорбционную способность коллодиевой пленки оценивали по величине адсорбционной емкости (A):

$$A = \frac{(C_0 - C_p) \cdot V}{m} \qquad (1)$$

и коэффициента распределения (K_d) ионов металла между пленкой и раствором:

$$K_d = A / C_p. \qquad (2)$$

Кинетику процесса адсорбции исследовали методом ограниченного объема раствора [11]. Серию чашек Петри с коллодиевыми пленками толщиной 24±0,2 мкм и массой 0,2557±0,0005 г заливали 10 мл водных растворов солей металлов с концентрацией $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ моль/дм^3 и выдерживали от 10 мин до 1 суток при перемешивании. Через определенные промежутки времени растворы аккуратно сливали и определяли остаточную концентрацию ионов металла.

Результаты и их обсуждение

Как показали кинетические исследования, продолжительность достижения адсорбционного равновесия определяется главным образом химической природой самого полимерного адсорбента (коллодиевой пленки). Равновесие в распределении ионов металлов между раствором и коллодиевой пленкой устанавливается через 45 мин для ионов Co^{2+} и 60 мин для ионов Cu^{2+} и Pt^{2+}. На рис. 1 приведены кинетические кривые адсорбции ионов металлов на коллодиевых пленках. Достаточно длительное время установления адсорбционного равновесия можно объяснить гидрофобными свойствами коллодиевой пленки. Увеличение скорости адсорбции ионов Co^{2+} по сравнению с ионами Cu^{2+} и Pt^{2+} можно объяснить исходя из значений констант нестойкости комплексных соединений (табл. 1). Как видно из табл. 1, аквакомплекс кобальта имеет самую большую константу нестойкости, следовательно, быстрее происходит замещение лигандов. Константы нестойкости комплексов Cu(II) и Pt(II) имеют близкое значение, и потому скорости адсорбции также близки.

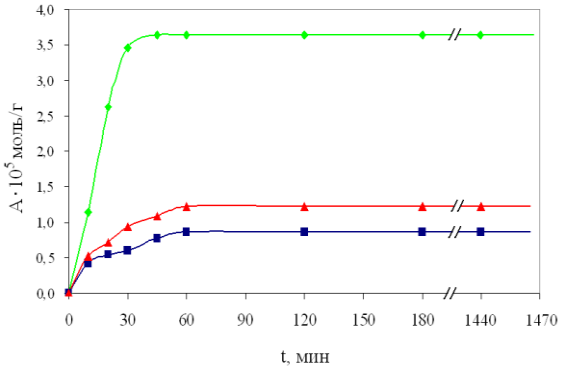


Рис. 1. Кинетические кривые адсорбции ионов металлов: -♦- – Co^{2+}; -■- – Cu^{2+}; -▲- – Pt^{2+} на коллодиевых пленках

Таблица 1

Значения констант нестойкости комплексных ионов

Комплексный ион	$pK_{нест.}$
$[Co(H_2O)_6]^{2+}$	2,47
$[Cu(H_2O)_4]^{2+}$	16,4
$[PtCl_4]^{-}$	16,6

Для определения параметров, характеризующих адсорбционные свойства коллодиевых пленок, нами были получены изотермы адсорбции (рис. 2). Наиболее часто для описания изотерм адсорбции ионов металлов полимерными материалами используют уравнение Лэнгмюра:

$$A = A_{\max}\frac{K\cdot C_{\mathbf{p}}}{K\cdot C_{\mathbf{p}}+1}, \qquad (3)$$

где A_{max} – предельная адсорбционная емкость полимерной пленки, моль/г; K – константа равновесия адсорбционного процесса, характеризующая интенсивность процесса адсорбции, дм^3/моль; C_p – равновесная концентрация ионов металла в растворе, моль/дм^3.

