

УДК 541.(183.12+64):539.2

СТРУКТУРА ГЕТЕРОГЕННЫХ СЕТЧАТЫХ  
КАРБОКСИЛЬНЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ*Чернова И. А., Самсонов Г. В.*

Методами электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния исследована структура сополимеров метакриловой кислоты и гексафункционального сшивающего агента 1,3,5-гексагидротриакрилоилтриазина (аналогов катионита Биокарб) и проведена оценка их сорбционных свойств по отношению к белкам различной молекулярной массы. Показано увеличение гетерогенности структуры сополимеров с возрастанием содержания сшивающего агента, определяющее взаимодействие с растворителем, электрохимические и сорбционные свойства сополимеров. Избирательность сорбции белков пропорциональна концентрации функциональных групп сополимера и только косвенно зависит от содержания сшивающего агента.

В последние годы создан целый ряд способов синтеза гетерогенных сетчатых полиэлектролитов — сорбентов для ионообменной хроматографии, в частности сульфокатионитов на основе стирола и дивинилбензола (ДВБ), а также макросетчатых сорбентов на основе метакриловой кислоты (МАК) и длинноцепных сшивающих агентов; изучен ряд структурных характеристик этих сополимеров [1—3]. Особый тип сорбентов, полученных в результате гетерофазной осадительной сополимеризации в водоорганической среде, создан на основе МАК и тривинильного сшивающего агента 1,3,5-гексагидротриакрилоилтриазина (ГТА) и выпускается под названием Биокарб. Структура этого сополимера отличается значительной гетерогенностью плотности как в сухом, так и в набухшем состоянии; для этого сорбента характерны большие значения емкости сорбции белков с высокой молекулярной массой [4].

Целью данной работы являлось исследование пористости и проницаемости сополимеров типа Биокарб в зависимости от количества сшивающего агента (ГТА).

Сополимеры МАК-ГТА были синтезированы по методике, описанной ранее [4]. С целью введения в мономерную смесь большего количества ГТА, плохо растворимого в воде, в качестве растворителя брали 32%-ный раствор уксусной кислоты. Синтез сополимеров проводили из 20%-ной мономерной смеси, за исключением поли-ГТА (образец 5, табл. 1), вследствие ограниченной растворимости которого синтез проведен из 10%-ной мономерной смеси.

Реакция сополимеризации МАК — ГТА экзотермична, поэтому для лучшего теплопотвода синтез проводили в специальной металлической форме со стенками из инертного материала. К исходной смеси мономеров при перемешивании добавляли инициатор, количество которого уменьшали по сравнению с методикой, принятой в [4], в 4 раза, чтобы замедлить скорость сополимеризации на время, необходимое для перенесения мономерной смеси с помощью стеклянного шприца в форму. Сополимеризацию проводили при 60° в течение 48 час. Блочные сополимеры получали в виде пластика толщиной 1,1 мм.

Состав полученных сополимеров приведен в табл. 1. Количество ГТА в сополимерах контролировали по содержанию азота. Количество МАК определяли титрованием карбоксильных групп. Следует отметить, что при уменьшении содержания МАК в сополимерах метод обратного титрования дает завышенные значения обменной емкости по сравнению с прямым потенциометрическим титрованием, по-видимому, за счет необменного поглощения гидроокиси натрия при высоких концентрациях щелочи.

Для измерения удельного объема сополимера  $v_{ud}$  при набухании в воде и объемного коэффициента набухания  $k_v$  при переходе из водородной в смешанную водородно-натриевую форму (рН 6,8) использовали образцы сополимеров в виде квадратов со стороной 1 см и толщиной 1,4 мм. Размеры образцов измеряли на линейном компараторе.

Удельную поверхность набухших в воде сополимеров  $v_{ud}$  определяли методом малоуглового рентгеновского рассеяния [5].

Потенциометрическое титрование сополимеров проводили 0,2 н. NaOH в 0,1 н. NaCl по обычной методике [6]. Результаты выражали в координатах Гендерсона — Гассельбаха  $pH = pK_{xap} + n \lg [\alpha/(1-\alpha)]$ .

