

УДК 547.458.88:546.815/.819

СРАВНИТЕЛЬНАЯ СВИНЕЦСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНОВ С РАЗЛИЧНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ *IN VITRO*

К.Е. Макарова¹, Е.В. Хожаенко^{2,3}, Р.Ю. Хотимченко³, В.В. Ковалев³¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, Владивосток, пр-т Острякова, 2),²Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8),³Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690059, Владивосток, ул. Пальчевского, 17)**Ключевые слова:** сорбция, пектины, свинец.

Описана кинетика связывания ионов свинца низкоэтерифицированными пектинами с различными молекулярными массами, полученными методом кислотного гидролиза. Определены показатели максимальной металлсвязывающей активности исследуемых пектиновых образцов в диапазоне рН среды от 2 до 6. Для описания изотерм сорбции и вычисления сорбционных показателей была применена сорбционная модель Лэнгмюра. Установлено, что с уменьшением молекулярной массы пектинов максимальная сорбционная емкость достоверно увеличивается, а сродство пектина к ионам свинца уменьшается.

Пектины, или пектиновые вещества, являются структурными компонентами клеточной стенки высших растений, в которых они выполняют функции цементирующего материала для волокон целлюлозы. Многие растения содержат пектины в межклеточном слое между первичными клеточными стенками, где эти соединения участвуют в регуляции движения воды и клеточных соков. Несмотря на то что пектины встречаются практически во всех растениях, источники коммерческого пектина ограничены главным образом яблочными выжимками и кожурой цитрусовых плодов. Пектины используются в основном в пищевой промышленности в качестве желеобразователей, загустителей, эмульгаторов и стабилизаторов. Вместе с тем результаты экспериментальных и клинических исследований показывают, что пектины способны проявлять лечебные и профилактические свойства при ряде заболеваний, не уступая по эффективности некоторым лекарственным препаратам [1, 2].

Полимерные цепи пектинов состоят из остатков D-галактуронової кислоты, которые соединены друг с другом $\alpha(1\rightarrow4)$ -связью. Образованные таким образом цепи насчитывают несколько сотен галактуроновых блоков. Коммерческие пектины имеют молекулярную массу около 80 000 кДа, что соответствует приблизительно 400 остаткам галактуронової кислоты [12]. Между блоками галактуронової кислоты на разных расстояниях друг от друга располагаются остатки L-рамнозы, соединенные с галактуронової кислотой $\alpha(1\rightarrow2)$ -связью, вследствие чего цепь пектина изгибается примерно на 90°. От основной линейной цепи рамногалактуронана берут начало боковые цепи, состоящие из нейтральных сахаров, чаще всего арабинозы и галактозы. Встречаются также D-галактопираноза, L-арабинофураноза, D-ксилопираноза, D-глюкопираноза и L-фукопираноза и очень редко – D-апиоза, 2-O-метил-D-ксилоза и

2-O-метилфукоза. Обычно боковые цепи из нейтральных сахаров имеют длину от 8 до 20 молекул, и на их долю приходится 10–15 % массы пектина [15]. Как и большинство полисахаридов, пектины являются гетерогенными в отношении химической структуры и молекулярной массы, их состав различается в зависимости от источника сырья, места произрастания растения и условий выделения [3]. Часть остатков D-галактуронової кислоты в пектине находится в форме метиловых эфиров. Если доля таких остатков составляет менее 50 %, то пектин считается низкоэтерифицированным. Полностью деэтерифицированный, то есть не содержащий метиловых эфиров или содержащий незначительное их количество, пектин называется пектовой кислотой.

