

УДК 541.64:546.284:547.745

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОСИЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИАМФОЛИТОВ¹

© 2008 г. В. В. Анненков, Е. Н. Даниловцева, И. Н. Котельников

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук
664033 Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

Поступила в редакцию 09.01.2007 г.

Принята в печать 30.07.2007 г.

Реакцией чередующегося сополимера малеинового ангидрида и 1-винил-2-пирролидона с 1,2-диаминоэтаном, 1,4-диаминобутаном и 1,6-диаминогексаном получены полиамфолиты, содержащие аминогруппы на различном удалении от основной цепи. Исследованы кислотные свойства новых полимеров и их активность в реакции с кремниевой кислотой, моделирующая процессы биосилификации под действием природных полиамфолитов. Установлено, что в слабокислой области (рН 5.5–6) синтетические полимеры не катализируют конденсацию кремниевой кислоты, но реагируют с первичными кремнеземными частицами. Эффективность этого взаимодействия повышается при приближении аминогруппы к основной цепи из-за большей вероятности образования тройного комплекса с участием карбоксильной, аминной и сианольной групп.

Кремний является необходимым элементом для существования практически всех живых организмов [1]. В последние годы внимание исследователей, даже весьма далеких от биологии, привлекают растения и животные, использующие оксид кремния для построения элементов своих скелетов: диатомовые и хризофитовые водоросли, губки, рис, хвощ. Особый интерес проявляют специалисты из областей нанотехнологий и микроэлектроники, поскольку биосилифицирующие организмы способны создавать в обычных условиях упорядоченные на микро- и наноуровне сложные конструкции из достаточно сухого кремнезема, фактически из кварцевого стекла [2–4], имеющего температуру плавления выше 1700°C.

Контролируемое формирование кремнеземных структур в живых объектах предполагает наличие определенных веществ, способных ускорять или замедлять конденсацию кремниевой кислоты и олигосиликатов. Поиск подобных органических агентов биосилификации привел к открытию силаффинов – особых белков с пост-

трансляционными вставками из боковых поливинильных цепей и фосфорилированных гидроксильных групп звеньев серина [5, 6]. Силаффины находятся в кремнистых створках или сильно ассоциированы с ними, что существенно осложняет их выделение в нативной форме, поскольку разрушение кремнезема возможно лишь в агрессивных средах, например в кислых фторидных растворах. Количество выделяемых силаффинов измеряется в микрограммах, что, очевидно, недостаточно для серьезного изучения их физико-химических свойств и влияния на конденсацию кремниевой кислоты. Кроме того, природные агенты силификации рассматриваются в качестве прототипов сложных самоорганизующихся систем для получения нанокомпозитных материалов [7, 8]. В этой связи целью работы являлось получение синтетических аналогов силаффинов и исследование их силифицирующей активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные мономеры, диамины и растворители очищали перегонкой. Полиаллиламин использовали в виде гидрохлорида (“Aldrich”). ИК-спектры образцов в виде таблеток с KBr записывали на Фурье-спектрометре “Infracam FT-801” (Россия), элементный анализ проводили на C,H,N-анализаторе “Flash EA-1112” (США). pH растворов

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта а-06-03-32931), а также Сибирского отделения Российской академии наук и фонда INTAS (совместный грант 06-1000013-8569).

E-mail: annenkov@lin.irk.ru (Анненков Вадим Владимирович).

контролировали с помощью иономера “Мульти-тест ИПЛ-113” (Россия). Содержание свободной кремниевой кислоты в растворах измеряли молибдатным методом в виде молибденовой сини [9, ч. 1, с. 139]. Для определения содержания кремния в твердых кремнистых композитах их растворяли в 0.3 М NaOH и находили концентрацию кремния в полученном растворе молибдатным методом.

Синтез сополимеров малеинового ангидрида (МА) с 1-винилпирролидоном (ВП) [10, 11]

8 г (0.082 моль) МА смешивали с 9.1 г (0.082 моль) ВП, добавляли 0.17 г ДАК, смесь продули аргоном и полимеризовали в ампуле при 65°C в течение 24 ч. Полученную вязкую массу растворяли в ДМФА, высаждали в диэтиловый эфир, очищали переосаждением из ДМФА и сушили в вакууме. Выход 7.5 г (44%).

Найдено, %: C 56.8; H 5.5; N 6.6.
Для $C_{10}H_{11}NO_4$
вычислено, %: C 57.4; H 5.3; N 6.7.

МА : ВП = 1 : 1. ИК-спектр (таблетка с КBr, cm^{-1}): 2937, 1465 (CH_2), 1780, 930 (ангидрид), 1670 (Амид).

Взаимодействие сополимера МА–ВП с диаминами

Раствор 1 г сополимера в 20 мл ДМФА прикачивали при перемешивании в течение 3 ч в раствор амина (30%-ный мольный избыток) в 25 мл ДМФА. Продукт высаждали в бензол, сушили в вакууме, затем очищали с помощью диализа через целлофановую мембрану и сушили лиофильно. Выход ПА-2 составляет 0.564 г (43%) (цифра в обозначении полимера соответствует значению m в формуле диамина $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2$).

Найдено, %: C 54.2; H 7.3; N 15.4.
Для $C_{12}H_{19}N_3O_4$
вычислено, %: C 53.5; H 7.1; N 15.6.
ПА-4: выход 0.458 г (31%).
Найдено, %: C 56.2; H 7.5; N 13.8.
Для $C_{14}H_{23}N_3O_4$
вычислено, %: C 56.6; H 7.8; N 14.1.
ПА-6: выход 0.635 г (41%).
Найдено, %: C 60.3; H 7.9; N 13.0.
Для $C_{16}H_{27}N_3O_4$
вычислено, %: C 59.1; H 8.4; N 12.9.

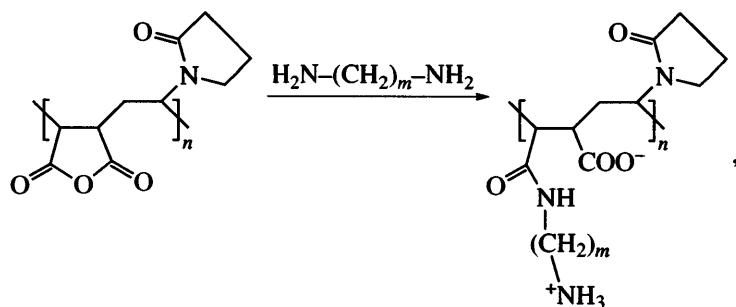
В ИК-спектрах полимеров ПА-2, ПА-4 и ПА-6 наблюдаются широкая полоса поглощения при 2350–3200 cm^{-1} ($-\text{NH}_3^+$), полосы при 1655 cm^{-1} (Амид), 1555 и 1385 cm^{-1} ($-\text{COO}^-$), 2931 cm^{-1} (метиленовые группы, интенсивность растет при переходе от ПА-2 к ПА-6).

Конденсация кремниевой кислоты в присутствии органических полимеров

Исследуемые полимеры растворяли в буферном растворе, при необходимости регулируя pH 1 М растворами NaOH или HCl. Использовали фосфатные (KH_2PO_4 и Na_2HPO_4) и ацетатно-карбонатные (NaHCO_3 и уксусная кислота) буферные растворы при конечной концентрации анионов 0.02 моль/л. H_4SiO_4 получали в соответствии с работой [12] гидролизом тетраметоксисилана при концентрации 1 моль/л в 0.001 М HCl в течение 15 мин. Далее раствор кремниевой кислоты добавляли к буферному раствору, содержащему органический полимер. Время начала выделения осадка определяли визуально. Наблюдения продолжали в течение 4 суток. Осадки отделяли от растворов через 24 ч центрифугированием, промывали водой и сушили в вакууме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С химической точки зрения силаффины являются полиамфолитами, имеющими отрицательные заряды вблизи основной цепи и положительные на боковых полиаминных цепях. В настоящей работе нами синтезированы амино-карбоксильные полиамфолиты с боковыми аминными цепями на основе сополимеров МА с ВП. Радикальная сополимеризация мономеров протекает с образованием продукта с регулярным чередованием звеньев [10, 11]. Взаимодействие этих сополимеров с диаминами приводит к целевым полиамфолитам. В работе синтезированы полиамфолиты с боковыми аминными группами, присоединенными к основной цепи спирсарами различной длины:



где $m = 2, 4, 6$ (ПА-2, ПА-4, ПА-6).

Разработанная методика позволяет получать полiamфолиты с выходом растворимых продуктов 50–60%. Структура полученных соединений подтверждена элементным анализом и ИК-спектроскопией.

С помощью потенциометрического титрования определены изоэлектрические точки (ИЭТ) полiamфолитов по методу [13]. Они составляют 6.9, 7.2 и 7.1 для ПА-2, ПА-4 и ПА-6 соответственно. Близость ИЭТ к нейтральному значению pH связана с равным содержанием в сополимерах карбоксильных и аминных групп. Сополимеры растворимы в области ИЭТ, что обусловлено присутствием гидрофильных звеньев ВП. В то же время образец ПА-6 выпадает в осадок при pH 4.0–5.4, что достаточно неожиданно, учитывая удаленность этой области от ИЭТ.

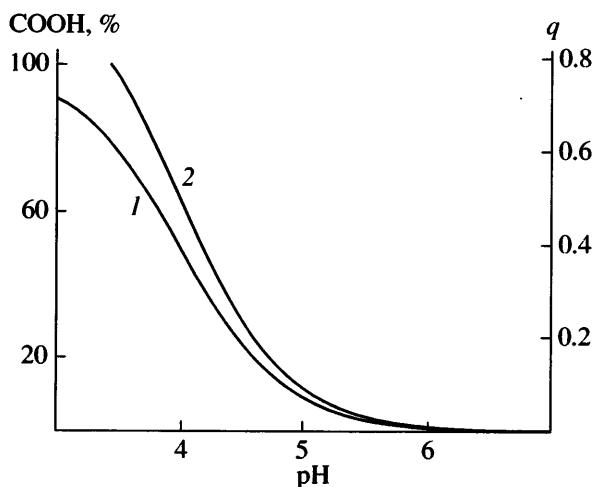
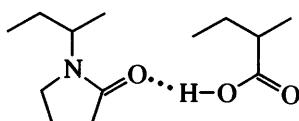


Рис. 1. Зависимость содержания недиссоциированных карбоксильных групп (1) и среднего заряда в расчете на звено q (2) для сополимера ПА-6. Вычислено в соответствии с работой [13].

pK групп $\sim\text{COOH}$ и $\sim\text{NH}_3^+$ принимали равными 4 и 10 соответственно.

Объяснить это явление можно, учитывая известный факт нерастворимости при низких pH сополимеров, содержащих звенья ВП и карбоксильные группы [14]. При этом образуются внутри- и межмолекулярные водородные связи между кислотным протоном и кислородом амидной группы:



В исследуемых сополимерах недиссоциированные карбоксильные группы появляются в существенных количествах как раз при pH ниже 5.5 (рис. 1). Растворение осадка при pH < 4 связано с накоплением общего положительного заряда на цепи. Отсутствие области нерастворимости для сополимеров ПА-2 и ПА-4 можно объяснить меньшей длиной спейсера и соответственно меньшей удаленностью аминных групп от карбоксильных. В данном случае аминогруппы, заряженные положительно в исследуемой области pH, препятствуют сближению и сшивке водородными связями различных цепей или их фрагментов. Дополнительным фактором, обуславливающим осаждение именно ПА-6, может служить также большая длина гидрофобных последовательностей метиленовых групп в фрагментах диаминогексана.