Весовое набухание сополимеров в воде определяли методом центрифugирования [6]. При этом сравнивали образцы в виде кусочков  $1 \times 1 \times 1,1$  мм<sup>3</sup> с аналогичными образцами после измельчения и фракционирования сухим рассевом. Полученные результаты совпадали в пределах погрешности эксперимента.

Таблица 1  
Характеристика сополимеров МАК — ГТА

| Образец, № | Содержание ГТА, вес. %         |                       | Полная обменная ёмкость, мэкв/г |                   |                     | $pK_{xap}$ | n   | $v_{ud}$ при набухании в $H_2O$ , мм/г | $k_v = \frac{v_H - v_Na}{v_H}$ |
|------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|------------|-----|--|--------------------------------|
|            | по составу моно-mericной смеси | по азоту в сополимере | по составу моно-mericной смеси  | прямое титрование | обратное титрование |            |     |  |                                |
| 1          | 13                             | 15                    | 9,90                            | 10,0              | 9,9                 | 6,3        | 1,9 | 3,45                                   | 1,95                           |
| 2          | 23                             | 25                    | 8,75                            | 8,7               | 8,7                 | 6,5        | 2,0 | 4,25                                   | 1,52                           |
| 3          | 33                             | 33                    | 7,65                            | 7,7               | 8,6                 | 6,5        | 2,0 | 4,15                                   | 1,43                           |
| 4          | 45                             | 45                    | 6,30                            | 6,4               | 7,2                 | 6,8        | 2,3 | 4,30                                   | 1,30                           |
| 5          | 100                            | 88                    | —                               | —                 | —                   | —          | —   | 9,75                                   | —                              |

Таблица 2  
Свойства гетерогенных сетчатых сополимеров МАК — ГТА

| Образец, № | Содержание ГТА, мол. % | Весовое набухание в воде, г $H_2O$ / г смолы | Объемная концентрация карбоксильных групп N, мэкв/мл |            | Емкость сорбции белков, мг/г |            |                  |
|------------|------------------------|--|--|------------|------------------------------|------------|------------------|
|            |                        |  | H-форма  | H—Na-форма | инсулин                      | гемоглобин | рибосома E. coli |
| 1          | 4,5                    | 1,98   | 2,90   | 1,90       | 2020                         | 800        | 2,92             |
| 2          | 9                      | 2,98   | 2,15   | 1,62       | 216                          | 1500       | 13,7             |
| 3          | 15                     | 3,30   | 1,85   | 1,42       | 306                          | 560        | 11,7             |
| 4          | 23                     | 3,22   | 1,50   | 1,20       | 104                          | 300        | 9,9              |
| 5          | 100                    | 5,80   | —  | —          | 196                          | 140        | 2,0              |

Удаление растворителя при подготовке образцов для электронной микроскопии проводили методом лиофильной (сублимационной) сушки [7] и методом инклюдирования [4].

Сорбцию белков проводили в статических условиях на фракции 0,1–0,4 мм. Гемоглобин сорбировали из 0,05 M фосфатного буфера (рН 6,8); инсулин из 0,1 M ацетатного буфера (рН 4,0); рибосомы E. coli (70 S), сорбировали при рН 6,3 из 0,05 M раствора, приготовленного по методике авторов [8] и содержащего ионы магния и аммония.

С целью сравнения с литературными данными для сорбента Биокарб синтезирован аналогичный ему сополимер МАК — ГТА в стандартных условиях (4 мол. % ГТА, синтез из 5%-ной уксусной кислоты) в термостатированной форме. В работе [2] отмечали, что сополимеры стирола и ДВБ, синтезированные в виде гранул и пленок между стеклами, имеют одинаковые структурные характеристики — удельную поверхность и суммарный объем пор. В предварительно проведенных опытах нами также установлено, что электрохимические и сорбционные свойства сополимера, синтезированного в термостатированной форме, не отличаются от свойств Биокарба, синтезированного обычным образом. Не найдено различий и при электронно-микроскопическом исследовании сополимеров.