Пектины обладают широким спектром физиологических эффектов, в том числе способностью снижать уровень холестерина в печени и плазме крови, уменьшать усвоение органического материала в подвздошной кишке, увеличивать фекальную экскрецию азота, а также связывать и выводить из организма тяжелые металлы, такие как свинец, кадмий и ртуть, в том числе радионуклиды [2, 8, 10, 11, 14]. Установлено, что в тонкой кишке человека пектины продвигаются в виде макромолекул и не подвергаются гидролизу, вследствие этого около 90 % потребляемого пектина достигает толстой кишки, в которой они ферментируются до короткоцепочных жирных кислот [4, 13]. Таким образом, большая часть физиологических эффектов пектинов связана с их внутрикишечным метаболизмом. Можно, однако, предположить, что с уменьшением средней молекулярной массы часть низкомолекулярных пектинов будет всасываться в кровь и оказывать резорбтивные эффекты. При этом важно установить связь того или иного эффекта полисахаридов с их размерами. Цель настоящей работы состояла в сравнительной количественной оценке металлсвязывающей активности пектинов, различающихся молекулярными массами.

Материал и методы. В качестве образцов использовали кальциевые соли пектовой кислоты с молекулярной массой 48,6, 12–20 и 5–10 кДа. Образцы представляли собой однородные порошки кремового цвета, не растворимые в воде. В качестве исходного сырья для получения пектинов использовали коммерческий высокоэтерифицированный цитрусовый пектин со степенью этерификации 58 % и содержанием ангидрогалактуронової кислоты (АГК) 74,3 % (Herbstreith & Fox KG, Германия). Образец низкоэтерифицированного пектина с молекулярной массой 48,6 кДа был получен из

исходного высокоэтерифицированного пектина путем его щелочной деэтерификации в среде 70 % этанола [5]. Полученный пектин после нейтрализации среды концентрированной соляной кислотой переводили в кальциевую соль добавлением эквивалентного количества 1М раствора хлорида кальция, отделяли фильтрованием, промывали 70 % этанолом и сушили при 80 °С. Образцы низкомолекулярных пектинов были получены из низкоэтерифицированного пектина (образца № 1) путем его поэтапного кислотного гидролиза 0,5М соляной кислотой при постоянной температуре 90±5 °С. Концентрация пектина в реакционной среде составляла 5 %. Первый этап гидролиза проводили в течение 2 часов для удаления нейтральных моносахаридов [9]. Оставшийся осадок пектина, состоявший в основном из полигалактуроновой кислоты, промывали 0,5М соляной кислотой и подвергали дальнейшему гидролизу в течение еще 2 часов. По окончании гидролиза смесь охлаждали и отделяли жидкую фазу от нерастворимого осадка пектина центрифугированием при относительном центробежном ускорении 3000 g в течение 30 мин. Образец пектина № 2 был получен из нерастворимого осадка пектина. Для этого осадок промывали 0,5М соляной кислотой и переводили в раствор путем нейтрализации 1М раствором гидроксида аммония. Полученный раствор пектата аммония отмывали от низкомолекулярных фракций на ультрафильтрационной мембране из регенированной целлюлозы с пределом пропускания 10 кДа при давлении 0,3 МПа. Из отмытого раствора осаждали пектат кальция добавлением 1М раствора кальция хлорида. Осадок отделяли центрифугированием, промывали 70 % этанолом и сушили при 80 °С. Образец № 3 получали из жидкой фазы гидролизатов. Для этого жидкую фазу нейтрализовали 1М гидроксидом аммония и подвергали последовательному фракционированию на ультрафильтрационных мембранах с пределами пропускания 10 и 3 кДа. Фракцию, прошедшую через мембрану 10кДа и задержанную на мембране 3кДа, обрабатывали 1М хлоридом кальция и выделяли пектат кальция вышеописанным способом.

В полученных образцах пектина определяли содержание АГК по реакции с м-гидроксидифенилом, а количественное содержание кальция – комплексонометрическим методом. Молекулярную массу образца №1 оценивали вискозиметрическим методом [5], образцов № 2 и № 3 – методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Shodex Asahipak GS-320 7E (табл. 1).

Содержание свинца в инкубационных средах определяли титриметрическим (комплексонометрическим) методом, используя в качестве металлоиндикатора ксиленоловый оранжевый.

