

УДК 541.64:547.462.3:532.73

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИКАТИОНА С СОПОЛИМЕРОМ ДИВИНИЛОВОГО ЭФИРА И МАЛЕИНОВОГО АНГИДРИДА В ВОДНЫХ И ВОДНО-СОЛЕВЫХ СРЕДАХ

© 2004 г. И. Ф. Волкова\*, М. Ю. Горшкова\*, В. А. Изумрудов\*\*, Л. Л. Стоцкая\*

\* Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиеva Российской академии наук  
119991 Москва, Ленинский пр., 29

\*\*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. Химический факультет  
119992 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 17.12.2003 г.

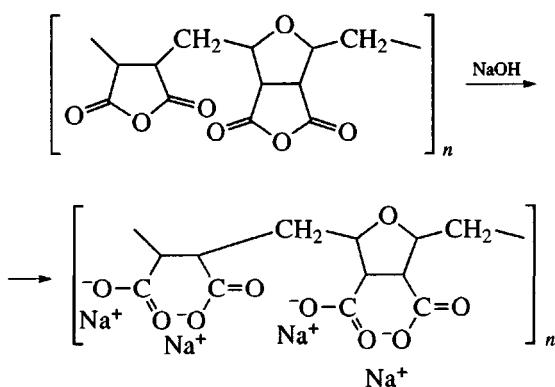
Принята в печать 13.04.2004 г.

Методами потенциометрии и турбидиметрии исследовано взаимодействие гидролизованного сополимера дивинилового эфира и малеинового ангидрида с поли-N-этил-4-винилпиридиниевым катионом, приводящее к образованию как растворимых, так и не растворимых в воде полиэлектролитных комплексов. Получены фазовые диаграммы водных и водно-солевых растворов смесей полимерных компонентов, выявлено их сходство и отличие от фазовых диаграмм смесей того же поликатиона и полиметакрилатного аниона. Показано, что комплексообразование может быть использовано для получения водорастворимых систем на основе изученного сополимера, претерпевающих фазовое разделение при заданных значениях pH и ионной силы.

Продукты взаимодействия разноименно заряженных полиэлектролитов – полиэлектролитные комплексы (ПЭК) привлекают все возрастающее внимание исследователей, работающих в различных областях полимерной химии, молекулярной биологии, биотехнологии и генной инженерии. Этот интерес во многом обусловлен уникальными свойствами ПЭК, в частности, их высокой чувствительностью к изменению внешних условий. Способность растворов ПЭК к фазовым разделениям в заданном диапазоне pH, ионной силы или температуры при весьма незначительных изменениях этих параметров позволяет относить ПЭК к так называемым “умным” полимерам [1–4]. Поскольку компонентами ПЭК могут быть полиэлектролиты различного строения и структуры, комплексообразование можно рассматривать как сравнительно простое, эффективное и универсальное средство придания заряженным полимерам качеств, необходимых для практического использования.

Сополимер дивинилового эфира (ДВЭ) и малеинового ангидрида (МА) обладает широким спектром важных биологических свойств [5–7]. Способность сополимера активировать иммун-

ную систему, а также противовирусная и противоопухолевая активность делают привлекательным его использование для создания макромолекулярных транспортных систем различных лекарственных препаратов [8, 9]. В водных средах ангидридные группы гидролизуются, при этом сополимер растворяется. В щелочных средах сополимер ДВЭ–МА представляет собой полианион с высокой плотностью отрицательно заряженных карбоксилатных групп:



Как ни удивительно, в литературе отсутствуют сведения о полиэлектролитных комплексах этого полианиона. Между тем, исследование сополимера ДВЭ–МА как компонента ПЭК может наметить пути направленного изменения свойств это-

E-mail: mgor@ips.ac.ru (Горшкова Марина Юрьевна).

го сополимера и макромолекулярных терапевтических систем на его основе. Известно, что жесткость цепи, плотность заряда и гидрофильно-липофильный баланс во многом определяют транспортные свойства сополимера, а также его иммуностимулирующую и иммуномодулирующую активность [6, 10].

Помимо прикладного аспекта, результаты этих работ могут быть полезны для углубления фундаментальных знаний о механизме образования ПЭК, поскольку наличие в сополимере ДВЭ-МА большого числа близко расположенных карбоксильных групп может вносить существенный вклад в стабилизацию (или дестабилизацию) ПЭК.