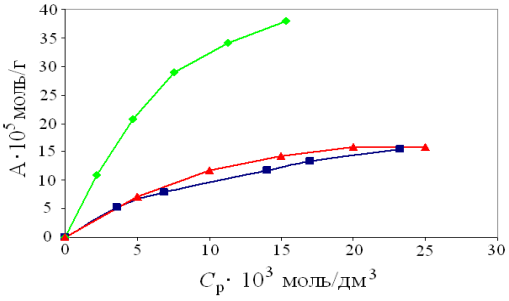


Рис. 2. Изотермы адсорбции ионов металлов: -♦- – Co^{2+}; -■- – Cu^{2+}; -▲- – Pt^{2+} на коллодиевых пленках

Предельную адсорбционную емкость коллодиевой пленки по отношению к ионам металлов и константу равновесия адсорбционного процесса определяли графически, для этого уравнение Лэнгмюра приводили к линейному виду:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{\max}} + \frac{1}{A_{\max}\cdot K}\cdot\frac{1}{C_{\mathbf{p}}}. \qquad (4)$$

Величина предельной адсорбционной емкости коллодиевой пленки, значение константы адсорбционного равновесия по отношению к ионам металлов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Значения констант уравнения Лэнгмюра

Катион металла	$A_{max}\cdot 10^5$, моль/г	K, дм^3/моль
Co^{2+}	74,1	20
Cu^{2+}	22,4	50
Pt^{2+}	22,2	30

Более высокие значения адсорбционной емкости коллодиевых пленок по отношению к ионам кобальта можно объяснить исходя из инертности комплекса, которая зависит от природы центрального атома и природы координированного лиганда. Процесс адсорбции на поверхности пленки, вероятнее всего, будет определяться природой функциональных групп полимерной пленки. Функциональные группы коллодиевой пленки ($-OH^-$, $-ONO_2^-$) имеют неподеленные пары электронов на атомах кислорода. Поэтому можно предположить, что адсорбция катионов металлов происходит за счет комплексообразования с участием электронодонорных групп лигандов (L) по схеме

$$L + M \leftrightarrow LM.$$

Однако ионы OH^- по-разному взаимодействуют с Co(II), Cu(II) и Pt(II). Резкое отличие в поведении иона гидроксила в отношении производных Co(II) и Pt(II) связывают с тем, что заполненные p-орбитали иона OH^- и заполненные d-орбитали Pt(II) отталкиваются друг от друга. Ион OH^- не может принять пару d-электронов Pt(II) с образованием дативной связи, но может использовать пару электронов для заполнения вакантной d-ячейки в случае Co(II) [12].

Как уже было отмечено, ионы Cu^{2+} по своим ковалентным характеристикам приближаются к мягким кислотам и потому плохо взаимодействуют с жестким основанием OH^-.

Хлорсодержащие комплексные ионы Pt(II) взаимодействуют с ONO_2^- группами коллодиевой пленки, так как вновь вступающий лиганд, согласно Басоло и Пирсону, обладает большей способностью к транс-влиянию и большей тенденцией к комплексообразованию с Pt(II) [12].

Таким образом, Co(II) в отличие от Pt(II) и Cu(II) может связывать не только $-ONO_2^-$ группы, но и группы OH^-, что приводит к значительному увеличению предельной адсорбционной емкости.

В табл. 3 представлена зависимость коэффициента распределения ионов металлов между адсорбентом и раствором в зависимости от концентрации ионов металлов в растворе.

Таблица 3

Зависимость коэффициента распределения от концентрации ионов металла

$C_0 \cdot 10^3$, моль/дм^3	K_d, дм^3/кг		
	Co^{2+}	Cu^{2+}	Pt^{2+}
5	49,3	14,4	22,2
10	44,1	11,5	16,9
15	38,1	8,4	12,5
20	30,1	7,8	9,9
25	24,8	6,6	7,5

Как видно из табл. 3, с уменьшением начальной концентрации ионов металлов в растворе коэффициент распределения ионов металлов (K_d) увеличивается.

Зависимость степени извлечения от концентрации ионов металла представлена в табл. 4. Степень извлечения катионов кобальта и платины увеличивается с увеличением концентрации. Для ионов меди такой зависимости между концентрацией ионов и степенью извлечения не наблюдается.

