

**ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ
И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ**

УДК 541.6

**КОМПЛЕКСЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОЛИГОЭТИЛЕНИМИНОВ
С ПОЛИАКРИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ РАЗЛИЧНОЙ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ В РАСТВОРАХ**

© 2022 г. В. И. Фетина¹, А. А. Лезов^{1,*}, П. А. Фетин¹, А. С. Губарев¹, А. А. Лезова¹,
В. Б. Рогожин¹, И. М. Зорин¹, Н. В. Цветков¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: a.a.lezov@spbu.ru

Поступила в редакцию 31.12.2021 г.

После доработки 02.02.2022 г.

Принята к публикации 02.02.2022 г.

Методами динамического рассеяния света, вискозиметрии и аналитического ультрацентрифугирования определены молекулярные характеристики полиакриловой кислоты (ПАК) в условиях, близких к физиологическим. Получены уравнения Марка–Куна–Хаувинка, определены равновесная жесткость ПАК и гидродинамический диаметр полимерной цепи. Исследован процесс формирования комплекса ПАК с модельными олигоэтиленимином: диэтилентриамином, триэтилентетраамином, пентаэтиленгексаамином. При смешении в фосфатном буфере олигоэтилениминов с полиакрилатом натрия происходит формирование комплекса. Установлено, что в растворе присутствуют частицы, гидродинамические радиусы которых соответствуют исходной ПАК, а также крупные частицы комплекса. Понижение pH среды приводило к увеличению доли крупных частиц в растворе.

DOI: 10.56304/S1992722322030049

ВВЕДЕНИЕ

Разработка полимерных материалов, которые могут быть использованы в конструировании систем доставки лекарств, является приоритетным направлением развития науки о полимерах [1]. Полиакриловая кислота (ПАК) – широко исследованный полиэлектролит, играющий главную роль при создании таких систем [2]. Это подтверждается большим количеством работ по исследованию как самой ПАК, так и ее комплексов с многозарядными катионами металлов, интерполиэлектролитных комплексов (продуктов взаимодействия с противоположно заряженными полиэлектролитами) [3–6]. Однако исследованиям ПАК в физиологических условиях, моделируемых с помощью фосфатного буфера (ФБ), уделено недостаточно внимания. Например, отсутствуют данные о жесткости полимерной цепи в ФБ. Отсутствуют уравнения Марка–Куна–Хаувинка (МКХ) для “физиологических условий”, более того, нет сведений о том, является ли растворяющая система – ФБ 37°C – хорошим растворителем для ПАК или нет. Это послужило отправной точкой для исследований, представленных в настоящей работе. Недостаточными являются также данные о комплексах ПАК с мультитарядными органическими противоионами, хотя такие органические объекты, как спер-

мин и спермидин, являются биогенными олигоэтиленимином, встречающимися в живом организме.

Цель данной работы – изучение конформационных характеристик ПАК в физиологических условиях ФБ, а также исследование возможности формирования комплекса ПАК с модельными олигоэтиленимином: диэтилентриамином (ДЭТА), триэтилентетраамином (ТЭТА), пентаэтиленгексаамином (ПЭГА).

МЕТОДЫ

Исследования методом динамического рассеяния света (ДРС) проводили на установке “Photocor Complex” (Photocor Instruments Inc., Moscow, Russia) с коррелятором реального времени (288 каналов, 10 нс), стандартным гониометром (0°–150°) и термостатом ($\pm 0.05^\circ\text{C}$). Источником света – лазер с длинами волн $\lambda_0 = 405$ и 654 нм; эксперименты проводили в диапазоне углов рассеяния θ от 30° до 140° при температуре 25 ± 0.1 и $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Автокорреляционные функции интенсивности рассеянного света были обработаны с использованием программы DynaLS, которая позволяет получить распределение $\rho(\tau)$ интенсивностей рассеянного света по временам релаксации τ . Зависимость между $1/\tau$, где τ отвечает максимуму

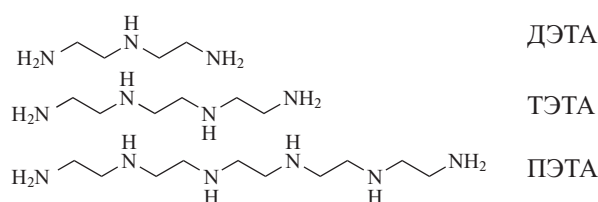


Рис. 1. Структурные формулы веществ диэтилентриамин (ДЭТА), триэтилтетрамин (ТЭТА), пентаэтиленгексамин (ПЭТА).