В настоящей работе в качестве партнера сополимера использовали исчерпывающе алкилированный поли-*N*-этил-4-винилпиридиниевый катион. Это позволило сравнить фазовое поведение образующегося ПЭК и изученного ранее комплекса того же поликатиона с полиметакрилатным анионом и выявить влияние специфической структуры сополимера ДВЭ-МА на положение границ фазовых диаграмм. Полученные нами результаты демонстрируют перспективность использования комплексообразования для придания сополимеру способности обратимо переходить из нерастворимого в растворимое состояние при изменении pH и ионной силы раствора в условиях, близких к физиологическим, что в свою очередь является важным этапом разработки малотоксичных и высокоактивных макромолекулярных противоопухолевых систем.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Реагенты*

NaCl, а также буферы TRIS и HEPES производства фирмы "Sigma" (St. Louis, США) использовали без дополнительной очистки. Во всех экспериментах для приготовления растворов брали дважды перегнанную дистиллиированную воду, дополнительно очищенную на установке "Milli-Q" ("Millipore", США). Очистку органических растворителей осуществляли по стандартным методикам [11].

Сополимер ДВЭ-МА синтезировали радикальной циклосополимеризацией в ацетоне, выделяли осаждением в диэтиловый эфир, очищали

от низкомолекулярных примесей экстракцией в эфире, сушили до постоянной массы в вакууме. Использовали образец с  $M_w = 3.45 \times 10^5$ , определенной методом ГПХ [12].

Синтез полиметакриловой кислоты (ПМАК) проводили радикальной полимеризацией метакриловой кислоты с последующим фракционированием дробным осаждением в системе метанол-этилацетат [13]. Использовали фракцию с  $M_w = 2.2 \times 10^5$ , измеренной по светорассеянию.

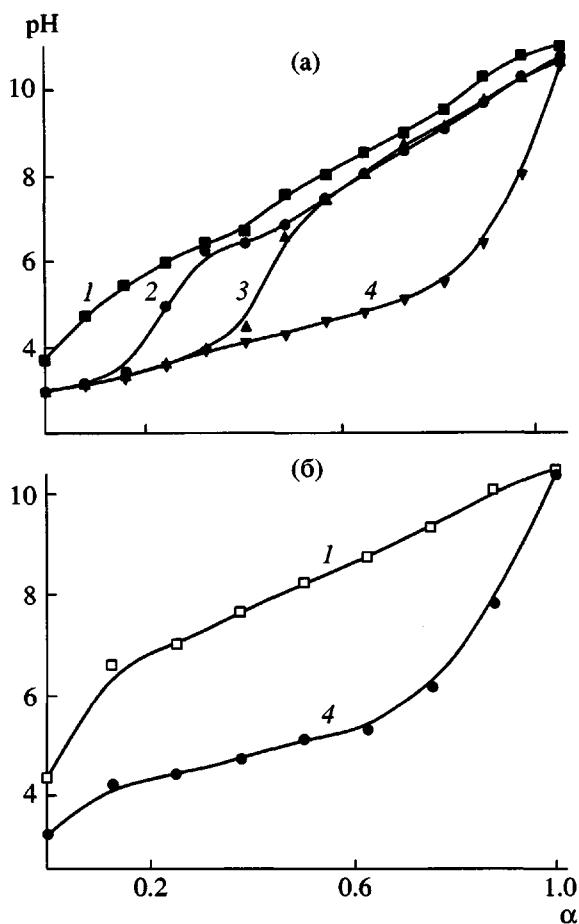
Поли-*N*-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭПБ) со степенью алкилирования, превышающей 92% и  $M_w = 1.1 \times 10^5$ , измеренной по светорассеянию, получали как описано в работе [13].

Растворы сополимера ДВЭ-МА готовили внесением рассчитанного количества сополимера в воду и нагреванием при 60°C в течение 2 ч. В этих условиях происходит практически полный гидролиз ангидридных циклов [14]. Концентрацию растворов сополимера и ПМАК выражали в виде мольной концентрации карбоксильных групп, а ПЭПБ – мольной концентрации пиридиниевых групп. Концентрация полианионов во всех растворах до начала титрования была одинаковой и составляла  $4 \times 10^{-3}$  моль/л.