Таблица 4

Степень извлечения ионов металла коллодиевой пленкой

$C_0 \cdot 10^3$, моль/дм^3	Степень извлечения, %		
	Co^{2+}	Cu^{2+}	Pt^{2+}
5	44,26	72,6	64,0
10	47,02	69,0	70,0
15	50,67	93,7	76,0
20	56,51	85,1	80,0
25	61,19	93,1	84,0

Для выяснения характера взаимодействия ионов металлов с функциональными группами полимеров изучены колебательные спектры (ИК) образцов полимеров до и после сорбции ионов Co^{2+}. ИК-спектры коллодиевых пленок имеют в области частот валентных колебаний групп ОН широкую асимметричную полосу поглощения с максимумами около 3550 см$^{-1}$. В области 1600–1750 см$^{-1}$ в спектрах коллодиевых пленок присутствует очень интенсивная полоса, обусловленная асимметричными валентными колебаниями групп NO_2 [7]. В ИК-спектрах образцов после адсорбции ионов Co^{2+} наблюдается существенный сдвиг полос ОН и NO_2 групп в область высоких частот и изменение контуров некоторых полос. Такие различия в спектрах образцов, насыщенных ионами кобальта, по сравнению с исходными подтверждают образование координационной связи между ионами кобальта и функциональными группами коллодиевых пленок.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что коллодиевые пленки обладают хорошими адсорбционно-кинетическими характеристиками по отношению к ионам Co^{2+}, Cu^{2+}, Pt^{2+}. Установлено, что Co(II) в отличие от Pt(II) и Cu(II) координирует не только $-ONO_2^-$ группы, но и группы OH^-. Коллодиевые пленки, модифицированные ионами переходных металлов (Co^{2+}, Cu^{2+}, Pt^{2+}), могут быть рекомендованы для иммобилизации нуклеиновых кислот.

Список литературы

1. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536 с.

2. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии / Д. Фрайфелдер; пер. с нем.; под ред. Е.С. Громовой, С.В. Яроцкого, З.А. Шабаровой. – М.: Мир, 1980. – 581 с.

3. Калачиков, С.М. Иммобилизация ДНК на микропористых мембранах с помощью УФ-облучения / С.М. Калачиков, В.А. Адаричев, Г.М. Дымшиц // Биоорганическая химия. – 1992. – Т. 18. – № 1. – С. 52–62.

4. Shukla, S.R. Cupric ion removal by dyed cellulosic materials / S.R. Shukla, V.D. Sakhardande // J. Appl. Polym. Sci. – 1990. – V. 41. – № 11–12. – P. 2655–2663.

5. Багровская, Н.А. Сорбция ионов металлов целлюлозосодержащими полимерами / Н.А. Багровская, О.В. Алексеева // Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы: сб. материалов X Междунар. науч.-практ. семинара SMARTEX – 2007. – Иваново, 2007 – С. 89–91.

6. Никифорова, Т.Е. Сорбционные свойства и природа взаимодействия целлюлозосодержащих полимеров с ионами металлов // Т.Е. Никифорова, Н.А. Багровская, В.А. Козлов, С.А. Лилин // Химия растительного сырья. – 2009. – № 1. – С. 5–14.

7. Короткая, Е.В. Изучение свойств коллодиевых пленок / Е.В. Короткая, А.М. Осинцев // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – № 1. – С. 51–55.

8. Пятницкий, И.В. Аналитическая химия кобальта / И.В. Пятницкий. – М.: Наука, 1965. – 260 с.

9. Подчайнова, В.Н. Медь / В.Н. Подчайнова, Л.Н. Симонова. – М.: Наука, 1990. – 279 с.

10. Гинзбург, С.И. Аналитическая химия платиновых металлов / С.И. Гинзбург, Н.А. Езерская, И.В. Прокофьева и др. – М.: Наука, 1972. – 613 с.

11. Салдадзе, К.М. Комплексообразующие иониты (комплекситы). – М.: Химия, 1980. – 336 с.

12. Гринберг, А.А. Введение в химию комплексных соединений / А.А. Гринберг. – Л.: Химия, 1971. – 632 с.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

E.V. Korotkaya

Modification of collodion film surface to improve the efficiency of nucleic acid immobilization

The kinetics of adsorption of transition metals on collodion films from aqueous solutions has been investigated. The adsorption equilibrium constants have been determined. The effect of covalent characteristics of the central atom on the limiting adsorption has been considered. The probable mechanism for binding of metal ions with collodion films due to complexation with the hydroxyl and nitrate groups has been proposed.

Collodion films, adsorption, transition metal ions (Co^{2+}, Cu^{2+}, Pt^{2+}), complexation, photometry method, nucleic acids.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru