

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОПОЛИМЕРОВ АКРИЛАМИДА С 2-ГИДРОКСИЭТИЛМЕТАКРИЛАТОМ

© 2022 г. М. В. Соловский^{a,*}, Е. Б. Тарабукина^a, М. Ю. Смирнова^{a,b}, М. С. Борисенко^a

^a Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук,
Большой пр. В.О. 31, Санкт-Петербург, 199004 Россия

^b Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия
*e-mail:msolovskij@mail.ru

Поступило в Редакцию 9 июня 2022 г.

После доработки 29 августа 2022 г.

Принято к печати 5 сентября 2022 г.

В качестве полимерных реагентов для последующей модификации методом радикальной гетерофазной сополимеризации мономеров в пропан-2-оле, инициируемой AIBN, синтезированы сополимеры акриламида с 2-гидроксиэтилметакрилатом, включающие 23.3–45.2 мол% звеньев последнего (M 20000–64000 Да). Ацилирование сополимеров янтарным ангидридом в формамиде в инертной атмосфере получены терполимеры с карбоксильными группами (до 26.5 мол%). Найдены оптимальные условия (температура, продолжительность реакции, молярное соотношение реагирующих компонентов), позволившие добиться высокой (92–95%) степени ацилирования. На основе терполимеров получены нетоксичные полимерные комплексы с 22.9 и 33.0 мас% амикацина, обладающие высокой пролонгированной противотуберкулезной активностью.

Ключевые слова: акриламид, 2-гидроксиэтилметакрилат, сополимер, янтарный ангидрид, степень ацилирования, амикацин, полимерный комплекс

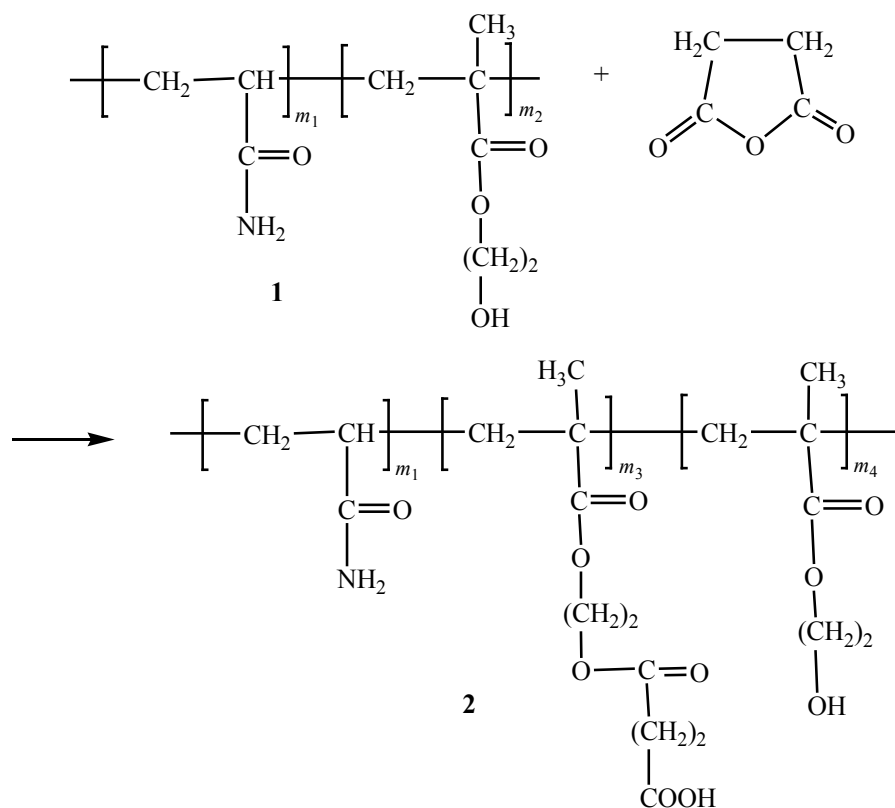
DOI: 10.31857/S0044460X22100080, **EDN:** JYBRQB