### *Методы исследования*

Для потенциометрического титрования использовали потенциометр "Multilab 540" (WTW, Германия) с комбинированным стеклянным каломельным электродом Metler Toledo. Измерения проводили при постоянном перемешивании и температуре 25°C в токе аргона в термостатированной ячейке, снабженной мешалкой. Порции 0.1 N раствора едкого натра вводили в раствор полианионов или их смесей с ПЭПБ с интервалом 5 мин, достаточным для установления постоянных значений pH.

Турбидиметрическое титрование осуществляли с помощью спектрофотометра "Hitachi 150-20" (Япония), измеряя оптическую плотность при длине волны 350 нм, при которой полимерные компоненты не имеют характеристических полос поглощения. Измерения проводили при постоянном перемешивании и температуре 25°C. Порции раствора титранта (0.1 N HCl, 0.1 N NaOH или 4 M NaCl) вводили с интервалом 5 мин. Границы фазовых диаграмм находили по точкам помутнения.



**Рис. 1.** Кривые потенциометрического титрования растворов полиянионов (1) и их смесей с ПЭПБ различного состава  $\phi = [\text{ПЭПБ}] : [\text{полиянион}]$ ,  $\phi = 0.25$  (2), 0.50 (3) и 1.0 (4) для сополимера (а) и ПМАК (б).

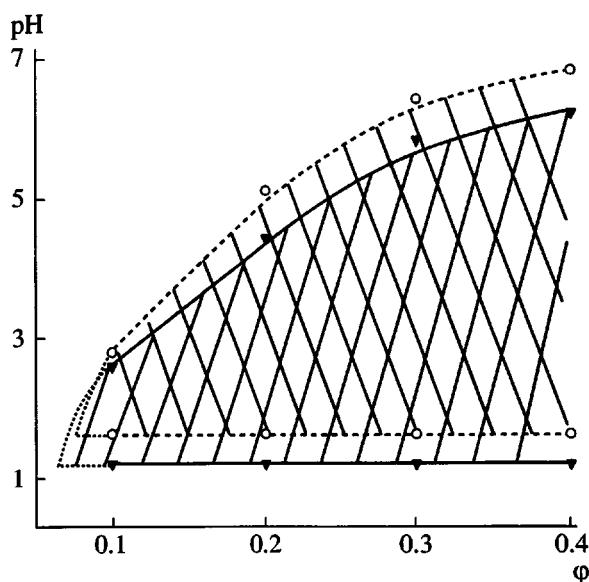
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфическая структура повторяющихся звеньев цепи гидролизованного сополимера ДВЭ-МА, содержащих по две пары близко расположенных карбоксильных групп (схема) оказывает влияние на его полиэлектролитное поведение. По данным потенциометрического титрования [15], этот сополимер проявляет свойства слабой полимерной кислоты. В отличие от полималеиновой или полифумаровой кислот, диссоциация которых протекает в две стадии с отчетливо выраженной областью перехода при степени ионизации  $\alpha \approx 0.5$  [16], на кривой потенциометрического титрования сополимера эта область выражена слабо (рис. 1а, кривая 1). Сглаженный ход кривой объясняют локальным взаимодействием пар карбоксильных групп сополимера ДВЭ-МА [15].