распределения $\rho(\tau)$, и квадратом вектора рассеяния $q^2 = [(4\pi n_0/\lambda_0) \sin(\theta/2)]^2$ (n_0 – показатель преломления раствора) для всех исследованных образцов представляла собой прямую, проходящую через начало координат, что указывает на диффузионный характер наблюдаемого процесса $1/\tau = Dq^2$, D – коэффициент поступательной диффузии. Гидродинамический радиус был рассчитан по формуле Стокса–Эйнштейна:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D_0},$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η_0 – вязкость растворителя.

Измерения вязкости исследованных образцов проводили в капиллярном вискозиметре (Anton Paar LOVIS 2000M) на основе принципа Гепплера. Полученные значения динамической вязкости раствора η усредняли по ряду углов и использовали при расчетах приведенной вязкости $\eta_{пр}$:

$$\eta_{пр} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}.$$

После экстраполяции к бесконечному разбавлению концентрационной зависимости приведенной вязкости определяли характеристическую вязкость исследуемого полимера $[\eta]$ с использованием следующего соотношения:

$$\eta_{пр} = [\eta] + c[\eta]^2 k'.$$

Здесь k' – безразмерная постоянная Хаггинса, характеризующая систему полимер–растворитель.

Измерения плотности проводили на лабораторном плотнотоме DM40 (Mettler Toledo, Швейцария).

Эксперименты по аналитическому ультрацентрифугированию проводили с использованием аналитической ультрацентрифуги (АУЦ) “ProteomeLab XL-I Protein Characterization System” (Beckman Coulter, Inc., Бреа, США). Частота вращения ротора – 40000 об./мин. Седиментацию исследуемых образцов наблюдали с помощью рэлеевской интерференционной оптической системы, оснащенной красным лазером (длина волны

655 нм) в качестве источника света. Обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Sedfit. Были определены коэффициенты седиментации образцов s , из концентрационной зависимости $s^{-1} = s_0^{-1}(1 + k_s c + \dots)$ определен коэффициент Гралена (k_s) и коэффициент седиментации при бесконечном разбавлении (s_0). С помощью определенных значений коэффициента седиментации (s_0) и коэффициента диффузии (D_0) молекулярные массы $M_{s,D}$ образцов были рассчитаны по уравнению Сведберга:

$$M_{s,D} = \frac{s_0}{D_0} \frac{kTN_A}{(1 - \bar{v}\rho_0)}, \quad (1)$$

где \bar{v} – удельный парциальный объем исследуемой макромолекулы. При обработке данных были использованы следующие параметры изучаемой системы: $\eta_0 = 0.709$ сП, $\rho_0 = 1.00012$ г/см³ и $\bar{v} = 0.71$ см³/г.

МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали образцы полиакрилата натрия ПА-Na-2, ПА-Na-3, ПА-Na-4 (Акремон D1, Акремон D-1нм, Акремон D-20 Оргполимерсинтез, СПБ). Очистку этих полимеров проводили методом диализа через полупроницаемые мембраны (Sigma-Aldrich, 14000 Да). Диализ выполняли последовательно против 0.5 М раствора NaCl и деионизованной воды. Использовали как минимум трехкратную смену растворителя в течение 24 ч. Из водных растворов полимер выделяли методом криосублимационной сушки. Низкомолекулярный образец полиакриловой кислоты ПАК-1 ($M = 2000$) и образец ПА-Na-5 ($M = 450000$) использовали без очистки (Sigma-Aldrich). ДЭТА, ТЭТА, ПЭТА, структурные формулы которых приведены на рис. 1, были использованы без дополнительной очистки (Sigma-Aldrich).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование образцов полиакриловой кислоты

Образцы ПАК и ПА-Na исследовали в воде при добавлении 0.05 М NaCl при температуре 25°C, а также в ФБ при температуре 37°C. При данных условиях концентрационные зависимости приведенной вязкости и коэффициента поступательной диффузии имели линейный характер. Это свидетельствует о, по крайней мере, частичном подавлении полиэлектролитного набухания исследованных полимеров.

Распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам для исследованных образцов, полученные методом ДРС, характеризовались одним основным пиком.

Методом скоростной седиментации были получены распределения по коэффициентам седиментации ряда образцов ПАК различных молекулярных масс в ФБ при 37°C (рис. 2). Эксперименты проводили в достаточно широком диапазоне концентраций при соблюдении условия разбавленных растворов с целью определения коэффициентов седиментации s_0 в пределе бесконечного разбавления (табл. 1).

Молекулярную массу M_{sD} исследованных образцов определяли из данных, полученных методами ДРС и скоростной седиментации АУЦ (табл. 1) с использованием соотношения Сведберга (1). Гидродинамический инвариант исследованных образцов в ФБ и 0.05 М NaCl определяли согласно соотношению $A_0 = \sqrt[3]{M_{sD}[\eta]\eta_0 D_0/T}$. Среднее значение A_0 оказалось близким к 3.3×10^{-10} Эрг/К. Значение M_{sD} , полученное в ФБ, использовали для дальнейшего конформационного анализа как в ФБ, так и для систем в 0.05 М NaCl.

ОБСУЖДЕНИЕ

Конформация макромолекул ПАК

На рис. 3 представлены эмпирические зависимости МКХ для исследованных образцов, полученные в ФБ при 37°C и в 0.05 М NaCl при 25°C. В двойном логарифмическом масштабе их аппроксимировали прямыми, коэффициент наклона данных прямых соответствовал показателю степени в уравнениях МКХ.

Таблица 1. Молекулярные характеристики серии образцов ПА-Na, полученные в ФБ при 37°C (1) и в 0.05 М NaCl при 25°C (2)

Образец	Условия среды	$[\eta]$, дл/г	K_H	$D_0 \times 10^7$, см ² /с	s_0 , Св	$M_{sD} \times 10^{-3}$, г/моль	$A_0 \times 10^{10}$, Эрг/К	$M_{D\eta} \times 10^{-3}$, г/моль
ПАК-1	1	0.04	*	26.5	1.1	4	3.2	4
	2	0.05	0.41	16.4			2.8**	
ПА-Na-2	1	0.25	0.27	7.1	2.6	33	3.3	36
	2	0.37	0.18	4.9			3.4**	
ПА-Na-3	1	0.51	*	4.3	3.6–	74	3.3	80
	2	0.67	0.46	2.9			3.2**	
ПА-Na-4	1	0.92	0.21	2.7	5.1	168	3.3	180
	2	1.42	0.23	1.8			3.3**	
ПА-Na-5	1	4.39	*	1	12.2–	1084	3.8	739
	2	5.3	0.34	0.7			3.8**	

* Величина характеристической вязкости определялась с использованием соотношения $[\eta] = \frac{(2(\eta/\eta_0) - 1 - \ln(\eta/\eta_0))^{0.5}}{c}$.

** Величина гидродинамического инварианта A_0 определялась с использованием величины M_{sD} , полученной для образцов в ФБ.

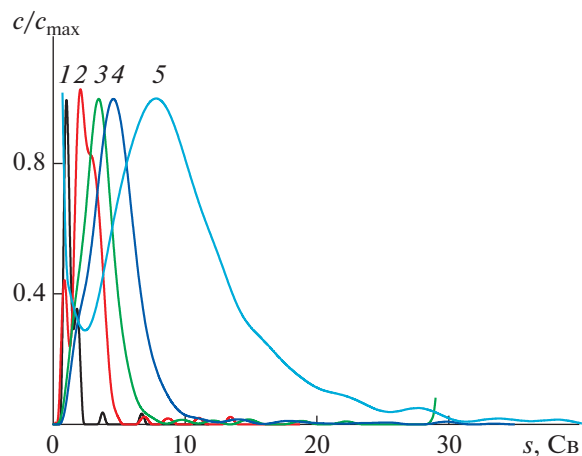


Рис. 2. Нормированные распределения по коэффициентам седиментации, разрешенные в программе Sedfit с использованием модели $c(s)$, для образцов ПАК различных молекулярных масс (ПАК-1 (1), ПА-Na-2 (2), ПА-Na-3 (3), ПА-Na-4 (4) и ПА-Na-2 (5)) в ФБ при 37°C.

Уравнения для ПАК в 0.05 М NaCl:

$$D_0 = 2.2 \times 10^{-4} M_{D\eta}^{-0.59},$$

$$[\eta] = 2.1 \times 10^{-5} M_{D\eta}^{0.92}.$$

Уравнения для ПАК в ФБ:

$$D_0 = 4.8 \times 10^{-4} M_{D\eta}^{-0.62},$$

$$[\eta] = 0.3 \times 10^{-5} M_{D\eta}^{1.04}.$$

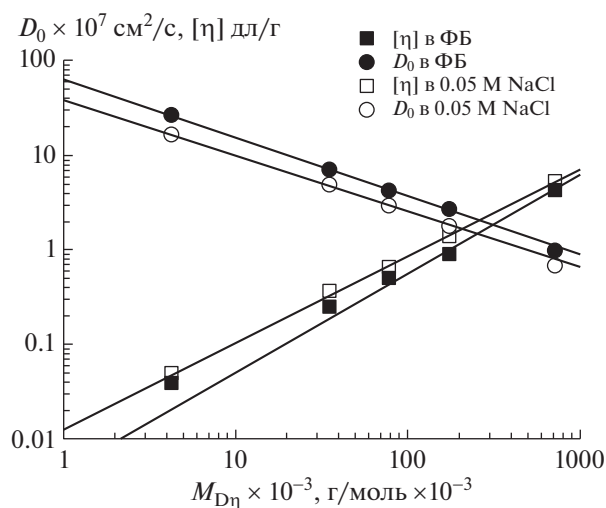


Рис. 3. Молекулярно-массовые зависимости характеристической вязкости и коэффициента поступательной диффузии исследованных образцов в ФБ при 37°C и в 0.05 М NaCl при 25°C.

Показатели степени в уравнениях МКХ для коэффициентов поступательной диффузии оказались равными $\nu = -0.62$ для полимеров в ФБ при 37°C и $\nu = -0.59$ в 0.05 М NaCl при 25°C. Показатели степени в уравнениях для характеристической вязкости для обеих систем оказались близкими к единице. Столь высокие показатели степени свидетельствуют о значительном набухании исследованных полимеров в водном 0.05 М растворе NaCl и в ФБ.

Величина равновесной жесткости макромолекулы A может быть рассчитана с использованием соотношения [7]:

$$\frac{kTM_L^{0.5}}{\eta_0 P_0 DM_{D\eta}^{0.5}} = A^{0.5} + 0.201BA^{-2}M_L^{0.5}M_{D\eta}^{0.5},$$

где M_L – молекулярная масса единицы длины цепи, P_0 – постоянная величина, равная 5.11, B – параметр, характеризующий взаимодействие полимер–растворитель. Значение M_L можно рассчитать, если отнести молярную массу мономерного звена к длине его проекции на направление полной вытянутости цепи.

Величина длины сегмента Куна, рассчитанная таким образом, оказалась равной 2 нм для систем в ФБ и 0.05 М NaCl (рис. 4).

Величина гидродинамического диаметра цепи может быть определена из соотношения $d = \sqrt{\frac{4M_L}{\pi N_A} \bar{\nu}}$. Величина $d = 0.7$ нм для ПАК с молярной массой мономерного звена $M_0 = 72$ г/моль и $d = 0.8$ нм для полиакрилата натрия с массой мо-

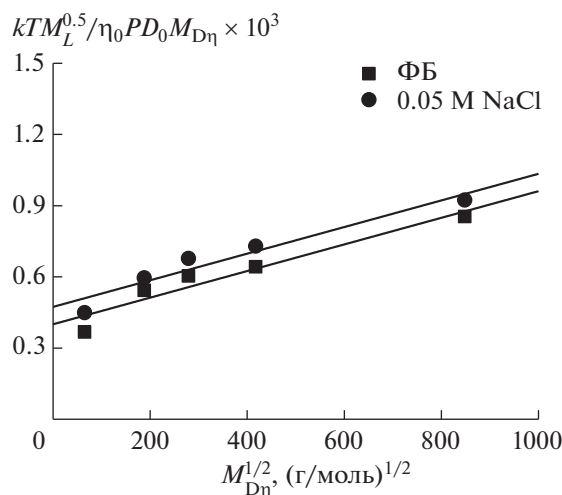


Рис. 4. Зависимость $kTM_L^{0.5}/\eta_0 P_0 DM_{D\eta}^{0.5}$ от $M_{D\eta}^{0.5}$ образцов ПА в ФБ и 0.05 М NaCl.

номерного звена $M_0 = 94$ г/моль. Различие в рассчитанных таким образом значениях d незначительное и примерно соответствует химической структуре мономера. Величина представляется несколько завышенной, по-видимому, вследствие несовершенства модели.

Длина сегмента Куна и гидродинамический диаметр цепи исследованных полимеров также были рассчитаны с применением теории, полученной в [8] (рис. 5).