Водорастворимые биосовместимые с живым организмом реакционноспособные сополимеры акриламида успешно используются в качестве носителей биологически активных веществ [1]. Сополимеры акриламида с акриловой кислотой применяются для иммобилизации ферментов и модификации аминогликозидных антибиотиков [2]. В сополимерах акриламид–акриловая кислота реакционноспособные карбоксильные группы экранированы основной полимерной цепью. Большой глубины модификации биологически активных веществ сложной структуры полимерами можно достичь при введении в боковую цепь сополимера мостиковой группы между основной полимерной цепью и карбоксильной группой.

Нами предложено вводить такие карбоксильные группы ацилированием сополимеров **1** акриламида с 2-гидроксиэтилметакрилатом янтарным ангидридом (схема 1). Полученные терполимеры **2** с карбоксильными группами могут быть использованы в качестве носителей антибиотика амикацина.

Сополимеры **1** ранее получены сополимеризацией мономеров в воде в присутствии окислительно-восстановительной иницирующей системы персульфат аммония–аскорбиновая кислота [3]. В качестве полимерных реагентов сополимеры **1** не использовались. Мы синтезировали сополимеры **1** гетерофазной сополимеризацией акриламида с 2-гидроксиэтилметакрилатом в пропан-2-оле,

Схема 1.



$$m_1 + m_2 = 100 \text{ мол}\%; m_3 + m_4 = m_2 \text{ мол}\%.$$

инициируемой 2,2'-азобис(изобутиронитрилом) (AIBN) (табл. 1). В одинаковых условиях инициирования характеристическая вязкость сополимеров $[\eta]$ возрастает с увеличением концентрации исходной мономерной смеси (табл. 1, оп. № 1–5, 6, 7), что согласуется с основными закономерностями радикальной (со)полимеризации. По сравнению с составом исходной мономерной смеси сополимеры обогащены звеньями более активного при сополимеризации мономера – 2-гидроксиэтилметакрилата. Сополимеры **1** с 23.3–45.2 мол% звеньев 2-гидроксиэтилметакрилата получены с высоким выходом (94–99%), $[\eta]$ 14–40 см³/г в воде при 25°C.

Для некоторых сополимеров **1** были определены молекулярные и гидродинамические характеристики (табл. 2). Средневесовые молекулярные массы (M_w) сополимеров получены методом све-

торассеяния, M_w 19300–64100 Да. Величины второго вириального коэффициента A_2 малы. Гидродинамические радиусы макромолекул R_h 4.9–6.9 нм. В растворах образцов **1б**, **1ж** и **1з** методом динамического рассеяния света зафиксированы агрегаты с гидродинамическими радиусами $R_h^{\text{агр}} \sim 125$ –140 нм. Распределение по размерам растворенных частиц представлено на рис. 1.

Образование агрегатов может быть связано с гидрофобными взаимодействиями боковых групп в звеньях 2-гидроксиэтилметакрилата. Для определения M_w образцов, проявляющих агрегирование, проводили расчет интенсивности рассеяния света макромолекулами 1^M как долю общей интенсивности рассеяния сополимеров **1**, пропорциональную площади под пиком быстрой моды (R_h) (рис. 1). Величины инкремента показателя преломления dn/dc в 0.5 М. растворе NaCl в пределах

Таблица 1. Сополимеризация акриламида (M_1) с 2-гидроксиэтилметакрилатом (M_2) (пропан-2-ол, 60°C, AIBN 4.5 мас%)

№ опыта	Исходная смесь		Сополимеры			
	$[M_2]$, мол%	$[M_1^{\circ}+M_2^{\circ}]$, мас%	№	Выход, % за 24 ч	m_2 , мол%	$[\eta]^{25}$, см ³ /г (H ₂ O)
1	25	10	1а	99.7	27.8	14
2	25	15	1б	99.5	23.3	21
3	25	20	1в	98.8	26.2	25
4	25	25	1г	98.3	27.8	27
5	25	30	1д	97.7	28.6	40
6	30	10	1е	94.8	35.7	16
7	30	15	1ж	98.5	30.2	23
8	40	15	1з	95.5	45.2	24

погрешности измерений не зависят от m_2 , $dn/dc = 0.159 \pm 0.002$ см³/г. Величины гидродинамических радиусов макромолекул R_h согласуются с величинами M_w .