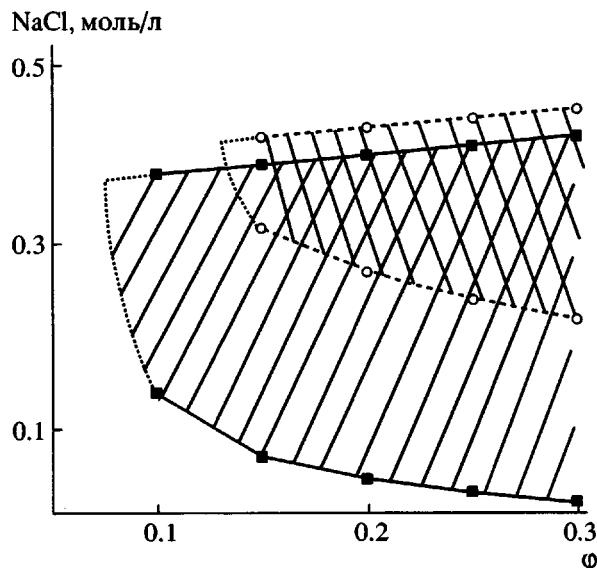
Добавление поликатиона к раствору сополимера приводило к заметному понижению pH и сдвигу кривых титрования в кислые среды (рис. 1а, кривые 2–4). Это явление хорошо известно: комплексообразование слабых полимерных кислот и сильных полимерных оснований сопровождается выделением протонов [1]. С увеличением относительного содержания поликатиона точка перегиба на кривых смешались в сторону более высоких значений степени ионизации  $\alpha$ , причем они соответствовали составу смеси  $\phi = [\text{ПЭПБ}] : [\text{ДВЭ-МА}]$ , выраженному в виде отношения мольных концентраций пиридиниевых и карбоксильных групп (рис. 1а). Это означает, что интерполиэлектролитная реакция протекает кооперативно и до практически полного связывания пиридиниевых групп поликатиона. В дальнейшем вводимая щелочь расходуется на титрование избыточных карбоксильных групп сополимера ДВЭ-МА, о чем свидетельствует совпадение правых ветвей кривых 2 и 3. Ветви лишь незначительно отличаются от кривой титрования свободного сополимера (кривая 1) общим смещением вниз по оси ординат. Смещение легко объяснить влиянием ионной силы, создаваемой противоионами  $\text{Br}^-$ , выделяющимися при образовании ионных пар и катионами  $\text{Na}^+$ , вводимыми при титровании, поскольку добавление раствора хлористого натрия сопоставимой концентрации в раствор сополимера ДВЭ-МА оказывало аналогичное действие [15]. Кривая титрования смеси ПЭПБ и сополимера состава  $\phi = 1$  (рис. 1а, кривая 4) представляет собой типичную кривую титрования эквимольной смеси слабой поликислоты и сильного полиоснования, например, смеси ПЭПБ и ПМАК (рис. 1б, кривая 4).

Итак, потенциометрическим титрованием не удается выявить существенных особенностей в комплексообразовании сополимера ДВЭ-МА и поликатиона. Оно протекает в соответствии с установленными ранее закономерностями и осуществляется с вовлечением практически всех карбоксильных групп сополимера в процесс образования ионных пар.

Не наблюдалось заметных различий и в характере изменения фазового состояния этих систем при изменении pH (рис. 2). Фазовые диаграммы для пар ПЭПБ-сополимер (рис. 2, сплошные кривые) и ПЭПБ-ПМАК (штриховые) получали из данных турбидиметрического титрования смесей



**Рис. 2.** Фазовые диаграммы смесей водных растворов полиэлектролитов в виде зависимостей значений pH точек помутнения от состава смеси  $\phi = [\text{ПЭПБ}] : [\text{сополимер}]$  (сплошные кривые) и  $[\text{ПЭПБ}] : [\text{ПМАК}]$  (штриховые).



**Рис. 3.** Фазовые диаграммы смесей водно-солевых растворов полиэлектролитов при pH 9.0 в виде зависимостей значений концентрации соли NaCl, моль/л, соответствующих точкам помутнения, от состава смеси  $\phi = [\text{ПЭПБ}] : [\text{сополимер}]$  (сплошные кривые) и  $[\text{ПЭПБ}] : [\text{ПМАК}]$  (штриховые).

полимеров различного состава  $\phi$  растворами щелочи или кислоты, как описано в экспериментальной части. Фазовая диаграмма смеси ПЭПБ–ПМАК соответствовала диаграмме этой системы, полученной нами ранее [17]. В нейтральных и щелочных средах такие пары полиэлектролитов образуют растворимые комплексы, состав которых совпадает с составом смесей  $\phi$  [1]. При уменьшении pH не связанные в ионные пары карбоксилатные группы протонируются, общий отрицательный заряд комплекса снижается, и при значениях pH, соответствующих точкам на верхних ветвях диаграмм, комплекс переходит в осадок. С понижением относительного содержания поликатиона, т.е. с уменьшением  $\phi$ , область перехода сдвигается в кислые среды [17]. При фиксированном составе  $\phi$  значение pH перехода зависит от степени ионизации избыточных карбоксильных групп, которая определяется ходом кривой потенциометрического титрования поликатиона. А поскольку кривые титрования сополимера ДВЭ–МА (рис. 1а, кривая 1) и ПМАК (рис. 1б, кривая 1) схожи, неудивительно, что верхние ветви фазовых диаграмм на рис. 2 мало отличаются друг от друга.