Для определения оптимального времени инкубирования проб, обеспечивающего полную сорбцию металла исследуемыми образцами, изучали кинетику его взаимодействия с пектинами. Для этого в емкость, снабженную магнитной мешалкой, помещали 0,25 г изучаемого образца, 10 мл буферного раствора для

Таблица 1

Физико-химические характеристики образцов пектина

№ образца	Молекулярная масса, кДа	Содержание АГК, %	Содержание кальция, %
1	48,6	69,0	7,9
2	12–20	88,2	8,3
3	3–10	85,5	8,5

обеспечения необходимого pH, рассчитанный объем 0,1М раствора свинца, эквивалентный количеству пектина, и воды очищенной до 100 мл. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 10 мл, в которых после фильтрования определяли остаточное содержание металла. На основе полученных данных строили графики зависимости доли связанного металла в процентах от времени инкубации, за 100 % принимали максимальное значение сорбционной емкости.

Сравнительную оценку сорбционной емкости пектиновых образцов проводили следующим образом: в емкость, снабженную магнитной мешалкой, вносили рассчитанный объем 0,1М раствора соли металла – Pb(NO₃)₂, – соответствующий его концентрации в растворе от 50 до 1200 мг/л, 1 мл 0,1М ацетатного буфера со значением pH от 2 до 6 и 10 мл 0,25 % суспензии исследуемого образца. По показаниям pH-метра корректировали значение водородного показателя среды добавлением 0,1М раствора гидроксида натрия или азотной кислоты, после чего объем реакционной смеси доводили до 20 мл водой очищенной. Время инкубации при постоянном перемешивании составляло 60–120 мин при температуре 22–24 °С. После инкубации раствор с несвязавшимся металлом фильтровали через гидрофильный фильтр Omnipore с диаметром пор 5 мкм, и остаточное содержание металла в жидкой фазе определяли комплексонометрическим методом.

Количество связавшегося металла вычисляли по формуле:

$$q = V(C_i - C_e) / M,$$

где q – количество связавшегося с сорбентом металла, мг/г; V – объем раствора в инкубационной емкости, л; C_i – начальная концентрация металла в растворе (суспензии), мг/л; C_e – равновесная концентрация металла в растворе (суспензии), мг/л; M – масса экспериментального образца, г.

На основе экспериментальных данных по связыванию катионов свинца пектиновыми образцами строили изотермы сорбционного равновесия (поглощение металла образцом против остаточной концентрации металла). Коэффициент сродства образцов пектина к свинцу и максимальную сорбционную емкость определяли с помощью сорбционной модели Лэнгмюра:

$$q = (q_{\max} \times C_e) / (b + C_e),$$

где q – связывание ионов металла, мг/г сухой массы сорбента; C_e – равновесная концентрация металла в растворе, мг/л; b – коэффициент сродства

экспериментального образца к металлу, л/мг; q_{max} – максимальное связывание металла в данных условиях, мг/г [6]. Расчет параметров сорбционной активности с помощью сорбционной модели Лэнгмюра проводили по результатам пяти экспериментов.

Для статистического анализа и обработки результатов исследования рассчитывали средние арифметические величины и ошибки средних арифметических. Оценку достоверности различия результатов экспериментальных наблюдений проводили в сравнении с контролем с применением t-критерия Стьюдента для малых величин. Для оценки результатов исследований с несколькими выборками использовали метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими проведением post hoc теста Ткееу's.

Результаты исследования. Для определения оптимальных условий взаимодействия пектинов с металлом исследовали кинетику этого взаимодействия. Максимальную сорбционную емкость каждого образца в отношении катионов свинца, зарегистрированную в ходе соответствующих экспериментов, принимали за 100 %, а количество металла, связанного пектином за 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 и 120 мин, выражали в процентах от максимального значения сорбции. На первом этапе взаимодействия, от начала эксперимента и до 20-й минуты, концентрация металла в среде резко снижалась, насыщение сорбента катионами составляло около 90 %. Полное равновесие устанавливалось на 60-й минуте взаимодействия, дальнейшая инкубация не приводила к изменениям остаточной концентрации свинца, что обусловило выбор оптимального времени взаимодействия образцов пектинов с катионами свинца (рис. 1).