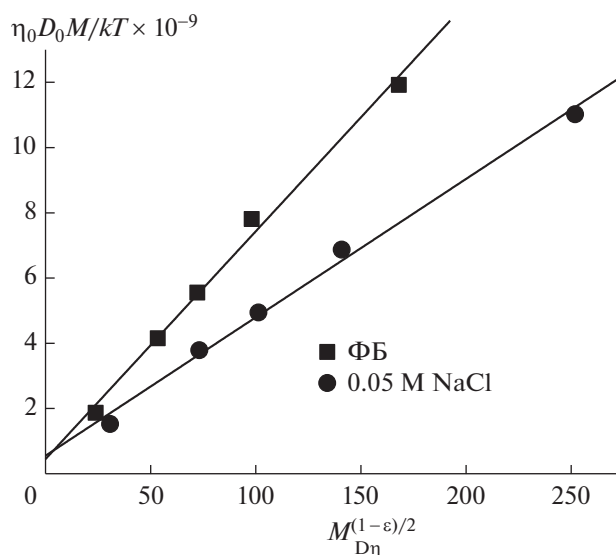


Рис. 5. Зависимость $\eta_0 DM_{D\eta}/kT$ от молекулярной массы ПАК в степени $(1 - \epsilon)/2$, для исследованных образцов ФБ ($\epsilon = 0.24$) и 0.05 М NaCl ($\epsilon = 0.18$).

Для полимеров в ФБ равновесная жесткость составила 3 нм, а гидродинамический диаметр цепи 0.11 нм. Для полимеров в 0.05 М NaCl равновесная жесткость составила 5 нм, а гидродинамический диаметр цепи 0.17 нм. Можно предполагать, что причиной того, что в 0.05 М NaCl определяемая величина равновесной жесткости несколько выше, чем в ФБ, может служить электростатическое взаимодействие близких по цепи звеньев. Численно это взаимодействие выражают величиной электростатической персистентной длины, которая аддитивна сегменту Куна полимера. Увеличение концентрации фонового электролита в растворе с 0.05 М до более чем 0.1 М в ФБ приводит к подавлению этой составляющей электростатического взаимодействия.

Полученные значения равновесной жесткости находятся в соответствии с результатами, описанными в литературе для водно-солевых систем; так, согласно [10] величина сегмента Куна для ПАК лежит в диапазоне $1.6 < A < 2.8$ нм (метод рентгеновского рассеяния), согласно [11] равна 4.2 нм (методы рассеяния света).

Комплексы полиакриловой кислоты с олигоэтилениминами

В работе исследовали комплексы ПАК с олигоэтилениминами (ДЭТА, ТЭТА, ПЭГА). Получали комплексы путем смешения растворов полиэлектролита с олигоэтиленимином при выбранном отношении NH/COO^- . Концентрацию ПАК выбирали из условия постоянства объемной доли полимера в растворе, которое составляло $[\eta] = 0.25$. После смешения растворы дополнительно перемешивали, а затем анализировали методом ДРС. Отметим, что полученные комплексы оставались стабильными по крайней мере в течение нескольких суток.

На первом этапе работы варьировали два параметра. Это соотношение компонент комплекса, которое выражалось в численном отношении числа аминогрупп используемого олигоэтиленимина к числу COO^- групп ПАК или ПА-Na. Эти исследования проводили с использованием образца ПА-Na-2, так как его молекулярная масса близка к величине в 30 000, которая является предельной для фармакологического применения. Вторым параметром являлось количество аминогрупп в олигоэтиленимине.

На рис. 6 представлены зависимости гидродинамических радиусов частиц, присутствующих в растворах исследованных комплексов, от соотношения NH/COO^- , полученных методом ДРС. В отсутствие олигоэтилениминов комплексы характеризовались одним основным пиком, соответствующим диффузии индивидуальных макро-