Для исследования реакции ацилирования использовали сополимер **1а** (27.8 мол% групп OH). Реакцию с янтарным ангидридом проводили в формамиде в атмосфере Ar, изменяя температуру реакции, продолжительность, а также молярное соотношение реагирующих компонентов $n = [\text{янтарный ангидрид}]:[\text{OH}]$ при постоянной концентрации сополимера в растворе 10 мас%. Степень ацилирования (Q , %) рассчитывали как отношение количества групп COOH в полученном терполимере (мол%) к исходному количеству групп OH в сополимере **1а** (мол%).

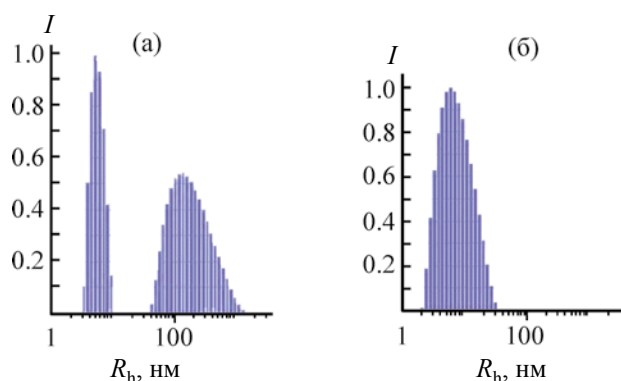


Рис. 1. Распределение интенсивности рассеянного света по гидродинамическим радиусам R_h сополимера **1б** при концентрации раствора $c = 3.49 \times 10^{-2}$ г/см³ (а) и сополимера **1е** при концентрации раствора $c = 4.4 \times 10^{-2}$ г/см³ (б).

При увеличении продолжительности ацилирования (τ) с 6.5 до 48 ч при 100°C, $n = 1.3$, степень ацилирования Q возрастает с 17.6 до 91.7%. Наибольшее увеличение значений Q наблюдается за период с 6.5 до 20 ч. Симбатно степени ацилирования возрастает количество карбоксильных звеньев m_3 в терполимере **2а**. За 48 ч оно достигает 25.5 мол%.

На рис. 2 представлена зависимость Q от n при 100°C, τ 24 ч. С увеличением n от 1.0 до 2.2 степень ацилирования увеличивается от 80 до 87.4%.

Рисунок 3 иллюстрирует зависимость степени ацилирования сополимера **1а** от температуры. Повышение температуры реакции от 70 до 100°C при $n = 2.2$, τ 48 ч приводит к увеличению Q от

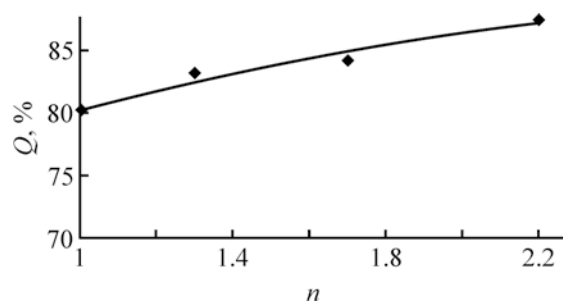


Рис. 2. Зависимость степени ацилирования от молярного соотношения реагирующих компонентов при 100°C (τ 24 ч).