На следующем этапе исследовали зависимость максимальной сорбционной емкости образцов пектина от pH среды в диапазоне от 2 до 6. Для поддержания требуемого значения водородного показателя использовали глицириновый буфер (глицерин/ HNO_3) для pH 2 и ацетатный (уксусная к-та/ $NaOH$) для pH 4 и 6.

Форма кривых связывания катионов свинца исследуемыми образцами соответствовала изотермам Лэнгмюра (рис. 2–4). Поэтому сорбционную модель Лэнгмюра использовали для установления коэффициентов сродства образцов к свинцу и максимальной сорбционной емкости пектинов. Данная математическая модель предполагает наличие гомогенной поверхности у сорбента и ограниченного числа мест связывания. Известно,

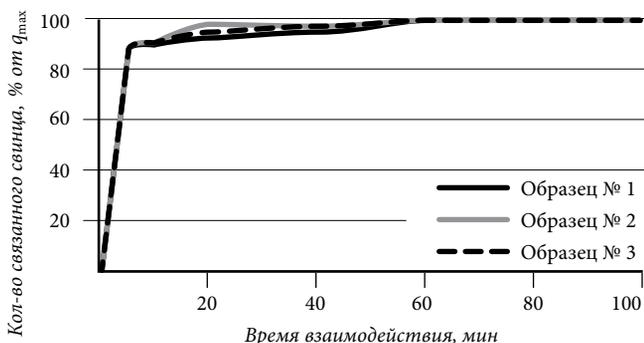


Рис. 1. Кинетика связывания свинца пектинами различной молекулярной массы.

что показатель максимальной сорбционной емкости является математическим отображением количества активных центров, которые могут взаимодействовать с молекулами сорбата. Коэффициент сродства (аффинитета) указывает на прочность возникающих связей и скорость образования комплекса «сорбент–металл».

Снижение молекулярной массы пектинов приводило к увеличению максимальной сорбционной емкости при всех значениях pH (рис. 2–4). Данный показатель у пектина с молекулярной массой 5–10 кДа при pH 2 превосходил таковой пектинов с молекулярной массой 48,6 кДа в среднем в 2,5 раза, при pH 4 и 6 – в 1,4 раза. Наоборот, показатель сродства пектинов к металлу с уменьшением молекулярной массы снижался. У пектина с молекулярной массой 5–10 кДа при pH 2 он был меньше, чем у пектина с молекулярной массой 48,6 кДа, в среднем в 2,5 раза, при pH 4 – в 1,4 раза, при pH 6 – в 1,3 раза (табл. 2).

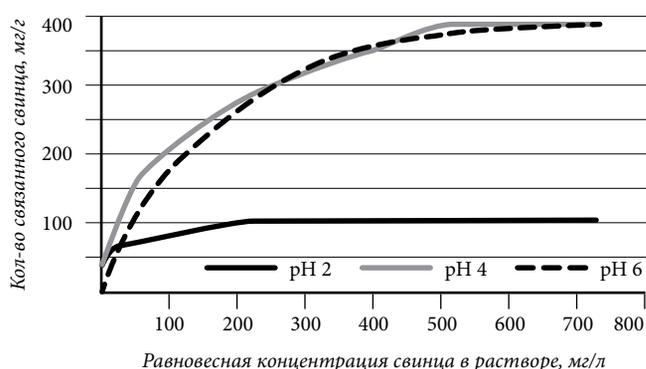


Рис. 2. Изотерма сорбции свинца образцом № 1 при pH 2–6.