В табл. 2 приведены характеристики сополимеров МАК – ГТА, различающихся содержанием спивающего агента. Из данных по удельному объему (табл. 1) и весовому набуханию сополимеров в воде (табл. 2) видно, что с увеличением содержания ГТА в сополимере в его структуре удерживается все большее количество растворителя. Для поли-ГТА (образец 5) содержание воды максимальное.

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния обнаруживает значительную внутреннюю поверхность раздела фаз набухших в воде сополиме-

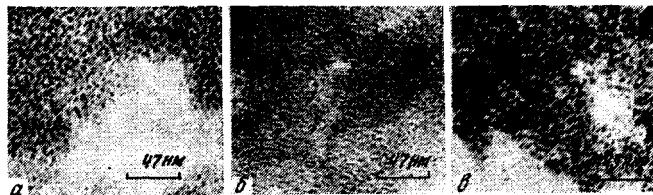


Рис. 1. Электронно-микроскопические снимки сополимеров МАК – ГТА:

*a* — образец 4 (23 мол.-% ГТА), обезвоживание лиофильной сушкой  $\times 214\ 000$ ; *б* — тот же образец, постепенное обезвоживание смесью растворителя (вода – этанол – серный эфир)  $\times 214\ 000$ ; *в* — образец 3 (15 мол.-% ГТА)  $\times 222\ 000$

ров. Для всех образцов  $S_{уд}$  находится в пределах от 180 (образец 1) до 260  $m^2/ml$  (образец 4), т. е. по порядку величины совпадает с  $S_{уд}$  стандартного образца, исследованного ранее [5]. Аналогичная закономерность была установлена для сополимеров стирола и ДВБ: с увеличением количества ДВБ в сополимере увеличивается удельная поверхность [1, 2]. Заметим, что для поли-ГТА величина  $S_{уд}$  составляет 190  $m^2/ml$ , т. е. находится в тех же пределах.

Микроструктура изученных сополимеров была исследована с помощью электронной микроскопии тонких срезов при больших разрешениях. Способы приготовления образцов аморфных полимеров для электронно-микроскопического исследования рассмотрены в ряде работ [4, 9]. Определенные достоинства имеет метод лиофильного высушивания полимеров, при котором уменьшается действие капиллярных сил, т. е. структура набухшего полимера минимально деформируется при удалении растворителя.

На рис. 1 показаны микрофотографии образца 4 (23 мол.-% ГТА), обезвоженного двумя методами: лиофильной сушкой (*а*) и смесью растворителя (инклюидированием) (*б*). Сополимер имеет узелковую (нодулярную) структуру. В случае лиофилизованного образца размер неоднородности микроструктуры 8,2–9,5 нм несколько больше, чем во втором случае – 6,2–7,0 нм. Известно, что для растворимых поликарбоновых кислот при переходе от водного к органическому растворителю наблюдается сокращение размеров макромолекулярных клубков за счет образования внутримолекулярных водородных связей между карбоксильными группами как ближними, так и дальними [10]. Вероятно, при переходе к этанолу структура набухшего в воде сшитого полимера также несколько сжимается, хотя морфология сетки при этом не меняется.

На рис. 1, *в* представлен образец 3, содержащий 15 мол.-% спивающего агента. Размер неоднородности полимерной матрицы составляет 8,7–9,5 нм, из чего можно заключить, что микроструктура сополимеров с повышенным содержанием ГТА существенно не отличается от стандартного ионита Биокарб, для которого установлено, что средний размер неоднородности лежит в пределах 9,0–11,0 нм [5].

Поли-ГТА, не содержащий карбоксильных групп, плохо контрастируется уранилацетатом при больших увеличениях (рис. 2, *б*), тогда как при

средних увеличениях (рис. 2, а) отчетливо видна гетерогенность плотности этого сетчатого гомополимера. Значительная пористость структуры поли-ГТА, по-видимому, объясняется не только уменьшением в 2 раза концентрации мономерной смеси, но и основным стерическими особенностями сетки этого полимера, содержащего тиазиновые кольца. Полимеризация таких жестких молекул, имеющих три винильные связи, приводит к весьма неоднородной структуре, что может объяснить большую хрупкость полученного полимера.