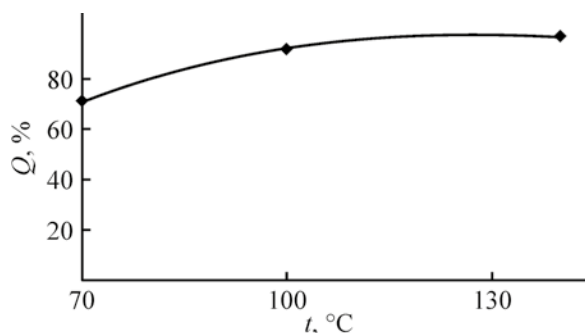
Таблица 2. Молекулярные и гидродинамические характеристики сополимеров акриламид–2-гидроксиэтилметакрилат

Сополимер	m_2 , мол%	dn/dc , см ³ /г	M_w , Да	$A_2 \times 10^4$, см ³ ·моль/г ²	R_h , нм	R_h^{app} , нм
1б	23.3	0.161	19300	4.3	4.9	125
1е	35.7	0.157	24600	4.0	5.1	–
1а	27.8	0.160	30200	2.8	5.3	–
1з	45.2	0.138	42800	1.3	5.7	140
1ж	30.2	0.159	64100	2.1	6.9	140

71.1 до 92.3%. Возрастание температуры еще на 40°C сопровождается увеличением Q до 95.3%. Дальнейшее повышение температуры нецелесообразно, так как возрастают энергозатраты при незначительном увеличении Q . Таким образом, оптимальные условия ацилирования сополимера **1а**: продолжительность реакции 48 ч, $n = 2.2$, 140°C. В этих условиях образуется терполимер **2а** с количеством звеньев m_3 26.5 мол%.

Строение терполимеров **2** подтверждали методом ИК спектроскопии. На рис. 4 представлены спектры терполимера **2а** ($m_3 = 25.5$ мол%) (1), исходного сополимера **1а** (2), спектр (3), полученный вычитанием из ИК спектра (1) ИК спектра (2). На спектре (3) можно обнаружить полосу поглощения около 1700 см⁻¹, характерную для валентных колебаний С=О карбоксила.

Терполимеры **2** использовали в качестве носителей аминогликозидного антибиотика амика-

**Рис. 3.** Зависимость степени ацилирования от температуры при $n = 2.2$ (τ 48 ч).

цина **3** с первичными аминогруппами в молекуле (схема 2).

Амикацин – антибиотик широкого спектра антибактериального действия [4], поражающий микобактерии туберкулеза; как и все аминогликозиды, гепатотоксичен. С целью снижения токсичности амикацина и пролонгирования противотуберкулезной активности проведена модификация антибиотика **3** терполимерами **2а** и **2в** путем комплексообразования основания **3** с терполимерами **2**. Комплексообразование происходило в воде при массовом соотношении антибиотик–терполимер 1:(3–4). Количество антибиотика в полимерах определяли методом УФ спектроскопии, превращая их в комплексы с тринитробензолсульфокислотой [5].

Комплексообразование амикацина **3** с терполимерами **2а** и **2в** подтверждали определением предельной емкости связывания антибиотика **3** терпо-