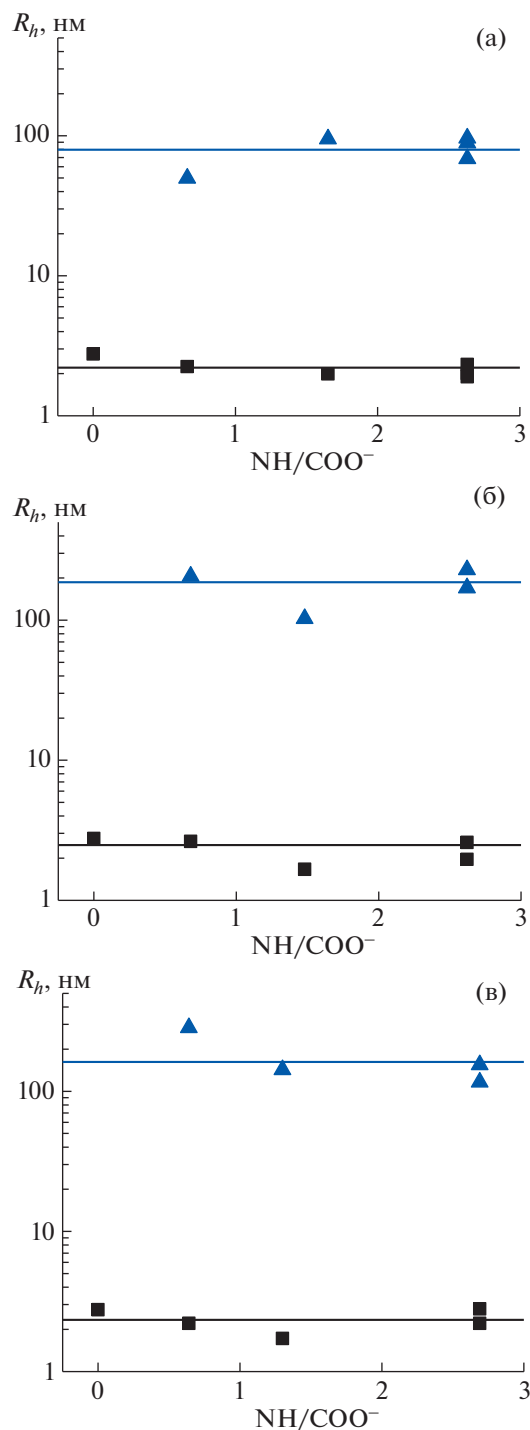


Рис. 6. Зависимости размеров комплексов ПА-Na-2 с олигоэтилениминами: ДЭТА (а), ТЭТА (б) и ПЭГА (в) от соотношения NH/COO^- .

молекул ПА-Na. Положение этого пика для всех исследованных систем сохранялось при любом соотношении зарядов и pH среды. Это свидетельствует о том, что в этих системах присутствует большое число макромолекул свободного ПА-Na.

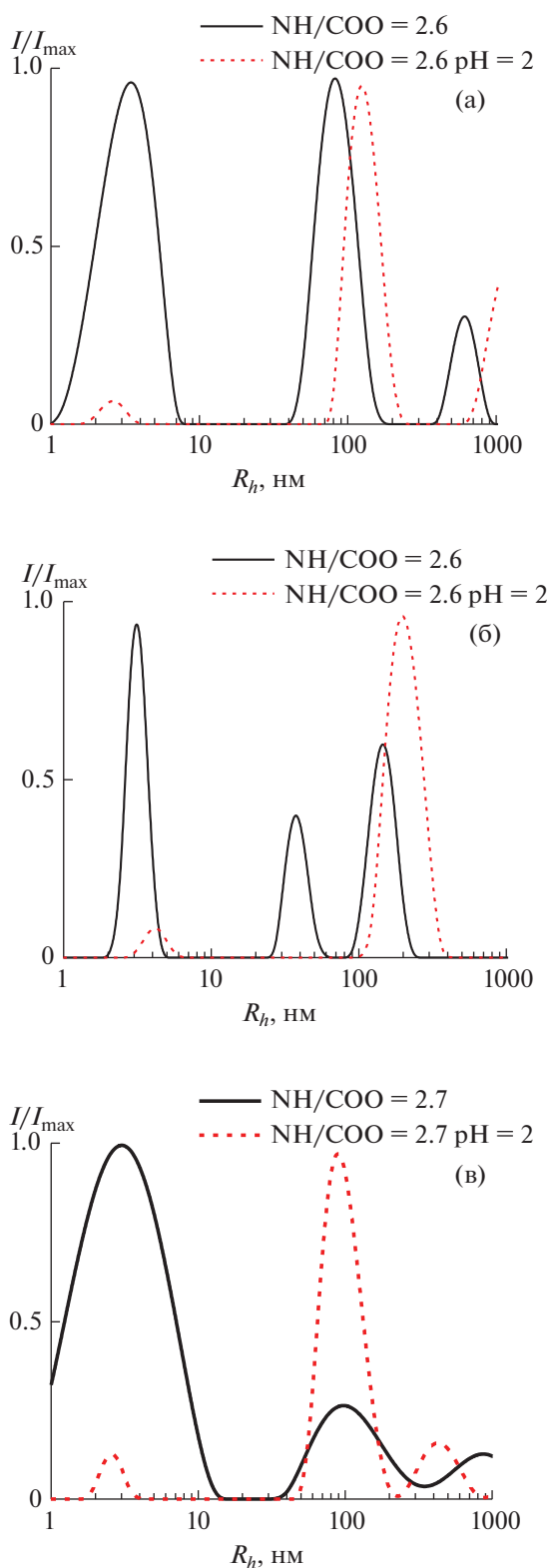


Рис. 7. Распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам, полученные для комплексов ПА-Na-2 с олигоэтилениминами: ДЭТА (а), ТЭТА (б) и ПЭТА (в) с максимальным соотношением NH/COO^- для нейтральных и низких pH среды.