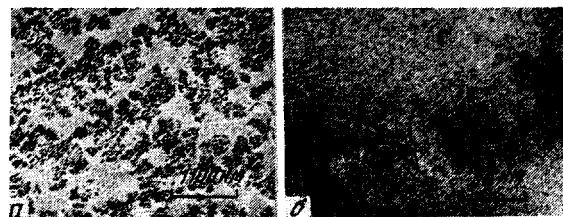


Рис. 2. Электронно-микроскопические снимки образца 5 поли-ГТА при увеличении 8000 (а) и 171 000 (б).

Пористость структуры сорбентов связана с их проницаемостью для макромолекул белков. Сравнение емкости сорбции белков различной молекулярной массы позволяет косвенно судить об относительном распределении пор в области размеров, соизмеримых с размерами белков. Так, сорбционная емкость образца 1 по отношению к инсулину (молекулярная масса 6000) почти в 3 раза превышает емкость по отношению к гемоглобину (68 000). Для образца 2 значения емкости сорбции по гемоглобину и рибосоме *E. coli* (3 500 000) максимальны (табл. 2). Дальнейшее увеличение количества спивающего агента в сополимере менее заметно влияет на емкость сорбции белков.

Таким образом, сорбционная емкость сополимеров определяется величиной поверхности, на которой расположены сорбционные центры, и доступностью этих центров для больших органических ионов. Но для эффективного разделения белков важна еще избирательность сорбции. Ранее при теоретическом анализе электростатической свободной энергии сорбции белков на пористых карбоксильных катионитах было показано, что коэффициент избирательности сорбции белков зависит от объемной концентрации карбоксильных групп сорбента [11]. На рис. 3 представлена экспериментальная зависимость коэффициента распределения инсулина, гемоглобина и рибосомы *E. coli* от концентрации карбоксильных групп в сополимерах МАК — ГТА (образцы 1—4). С уменьшением концентрации карбоксильных групп  $N$  коэффициент распределения  $k_i$  падает.

Сорбция исследованных белков происходит и на полимерной форме ГТА (образец 5, табл. 2). Обратимость сорбции гемоглобина при повышении pH буферного раствора до 8,2 уменьшается с повышением количества ГТА в сополимере. С поли-ГТА полностью десорбировать гемоглобин не

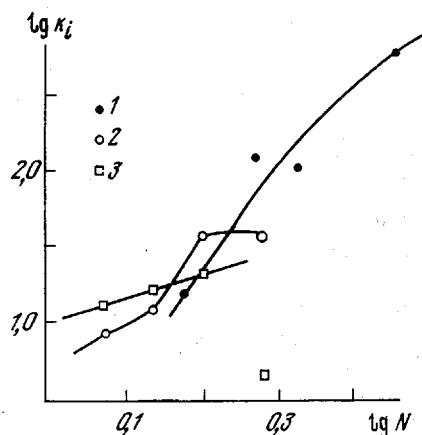


Рис. 3. Зависимость коэффициента избирательности белков  $k_i$  от объемной концентрации карбоксильных групп  $N$  в сополимерах МАК — ГТА: 1 — инсулин, 2 — гемоглобин и 3 — рибосомы *E. coli*.

удается вплоть до рН буферного раствора 9,2. В связи с этим возникает вопрос о способности азота триазинового кольца ГТА участвовать в дополнительных взаимодействиях в системе полимер – белок. Потенциометрическое титрование полимерной формы ГТА соляной кислотой обнаружило слабоосновные свойства полимера ( $pK_a$  основных групп порядка двух). Можно предполагать установление водородных связей между атомами азота триазинового кольца полимера и карбоксильными группами белков в процессе сорбции, но этот вопрос требует специального изучения.