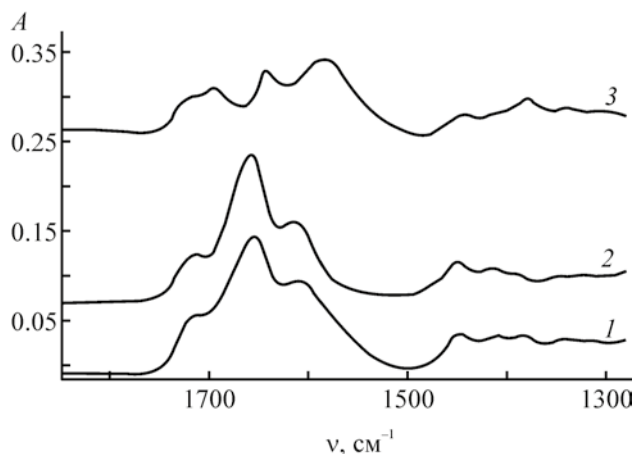
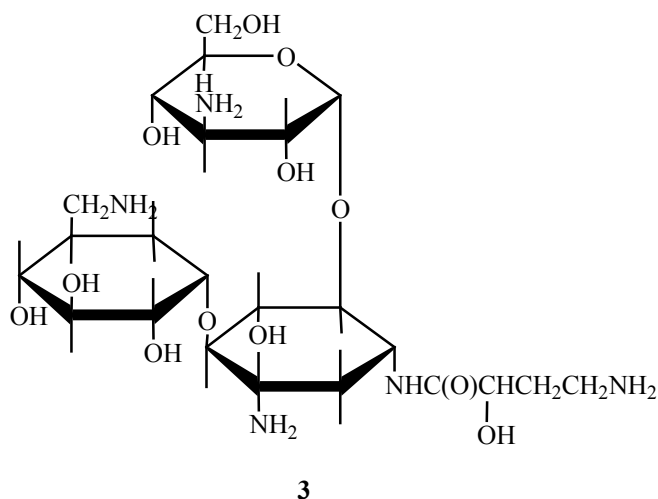
**Рис. 4.** ИК спектры сополимеров в таблетке с КВг. 1 – терполимер **2а** ($m_3 = 25.5$ мол%), 2 – исходный сополимер **1а**, 3 – разность ИК спектров 1 и 2.

Схема 2.



лимерами (*A*, мг/г), титруя навески терполимера 0.03 н. раствором антибиотика **3** (табл. 3).

Как в воде, так и в 0.9%-ном растворе NaCl увеличение количества групп COOH в терполимере приводит к возрастанию предельной емкости связывания. При постоянном значении *m*₃ величина *A* уменьшается в 0.9%-ном растворе NaCl. Это указывает на электростатический характер связывания антибиотика **3** терполимерами **2**.

Сравнительный анализ величин *M*_W и *R*_h, определенных для терполимеров **2** до и после модификации антибиотиками (табл. 4) свидетель-

ствует об их незначительном изменении в результате комплексообразования: *M*_W увеличивается на ~10% при количестве антибиотика **3** в комплексе 23–33%. Гидродинамические радиусы комплексов *R*_h увеличиваются в пределах экспериментальной погрешности ±0.5 нм. Однако изменение *R*_h носит системный характер, что видно из концентрационной зависимости *R*_h (рис. 5), и, следовательно, может приниматься во внимание. Полученные характеристики подтверждают образование комплексов электростатической природы. Аналогичные результаты получены ранее при исследовании ком-

Таблица 3. Предельные емкости связывания амикацина **3** терполимерами **2**

Терполимер 2 , <i>m</i> ₃ мол%	<i>A</i> , мг/г	
	вода	0.9%-ный NaCl
18.9	162.6	125.1
25.5	212.4	163.4

Таблица 4. Молекулярные характеристики полимерных комплексов с амикацином **3** в сравнении с сополимерами

Комплекс	Амикацин 3 , мас%	<i>M</i> _w , Да		<i>R</i> _h , нм	
		сополимер	комплекс	сополимер	комплекс
4a	33.0	30200	33100	5.2	5.4
4б	22.9	19300	20900	4.9	5.0

Таблица 5. Биологические характеристики полимерных комплексов **4** амикацина **3** с терполимерами **2**

Терполимер 2 (m_3 , мол%)	Полимерный комплекс с амикацином 3				
	полимер	выход, %	доля амикацина 3 , мас%	МПК ^a , мкг/мл	LD ₅₀ мг/кг
2a (25.5)	4a	88.1	33.0	1.5	Не определено
2б (21.4 ^б)	4б	93.2	22.9	1.5	1470
Амикацин 3			100	1.5	410

^a МПК – минимальная подавляющая концентрация в отношении *Micobacterium tuberculosis* (штамм H₃₇R_v).

^б Терполимер **2б** получен при ацилировании сополимера **1б** янтарным ангидридом, 48 ч при 100°C, $n = 1.3$.