Таким образом, изменением состава  $\phi$  смеси можно задавать значения pH, при которых ком-

плекс с сополимером претерпевает фазовое разделение в нейтральных и слабо кислых средах. В специальных экспериментах мы установили, что положение границ фазовых диаграмм на рис. 2 не зависит от того, из кислых или щелочных сред осуществляется движение к области перехода. Как и в системе ПЭПБ–ПМАК [17], фазовое разделение протекало быстро, количественно и обратимо.

Специфика сополимера ДВЭ–МА отчетливо проявилась при изучении фазового разделения в растворах комплексов, вызываемого добавлением низкомолекулярного электролита. В этом случае системы вели себя по-разному. Точки на нижних ветвях диаграмм, полученных при pH 9 (рис. 3), соответствуют концентрациям соли, вплоть до которых нестехиометричный ПЭК состава  $\phi$  сохраняет растворимость [1]. Видно, что комплекс с сополимером ДВЭ–МА (сплошные кривые) гораздо более чувствителен к вводимой соли, чем комплекс с ПМАК (штриховые кривые). Так, при составе смеси  $\phi = 0.2$  фазовое разделение наступало уже при содержании 0.04 М NaCl, а для комплекса с полиметакрилатным анионом для этого требовалась в 6 раз более высокая концентрация хлористого натрия. Подчеркнем, что в воде лиофилизирующие способности сопо-

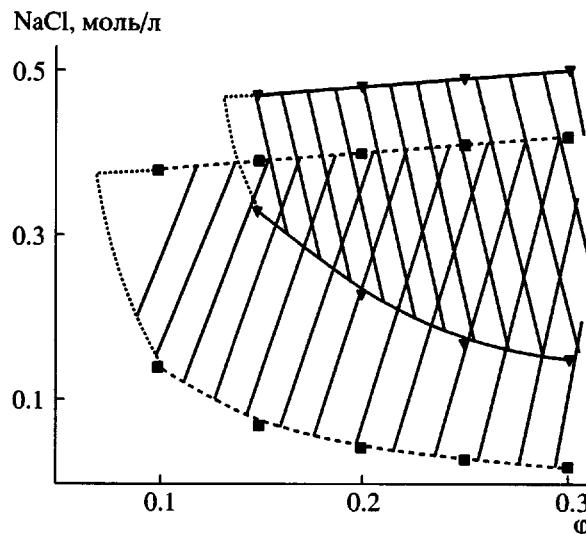


Рис. 4. Фазовая диаграмма смесей водно-солевых растворов ПЭПБ и сополимера при pH 6.0 в виде зависимостей значений концентрации соли NaCl, соответствующих точкам помутнения, от состава смесей  $\phi$ . Штриховая линия – фазовая диаграмма тех же смесей при pH 9.0, заимствованная из рис. 3.

лимера ДВЭ-МА и полиметакрилатного аниона в комплексах различаются мало (ср. верхние ветви фазовых диаграмм на рис. 2).

Возможной причиной столь резкого снижения устойчивости растворимого комплекса к действию соли является наличие в звене сополимера двух близко расположенных остатков малеиновой кислоты (схема). Известно, что полималеиновая кислота при высоких степенях ионизации,  $\alpha > 0.7$ , теряет растворимость уже в 0.1 М растворе NaCl. Этот эффект объясняется высоким электростатическим потенциалом полимерного клубка, способствующим концентрированию вводимых противоионов  $\text{Na}^+$  в локальной области вблизи полимера [16]. Несмотря на то, что полианион сополимера не высаливается даже в 3 М растворе хлористого натрия [15], в силу действия того же фактора его лиофилизирующая способность в комплексе в солевых средах может снижаться, что и наблюдается в эксперименте. Аргументом в пользу такого предположения служит нижняя ветвь фазовой диаграммы той же смеси, полученной при pH 6.0 (рис. 4, сплошная кривая), которая располагается существенно выше ветви, полученной при pH 9.0 (штриховая кривая). Уменьшение pH на три единицы приводит к протонированию части избыточных карбоксилат-

ных групп сополимера, снижению электростатического потенциала частицы комплекса, ослаблению эффекта локального концентрирования малых ионов и, как следствие, расширению области существования растворимого комплекса в водно-солевых средах.