Важной характеристикой сорбентов, используемых для ионообменной хроматографии, является осмотическая устойчивость структуры, т. е. способность сохранять объем при изменении степени ионизации ионогенных групп. Из данных табл. 1 видно, что для сополимеров МАК – ГТА разница в набухании водородной и смешанной водородно-натриевой формы певелика, составляет величину того же порядка, что и для стандартного Биокарба (1,5–1,7), и несколько уменьшается с увеличением содержания ГТА в сополимере. В таком же порядке уменьшается эластичность и увеличивается хрупкость сополимеров.

Результаты потенциометрического титрования карбоксильных групп сополимеров 1–4 (табл. 1) показывают, что с увеличением количества ГТА в сополимере  $k_{sep}$  уменьшается ( $pK_{sep}$  растет), т. е. кислотные свойства карбоксильных групп несколько ослабляются. Параметр  $n$  (табл. 1), характеризующий степень кооперативности процесса ионизации карбоксильных групп (т. е. влияние соседних групп на отрыв протона от данной), увеличивается при уменьшении объемной концентрации карбоксильных групп  $N$  (табл. 2) при введении большего количества ГТА в сополимер. Это дополняет результаты, полученные при расстановке карбоксильных групп другим неионогенным компонентом – (2-оксипропил)метакриламидом [12]. В ряду сополимеров МАК – (2-оксипропил)метакриламид, спиных 4 мол.% ГТА, при увеличении содержания нейтрального компонента в линейной цепи параметр  $n$  уменьшается; тогда как введение большого количества сшивающего агента при постоянной концентрации карбоксильных групп вдоль цепи ожестчет полимерную сетку, т. е. уменьшает вероятность конформационных переходов в цепях ПМАК при ионизации и препятствует дальнейшей ионизации карбоксильных групп.

Таким образом, при изучении сополимеров МАК – ГТА экспериментально показано, что увеличение количества сшивающего агента от 4,5 до 23 мол.% существенно не влияет на характер гетерогенности микроструктуры сополимеров, а сказывается лишь на объемном коэффициенте перехода из водородной в натриевую форму и на параметрах потенциометрического титрования ионита; иными словами, влияет на процесс ионизации карбоксильных групп и взаимодействие с растворителем. Именно эти факторы определяют механизм избирательной и обратимой ионообменной сорбции белков на полимерных сорбентах.

Известно, что характерные размеры неоднородности структуры гелевых сорбентов – расстояния между цепями – составляют 1–2 нм [9] и в первую очередь определяются количеством межцепных сшивок. Такая зависимость от количества введенного сшивающего агента выполняется не всегда: не выполняется для макропористых ионитов, синтез которых проводится в инертном разбавителе мономерной смеси [1, 2], и для сополимеров, полученных в результате трехмерной осадительной полимеризации. Теоретически было показано [13], что в последнем случае количество сшивающего агента существенно меньше влияет на гетерогенность образующегося сополимера, поскольку определяющим фактором является микрорасслоение системы в процессе сополимеризации, которое приводит к образованию большого количества пор, размеры которых значительно превышают те, которые регулируются просто числом поперечных сшивок.

Результаты еще одного метода исследования проницаемости гетерогенных сетчатых полимеров — гель-проникающей хроматографии с использованием линейных нейтральных полимеров различных молекулярных масс — подтверждают обратную взаимосвязь пористости и плотности сетки для сорбентов, полученных в условиях гетерогенной полимеризации. При повышении содержания сшивющего агента в сополимерах увеличивается гетеропористость их структуры и проницаемость по отношению к макромолекулам большого размера [14].

Таким образом, можно выделить два типа строения полимерных сеток: статистические и гетерогенные, различающиеся в первую очередь локальной упаковкой полимерных цепей.