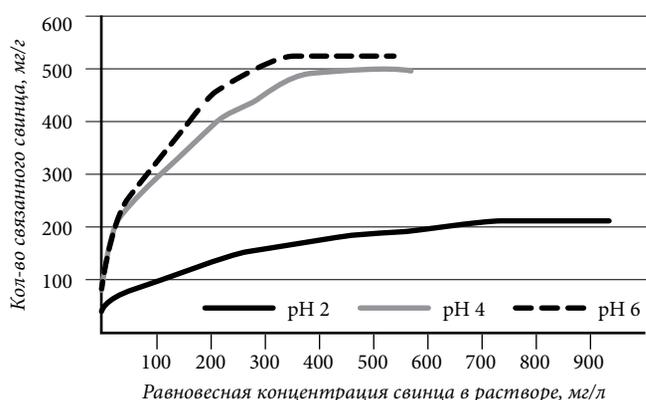


Рис. 3. Изотерма сорбции свинца образцом № 2 при pH 2–6.

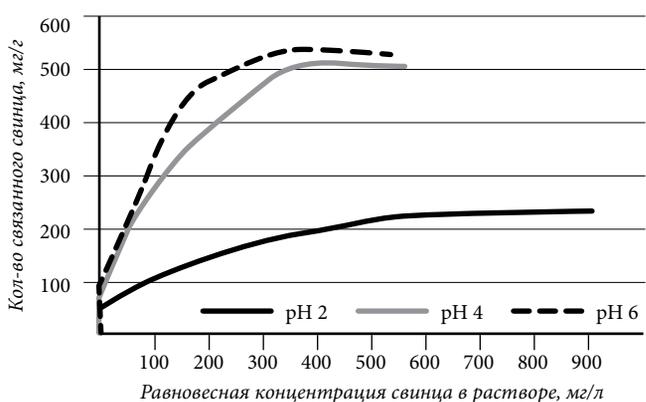


Рис. 4. Изотерма сорбции свинца образцом № 3 при pH 2–6.

Таблица 2

Экспериментальные константы Лэнгмюра для связывания свинца пектинами при различных значениях рН

рН	№ образца	q_{\max} , мг/г	b , л/мг	R^{2*}
2	1	107,32±3,57	0,0093±0,000320	0,997
	2	239,45±2,24	0,0042±0,000039	0,984
	3	266,30±8,37	0,0037±0,000116	0,988
4	1	435,41±4,46	0,0023±0,000023	0,991
	2	575,97±1,66	0,0017±0,000005	0,989
	3	588,21±11,38	0,0017±0,000032	0,976
6	1	475,44±4,68	0,0021±0,000021	0,995
	2	605,94±5,89	0,0016±0,000016	0,993
	3	643,93±11,06	0,0016±0,000026	0,980

* Коэффициент достоверности аппроксимации.

Обсуждение полученных данных. Снижение молекулярной массы пектинов приводило к незначительному увеличению скорости установления равновесия между экспериментальными образцами пектинов и катионами свинца, находившимися в растворе. Также было установлено, что с ростом рН от 2 до 6 наблюдалось увеличение показателя максимальной сорбционной емкости пектинов, при дальнейшем увеличении рН происходило образование нерастворимого в воде гидроксида свинца, что затрудняло течение сорбционных процессов. При рН ниже 2 все некрахмальные полисахариды вне зависимости от молекулярной массы седиментировались и теряли сорбционную активность.

Можно констатировать, что уменьшение молекулярной массы пектинов приводит к увеличению максимальной сорбционной емкости по свинцу с одновременным снижением сродства полисахарида к металлу, хотя ранее считалось, что способность пектинов связывать тяжелые металлы не зависит от молекулярной массы [7]. Обнаруженное противоречие можно объяснить следующим образом. Увеличение максимальной сорбционной емкости у низкомолекулярных образцов пектинов может объясняться более высоким содержанием в них АГК. Более высокое сродство к свинцу у высокомолекулярного образца пектина может быть связано с тем, что прочность ионного комплекса пектина с металлом зависит от размера участков молекулы полимера, вовлеченных в формирование комплекса. У крупных молекул длина таких участков и, соответственно, прочность образованных ионных комплексов может быть существенно больше, чем у низкомолекулярных фрагментов молекул, полученных в ходе гидролиза.