плексов антибиотиков (аминогликозидов) с сульфосодержащими сополимерами акриламида [6].

Результаты микробиологических испытаний полимерных комплексов антибиотика **3** (табл. 5) свидетельствуют об их высокой противотуберкулезной активности, не уступающей немодифицированному полимерами антибиотику. По параметру токсичности (LD₅₀ при внутрибрюшинном введении мышам) амикацин относится к умеренно токсичным веществам [7], а его полимерные комплексы – к практически нетоксичным препаратам [7] (табл. 5).

Была исследована кинетика выделения антибиотика **3** из его полимерного комплекса **4a** (33 мас% антибиотика **3**) в 0.9%-ный раствор NaCl при 37°C методом диализа через полупроницаемую мембрану (рис. 6). Антибиотик высвобождается из полимерного комплекса на 25.3% за 4 ч,

на 47.7% за 24.5ч, на 58.8% за 48 ч и на 73.4% за 72 ч. Наблюдаемая скорость выделения антибиотика **3** из комплекса достаточна для обеспечения его пролонгированной противотуберкулезной активности.

Таким образом, на основе сополимеров акриламид–2-гидроксиэтилметакрилат, ацилированных янтарным ангидридом, получены нетоксичные водорастворимые полимерные комплексы амикацина с пролонгированной противотуберкулезной активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Акриламид, т. пл. 84°C, перекристаллизовывали из ацетона. 2-Гидроксиэтилметакрилат перегоняли в вакууме над медной стружкой. Отбирали фракцию с т. кип. 87°C (5 мм рт. ст.), n_D^{20} 1.4500 (n_D^{20} 1.4505 [8]).

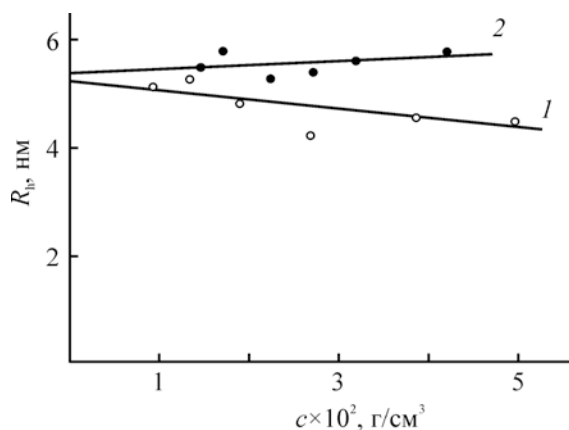


Рис. 5. Зависимость гидродинамических радиусов терполимера **2a** (1) и его комплекса **4a** с амикацином **3** (2) от концентрации.

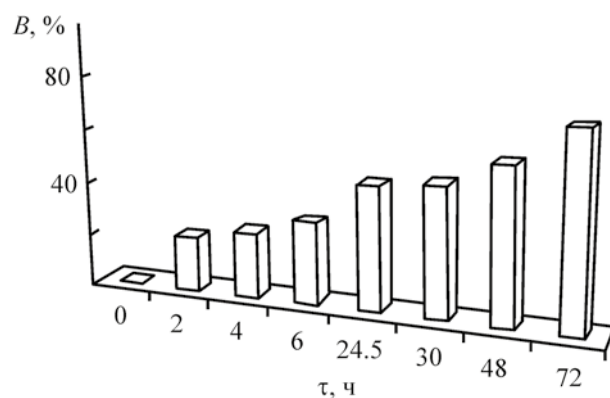


Рис. 6. Кинетика выделения амикацина **3** из полимерного комплекса **4a** (33 мас% амикацина **3**) в 0.9%-ном растворе NaCl при 37°C.