При теоретическом анализе принято описывать упаковку цепных молекул в конденсированном состоянии в терминах модели статистического клубка. Такое описание было использовано Качальским для линейных полиэлектролитов в растворе и в дальнейшем распространено на слабоспиртовые гели ПМАК, содержащие до 2,5% сшивющего агента [15]. Но такое описание не является универсальным для сополимеров гетерогенного типа. Существуют системы, в которых упаковка молекул не статистическая: она определяется межцепными взаимодействиями в образующейся сетке, которые фиксируются ковалентными связями в процессе синтеза. Использование полифункциональных сшивателей увеличивает неоднородность сетки. Значительная гетерогенность структуры приводит к потере эластических свойств, характерных для гелевых сеток, существенно уменьшает механическую прочность, но в то же время увеличивает энтропию сетки в набухшем состоянии. Все локальные напряжения в пористой сетке и свободная энергия поверхности раздела микрогетерогенной структуры увеличивают неоднородность и вносят вклад в энтропийные составляющие процессов, проходящих на таких сетках, например набухание гетерогенных сеток происходит с увеличением энтропии [6].

Авторы выражают благодарность А. И. Неворотину за электронно-микроскопические фотографии сополимеров и Ю. С. Надежину за помощь в работе.

Институт высокомолекулярных соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
3 VII 1978

#### ЛИТЕРАТУРА

1. К. М. Салладзе, Т. К. Бруцкус, Э. А. Уварова, М. А. Федцова, Пласт. массы, 1971, № 2, 29.
2. И. Ф. Хирсанова, А. И. Покровская, В. С. Солдатов, В. А. Артамонов, Изв. АН БССР, серия химич., 1974, 19.
3. В. А. Динабург, Г. В. Самсонов, К. М. Генендер, В. А. Пасечник, В. С. Юрченко, Г. Э. Елькин, С. Ф. Белая, Ж. прикл. химии, 41, 891, 1968.
4. Н. Н. Кузнецова, К. М. Рожецкая, Б. В. Москвичев, Л. К. Шатаева, А. А. Селезнева, И. М. Огородникова, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., А18, 355, 1976.
5. Ю. С. Надежин, Л. К. Шатаева, Н. Н. Кузнецова, А. В. Сидорович, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., Б17, 448, 1975.
6. И. А. Чернова, В. С. Юрченко, О. А. Писарев, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., А20, 371, 1978.
7. Применение метода замораживания — высушивания в биологии, под ред. Р. Харриса, Изд-во иностр. лит., 1956.
8. А. С. Спирил, Л. П. Гаврилова, Рибосома, «Наука», 1971.
9. А. А. Тагер, М. В. Цилиноткина, Успехи химии, 48, 152, 1978.
10. Н. А. Кузнецова, З. А. Роганова, А. Л. Смолянский, Высокомолек. соед., А20, 791, 1978.
11. Л. К. Шатаева, И. А. Чернова, Г. В. Самсонов, Изв. АН СССР, серия химич., 1977, 358.
12. Л. К. Шатаева, И. А. Чернова, И. Вацк, Г. В. Самсонов, Изв. АН СССР, серия химич., 1977, 353.
13. K. Dušek, in *Polymer Networks*, New York — London, 1971, p. 245.
14. В. С. Юрченко, Кандидатская диссертация, Ленинград, ИВС АН СССР, 1976.
15. A. Katchalsky, I. Michaeli, J. Polymer Sci., 15, 69, 1955.

THE STRUCTURE OF HETEROGENEOUS CROSSLINKED  
CARBOXYLIC POLYELECTROLYTES

*Chernova I. A., Samsonov G. V.*

S u m m a r y

Using the methods of electron microscopy and low angle X-ray scattering, the structure of copolymers of methacrylic acid and hexafunctional crosslinking agent of 1,3,5-hexahydrotriacryloyltriazine (the analogues of Biocarb grade cationite) is investigated and the estimation of their sorption properties in relation to proteins of different molecular mass is made. The increase of the heterogeneous structure of copolymers by increasing the content of crosslinking agent is shown that defines interaction with solvent, electrochemical and sorption properties of copolymers. Selectivity of the sorption of proteins is proportional to the concentration of functional groups of copolymer and only indirectly depends on a content of crosslinking agent.

---