Таким образом, полученные образцы пектинов с разной молекулярной массой характеризуются способностью быстро и эффективно связывать ионы свинца, причем свинецсвязывающая активность увеличивается прямо пропорционально снижению молекулярной массы. Поэтому дальнейшее развитие технологии получения стандартизованных препаратов пектинов и создание на их основе препаратов-энтеросорбентов для лечения интоксикации тяжелыми металлами представляется перспективным направлением исследований.

Литература

1. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В., Хотимченко М.Ю. Фармакологические свойства пектинов // Эфферентная терапия. 2001. Т. 7, №4. С. 22–36.
2. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., Бедняк А.Е. и др. Фармакология некрахмальных полисахаридов // Вестник ДВО РАН. 2005. № 1. С. 72–82.
3. Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // Carbohydr. Res. 2009. Vol. 344. P. 1879–1900.
4. Dongowski G., Lorenz A., Proll J. The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro // J. Nut. 2002. Vol. 132. P. 1935–1944.
5. Dongowski G., Lorenz A. Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by in vitro treatment of pectin with human faecal flora // Carbohydr. Res. 1998. Vol. 314. P. 237–244.
6. Igwe J.C., Abia A.A. Adsorption isotherm studies of Cd (II), Pb (II) and Zn (II) ions bioremediation from aqueous solution using unmodified and EDTA-modified maize cob // Ecl. Quím., São Paulo. 2007. No. 32 (1). P. 33–42.
7. Khon R. Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin // Carbohydrate Research. 1987. No.160. P. 343–353.
8. Khotimchenko M.Y., Kovalev V.V., Khotimchenko Y.S. Equilibrium studies of sorption of lead (II) ions by different pectin compounds // J. Hazard. Mater. 2007. Vol. 149. P. 693–699.
9. Khotimchenko M., Kovalev V., Kolenchenko E., Khotimchenko Y. Acidic method for the low molecular pectin preparation // Int. J. Pharm. Pharmaceutical Sci. 2012. Vol. 4., Suppl. 1. P. 279–283.
10. Levitskaia T.G., Creim J.A., Curry T.L. et al. Biomaterial for the decorporation of (85)Sr in the rat // Health Phys. 2010. Vol. 99. P. 394–400.
11. Pastuszewska B., Kowalczyk J., Ochtabińska A. Dietary carbohydrates affect caecal fermentation and modify nitrogen excretion patterns in rats. I. Studies with protein-free diets // Arch. Tierernahr. 2000. Vol. 53. P. 207–225.
12. Pilnik W., Rombouts F.M. Polysaccharides and food processing // Carbohydr. Res. 1985. Vol. 142. No. 1. P. 93–105.
13. Saito D., Nakaji S., Fukuda S. et al. Comparison of the amount of pectin in the human terminal ileum with the amount of orally administered pectin // Nutrition. 2005. Vol. 21. P. 914–919.
14. Terpstra A.H., Lapre J.A., de Vries H.T., Beynen A.C. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma and liver cholesterol concentration and plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters // J. Nutr. 1998. Vol. 128. P. 1944–1949.
15. Thibault J.F., Rinaudo M. Chain association of pectic molecules during calcium induced gelation // Biopol. 1986. Vol. 25. P. 455–468.

Поступила в редакцию 29.01.2013.

COMPARATIVE LEAD-BINDING ACTIVITY OF PECTINS WITH DIFFERENT MOLECULAR MASS IN VITRO

K.E. Makarova¹, E.V. Khozhaenko^{2,3}, R.Yu. Khotimchenko³, V.V. Kovalev³

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² School of Biomedicine of the Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), ³ A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690059 Russian Federation)

Summary – The paper describes kinetics of binding of lead ions with low-etherized pectins with different molecular masses determined by means of acid hydrolysis. The authors have determined indices of maximum metal-binding activity of the pectin specimen under study with the environmental pH range of 2 to 6. The Langmuir adsorption model was used to describe adsorption isotherms and calculate adsorption parameters. As reported, as the molecular mass of pectins reduces, the maximum adsorption capacity reliably increases and the affinity of pectin to lead ions decreases.

Key words: adsorption, pectins, lead.