Очистка 2,2'-азобис(изобутиронитрила) (AIBN). 12.0 г AIBN (Индия) растворяли в смеси 25 мл хлороформа и 20 мл этанола на водяной бане при 20–35°C, фильтровали, к фильтрату добавляли 100 мл этанола. Полученный раствор выдерживали 24 ч при –20°C. Выпавший осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Осадок растворяли в смеси 20 мл хлороформа и 15 мл этанола, раствор выдерживали 24 ч при –20°C. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход 8.9 г (74.2 %), т. пл. 103°C.

Сополимер 1a. В ампуле смешивали 0.1086 г AIBN, 0.85 мл 2-гидроксиэтилметакрилата и раствор 1.50 г акриламида в 36 мл пропан-2-ола. Через ампулу пропускали Ar, запаивали и выдерживали 24 ч в термостате при 60±0.5°C. Затем ампулу охлаждали и вскрывали. Выпавший в ампуле сополимер обрабатывали 300 мл диэтилового эфира, отфильтровывали, сушили в вакууме и очищали диализом против воды в течение 24 ч. Выход 2.34 г (97.1%). Количество звеньев 2-гидроксиэтилметакрилата 27.8 мол%.

Терполимер 2a ($m_3 = 25.5$ мол%). 1.30 г сополимера **1a** растворяли в 13 мл формамида. К полученному раствору добавляли 0.54 г янтарного ангидрида, раствор переносили в ампулу и пропускали Ar. Ампулу запаивали и помещали в термостат (100°C) на 48 ч. После охлаждения и вскрытия ампулы вязкий раствор из ампулы по каплям при перемешивании выливали в 400 мл ацетона. Выпавший терполимер отфильтровывали. Выход 1.58 г (94.6%). Количество групп COOH 25.5 мол%.

Амикацин-основание 3. 0.75 г амикацин сульфата растворяли в 30 мл воды. Полученный раствор пропускали через колонку со смолой ЭДЭ 10 П в ОН-форме. Собирали элюат, pH 8.0–10.0, который подвергали лиофильной сушке в сублимационной сушилке FreeZone 6. Выход 0.57 г (75.6%).

Полимерный комплекс 4a амикацина 3. 0.320 г терполимера **2a** растворили в 25 мл воды, при перемешивании добавили 0.106 г амикацина **3**, раствор перемешивали 30 мин при комнатной температуре, замораживали и лиофильно высушивали. Выход 0.396 г (93.2%). Количество амикацина **3** в комплексе **4a** (33.0 мас%) определяли спектрофотометрически, превращая его в комплекс с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, λ_{\max} 340 нм.

Кинетику выделения амикацина **3** из полимерного комплекса **4a** изучали ранее описанным способом [9].

ИК спектры сополимеров снимали на спектрометре Bruker IFS в таблетках с KBr. Электронные спектры поглощения записывали на спектрофотометре Specord M-400. Состав сополимеров **1** устанавливали по данным элементного анализа на азот с помощью анализатора Vario Elemental. Количество карбоксильных групп в терполимерах **2** определяли методом обратного потенциометрического титрования 0.1 н. раствором HCl с использованием pH-метра HI 2210 (Hanna Instruments).

Молекулярные характеристики сополимеров акриламид–2-гидроксиэтилметакрилат определяли методами статического и динамического светорассеяния в 0.5 М. растворе NaCl (за исключением образца **1з**, – в 0.15 М. CH₃COONa). Полимерные комплексы изучали теми же методами в 0.15 М. NaCl, концентрации растворов (0.8–4.4) × 10^{–2} г/см³. Для измерений использовали комплексный прибор Photocor, оснащенный диодным лазером Photocor-DL (λ 659.1 нм), коррелятором Photocor PC 2 с числом каналов 288 и детектором Photocor PD. Средневесовые молекулярные массы M_w рассчитывали согласно теории Дебая [10] по измерениям интенсивности рассеяния света под углом 90°. Гидродинамические радиусы макромолекул R_h определяли динамическим светорассеянием. Для обработки данных ДРС использовали метод регуляризации. Растворы предварительно фильтровали через фильтры диаметром 45 мкм (Chromafil, Macherey-Nagel Cmb Hand Co. KG). Инкременты показателя преломления dn/dc , входящие в формулу расчета M_w , измеряли на рефрактометре RA-620/Kyoto Electronics (Япония).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Соловский Михаил Васильевич, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7950-0873>