Второй важной компонентой системы являлся пик в районе 100–200 нм. Можно предполагать, что он соответствует диффузии полученных комплексов. В системах также встречались частицы промежуточного размера ~10–20 нм, однако их вклад в интенсивность рассеяния был достаточно мал.

На рис. 7 представлены распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам, полученные методом ДРС в растворах комплексов ПА-Na-2 с тремя различными олигоэтилениминами при максимальном отношении NH/COO^- при нейтральном и низком pH. Для всех полученных систем наблюдалось перераспределение вкладов в рассеяние при переходе в кислую среду, доля крупных частиц с $R_h \sim 100$ нм значительно возрастала в сравнении с системами с нейтральным pH. Отметим, что изменения положения пиков при изменении pH практически не происходило. По всей видимости, при низких pH аминокислотные группы олигоэтилениминов приобретают положительный заряд за счет протонирования. Это способствует комплексообразованию с ПАК.

На втором этапе были проведены исследования влияния молекулярной массы ПА-Na на характеристики комплексов. Для этого помимо образца ПА-Na-2 были взяты образцы ПАК-1 и ПА-Na-4 с более чем 40-кратным различием в молекулярных массах. В качестве олигоэтиленимина был выбран образец ДЭТА.

В процессе формирования комплексов на образцах разной молекулярной массы в распределениях интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам появляется пик, связанный с диффузией крупных частиц размером ~100 нм. При этом в растворах присутствовали индивидуальные частицы исходного полимера (рис. 8). Переход к кислым средам (pH = 2) вызывал смещение динамического равновесия в сторону образования комплексов ПА-ДЭТА. Для высокомолекулярного образца ПА-Na-4 было также обнаружено, что при переходе в кислую среду гидродинамический радиус индивидуальных макромолекул полимера несколько уменьшается. Возможно, это происходит вследствие взаимодействия указанных макромолекул с ионизованным в кислой среде олигоэтиленимином ДЭТА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами молекулярной гидродинамики и ДРС исследован гомологический ряд образцов полиакрилата натрия в ФБ и 0.05 М водном NaCl. Установлено, что макромолекулы в этих растворителях находятся в набухшем состоянии. Определены равновесная жесткость ПАК и гидродинамический диаметр полимерной цепи в этих растворителях.