Таким образом, отличительной чертой смесей сополимера ДВЭ-МА и поликатиона является значительное расширение гетерогенной области в водно-солевых средах, которое достигается за счет снижения устойчивости растворимых нестехиометрических комплексов по отношению к вводимой соли. При переходе к нейтральным средам эта особенность сохраняется, но с уменьшением pH становится менее выраженной. Так, при pH 6.0 комплекс сополимер-ПЭПБ состава  $\phi = 0.3$  сохраняет растворимость в 0.13 М NaCl. Иными словами, сополимер может быть значительно (до 30%) нагружен поликатионом, но оставаться растворимым в физиологических условиях, а при небольшом изменении pH, ионной силы или состава смеси переходить в нерастворимое состояние. Это свойство делает подобную нехимическую модификацию сополимера ДВЭ-МА весьма привлекательной для разработки новых лекарственных средств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
2. Кабанов А.В., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 198.
3. Izumrudov V.A., Galaev I.Yu., Mattiasson B. // Bioseparation. 1999. V. 7. P. 207.
4. Izumrudov V.A. // Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing / Ed. by Galaev I.Yu., Mattiasson B. London: Taylor and Francis, 2002. P. 98.
5. Ottenbrite R.M. // Anionic Polymeric Drug / Ed. by Donaruma L.G., Ottenbrite R.M., Vogl O. New York: Wiley, 1980. P. 49.
6. Morahan H.S., Kaplan A.M. // Immune Modulation and Control of Neoplazia by Adjuvant Therapy / Ed. by Chirigos M.A. New York: Acad. Press. 1978. P. 469.
7. Ottenbrite R.M., Kuns K., Kaplan A.M. // Polymer in Medicine / Ed. by Chiellini E., Giusti P. New York: Plenum Press, 1983. P. 3.

8. Swart P.J., Hirano T., Kuipers M.E., Ito Y., Smit C., Hashida M., Nishikawa M., Beljaars L., Meijer D.K.F., Poelstra K. // *J. Hepatology*. 1999. V. 31. № 6. P. 1034.
9. Gorshkova M.Yu., Stotskaya L.L. // *Polym. Adv. Technol.* 1998. V. 9. № 6. P. 362.
10. Сухин Г.М., Печерских Е.В., Саранцева О.С., Стоцкая Л.Л., Горшкова М.Ю. // *Вопросы медицинской химии*. 1995. Т. 41. № 6. С. 50.
11. Вайсбергер А., Прокаяэр Э., Риддик Дж., Тунс Э. // *Органические растворители*. М.: Изд-во иностр. лит., 1958.
12. Volkova I.F., Gorshkova M.Yu., Ivanov P.E., Stotskaya L.L. // *Polym. Adv. Technol.* 2002. V. 13. № 10-12. P. 1067.
13. Изумрудов В.А., Бронич Т.К., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // *Высокомолек. соед. А*. 1987. Т. 29. № 6. С. 1224.
14. Горшкова М.Ю., Лебедева Т.Л., Червина Л.В., Стоцкая Л.Л. // *Высокомолек. соед. А*. 1995. Т. 37. № 10. С. 1653.
15. Levine H.I., Mark E.H., Fiel R.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1977. V. 184. P. 156.
16. Kitano T., Kawaguchi S., Ito K., Minakata A. // *Macromolecules*. 1987. V. 20. P. 1598.
17. Margolin A.L., Sherstyuk S.F., Izumrudov V.A., Svedas V.K., Zezin A.V., Kabanov V.A. // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 146. P. 625.

## Interaction of a Polycation with Divinyl Ether–Maleic Anhydride Copolymer in Aqueous and Aqueous–Saline Solutions

I. F. Volkova\*, M. Yu. Gorshkova\*, V. A. Izumrudov\*\*, and L. L. Stotskaya\*

\*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii pr. 29, Moscow, 119991 Russia

\*\*Faculty of Chemistry, Moscow State University,  
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia

**Abstract**—The interaction of a hydrolyzed divinyl ether–maleic anhydride copolymer with a poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) cation, which leads to the formation of both water-soluble and insoluble polyelectrolyte complexes, was studied by potentiometry and turbidimetry. Phase diagrams of aqueous and aqueous–saline solutions of polymer mixtures were constructed and compared with those of mixtures of the same polycation and a polymethacrylate anion. It was shown that water-soluble systems that undergo phase separation at specified values of pH and ionic strength may be prepared via complex formation on the basis of the copolymer under study.