Тарабукина Елена Борисовна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0656-6673>

Смирнова Марианна Юрьевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2471-297X>

Борисенко Максим Сергеевич, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9335-5932>

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (рег. № НИОКТР ААА-А-А20-120022090044-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панарин Е.Ф., Лавров Н.А., Соловский М.В., Шальнова Л.И. Полимеры-носители биологически активных веществ. СПб: Профессия. 2014. 299 с.
2. Solovskii M.V., Smirnova M.Yu., Tarabukina E.B., Zakharova N.V., Amirova A.I. // *Adv. Chem. Res.* 2017. Vol. 37. Ch. 5. P. 141.
3. Лавров Н.А., Николаев А.Ф., Кузьмина С.А. // *ЖПХ.* 1989. Т. 62. № 10. С. 2401.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2005. С. 1206.
5. Snyder S.L., Sobocinski P.Z. // *Anal. Biochem.* 1975. Vol. 64. N 2. P. 284.
6. Tarabukina E.B., Solovskii M.V., Pautov V.D., Amirova A.I., Zakharova N.V., Smirnova M.Yu., Anan'eva T.D., Imanbaev R.T., Eroпкиn M.Yu., Eroпкиna E.M. // *J. Bioact. Compatible Polym. Biomed. Appl.* 2015. Vol. 30. N 11. P. 571. doi 10.1177/0883911515592258
7. Березовская И.В. // *Хим.-фарм. ж.* 2003. Т. 37. № 3. С. 32; *Berezovskaya I.V.* // *Pharm. Chem. J.* 2003. Vol. 37. N 3. P. 32. doi 10.1023/A:1024586630954
8. Лавров Н.А. Полимеры на основе 2-гидроксиэтилметакрилата. СПб: Профессия. 2017. 175 с.
9. Соловский М.В., Никольская Н.В., Заикина Н.А. // *Хим.-фарм. ж.* 2002. Т. 36. № 2. С. 9; *Solovskii M.V., Nikol'skaya N.V., Zaikina N.A.* // *Pharm. Chem. J.* 2002. Vol. 36. N 2. P. 7. doi 10.1023/A:1016051612229
10. Kratochvil P. Classical light scattering from polymer solution. Amsterdam: Elsevier, 1987.

Synthesis of Modified Acrylamide Copolymers with 2-Hydroxyethyl Methacrylate

M. V. Solovskij^{a,*}, E. B. Tarabukina^a, M. Yu. Smirnova^{a,b}, and M. S. Borisenko^a

^a Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

^b Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

*e-mail: msolovskij@mail.ru

Received June 9, 2022; revised August 29, 2022; accepted September 5, 2022

Copolymers of acrylamide with 2-hydroxyethyl methacrylate were synthesized by radical heterophase copolymerization of monomers in 2-propanol initiated by AIBN as polymer reagents for subsequent modification containing 23.3–45.2 mol % of links (2-HEMA) with molecular weights of 20000–64000 Da. Acylation of the obtained copolymers with succinic anhydride in formamide in an inert atmosphere, which made it possible to obtain acrylamide terpolymers containing up to 26.5 mol% of carboxyl groups, was carried out. The following factors were determined: the temperature and duration of the reaction, the molar ratio of the reacting components, which made it possible to achieve a high 92–95% degree of acylation. On the basis of ternary carboxyl-containing acrylamide copolymers, non-toxic polymer complexes of amikacin containing 22.9 and 33.0 wt % of the antibiotic, which have a high prolonged anti-tuberculosis activity, were obtained.

Keywords: acrylamide, 2-hydroxyethyl methacrylate, copolymer, succinic anhydride, degree of acylation, amikacin, polymer complex