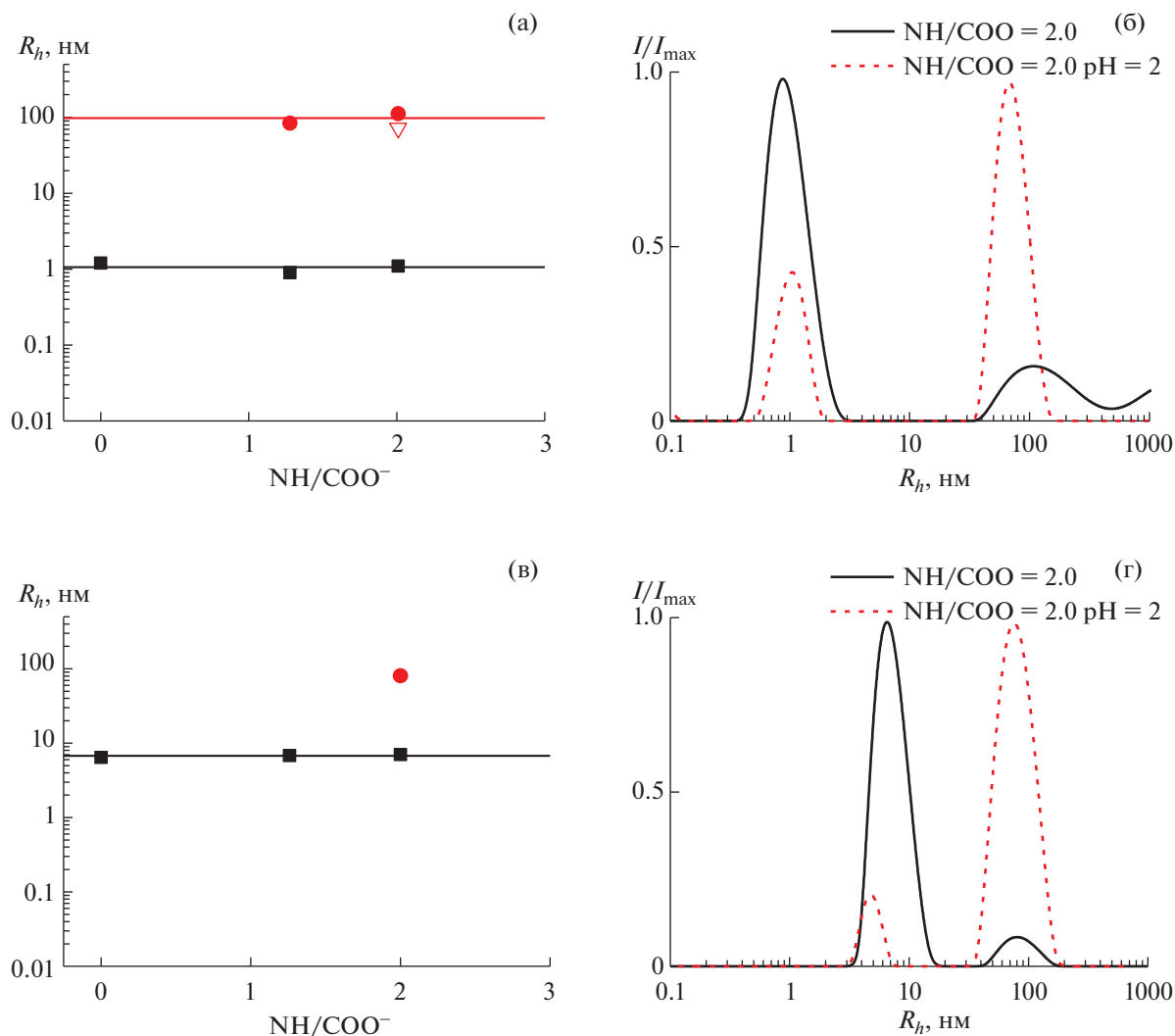


Рис. 8. Зависимости гидродинамических радиусов частиц, обнаруженных в растворах комплексов образцов ПАК-1 (а) и ПА-На-4 (в) с олигоэтиленимином ДЭТА, а также распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам при максимальном отношении NH/COO^- при нейтральном и низком рН среды для комплексов на основе образцов ПАК-1 (б) и ПА-На-4 (г).

При смешении в ФБ олигоэтилениминов с ПАК-На происходит формирование комплекса. Методом ДРС установлено, что в растворе присутствуют моды распределения с размерами, соответствующими гидродинамическим радиусам исходного полиэлектролита ПАК-На, а также крупные частицы комплекса.

Для исследованных в работе образцов практически не наблюдается зависимость размера крупных частиц комплекса от количества аминогрупп в олигоэтиленимине, а также от молекулярной массы ПАК-На.

При понижении рН до 2 наблюдались уменьшение доли малых частиц и увеличение доли крупных частиц комплекса. Размер частиц комплекса при этом меняется незначительно.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-03-00512 А). Эксперименты по аналитическому центрифугированию выполнены на оборудовании центра диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники научного парка СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maitz M.F.* // *Biosurface and Biotribology*. 2015. V. 1. № 3. P. 161. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>
2. *Newman S., Kigbaum W.R., Flory P.J.* // *J. Polym. Sci.* 1954. V. XIV. P. 451.
3. *Платэ Н.А., Васильев А.Е.* Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986. 296 с.

4. *Abzaeva K.A., Voronkov M.G., Lopyrev V.A.* // Polym. Sci. B. 1997. V. 39. № 11–12. P. 409.
5. *Kogej K.* // Adv. Colloid Interface Sci. 2010. V. 158. № 1–2. P. 68.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.04.003>
6. *Tarabukina E.B., Fatullaev E.I., Filippov A.P., Abzaeva K.A.* // Int. J. Polym. Anal. Character. 2019. V. 24. № 1. P. 10.
<https://doi.org/10.1080/1023666X.2018.1514691>
7. *Cowie J., Bywater S.* // Polymer. 1965. V. 6. № 4. P. 197.
[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(65\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0032-3861(65)90041-8)
8. *Tsvetkov V.N.* Rigid-Chain Polymers. New York: Plenum Press, 1989. 490 p.
9. *Gray H.B., Bloomfield V.A., Hearst J.E.* // J. Chem. Phys. 1967. V. 46. № 4. P. 1493.
<https://doi.org/10.1063/1.1840879>
10. *Muroga Y., Noda I., Nagasawa M.* // Macromolecules. 1985. V. 18. № 8. P. 1576.
<https://doi.org/10.1021/ma00150a009>
11. *Schweins R., Hollmann J., Huber K.* // Polymer. 2003. V. 44. № 23. P. 7131.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.07.005>