Для изучения силифицирующей активности природных силаффинов обычно используют растворы кремниевой кислоты, получаемые гидролизом тетраметоксисилана в присутствии 0.001 М HCl , препятствующей конденсации H_4SiO_4 [12]. Эксперименты проводятся в кислых буферных средах (pH 5.5–6.5), поскольку есть сведения о накоплении кремниевой кислоты и ее олигомеров в кислых клеточных везикулах [15]. Нами выполнены исследования в аналогичных условиях (табл. 1) для новых полiamфолитов и полияллил-

Таблица 1. Время начала появления осадка при конденсации кремниевой кислоты в присутствии органических полимеров ($[H_4SiO_4] = 0.04$ моль/л, [полимер] – 0.032 моль/л)

Условия реакции	рН	Время начала появления осадка для полимеров			
		ПА-2	ПА-4	ПА-6	полиаллиламин
Фосфатный буфер	5.5	–*	–*	–*	215 мин
Фосфатный буфер	6.2	63 мин (6)	3 суток (7)	Нет осадка	–*
Фосфатный буфер	7.0	19 мин (8)	Нет осадка	Нет осадка	–*
Ацетатно-карбонатный буфер	5.5	60 мин (9)	73 мин	100 мин (10)	Нет осадка
Ацетатно-карбонатный буфер	6.2	24 мин	10 ч	Нет осадка	Нет осадка

Примечание. В скобках указан номер ИК-спектра осадка на рис. 3.

* Органический полимер не растворим в данных условиях.

амина. Ранее влияние полиаллиламина на конденсацию H_4SiO_4 изучали при рН 5.5–7 в присутствии различных буферов [8, 12, 16]. В случае фосфатного буфера (рН 5.5) через несколько минут после смешения наблюдали осаждение кремнистого осадка [12]. Нами при попытке повторения этого опыта начало выпадения осадка отмечено лишь через 215 мин. К сожалению, в работе [12] отсутствует детальное описание методики эксперимента, в частности не упоминается, контролировали ли значение рН после добавления раствора полиаллиламина (в виде гидрохлорида) к буферному раствору. По нашим данным, при этом происходит понижение рН до 3.6, в связи с чем все последующие эксперименты включали измерение рН после смешения растворов буферов и полимеров и, при необходимости, коррекцию значения рН 1 М растворами NaOH или HCl.

Результаты, представленные в табл. 1, указывают на понижение активности полiamмолитов в формировании кремнистых осадков с повышением длины спейсера при аминогруппе. Уменьшение рН ускоряет осаждение в случае ПА-4 и ПА-6 и замедляет в системе с ПА-2. Замена фосфатного буферного раствора на ацетатно-карбонатный снижает активность полиаллиламина, но облегчает образование осадка в случае ПА-2 и ПА-4. Исследование состава полученных осадков (табл. 2) свидетельствует о преобладали в них кремнезема, причем осаждается не более 21% исходной кремниевой кислоты.

При обсуждении осаждающего действия силаффинов и полимерных аминов на кремниевую кислоту обычно полагают [8, 12, 16], что эти органические вещества катализируют конденсацию H_4SiO_4 . В то же время известно, что кремниевая кислота способна полимеризоваться в слабо кислой среде, причем скорость такой реакции сильно зависит от рН и концентрации [9]. Для выяснения влияния исследуемых полимеров на конденсацию H_4SiO_4 измеряли концентрацию “свободной” кремниевой кислоты молибдатным методом [9]. Найденные величины относятся к суммарному содержанию мономера и димера. Полученные результаты (рис. 2) свидетельствуют о достаточно быстрой конденсации H_4SiO_4 без добавления органических полимеров, причем конечная концентрация кремниевой кислоты ниже, чем в системах, для которых характерно образование осад-

Таблица 2. Состав и выход композитных осадков, полученных в ацетатно-карбонатном буфере

рН	Поли- мер	Время начала осаждения, мин	Выход, %		Si : полимер в осадке
			по Si	по полимеру	
5.5	ПА-6	100	14.1	3.4	7.2
5.5	ПА-2	60	21.4	3.7	5.2
6.2	ПА-2	24	17.3	10.1	2.1

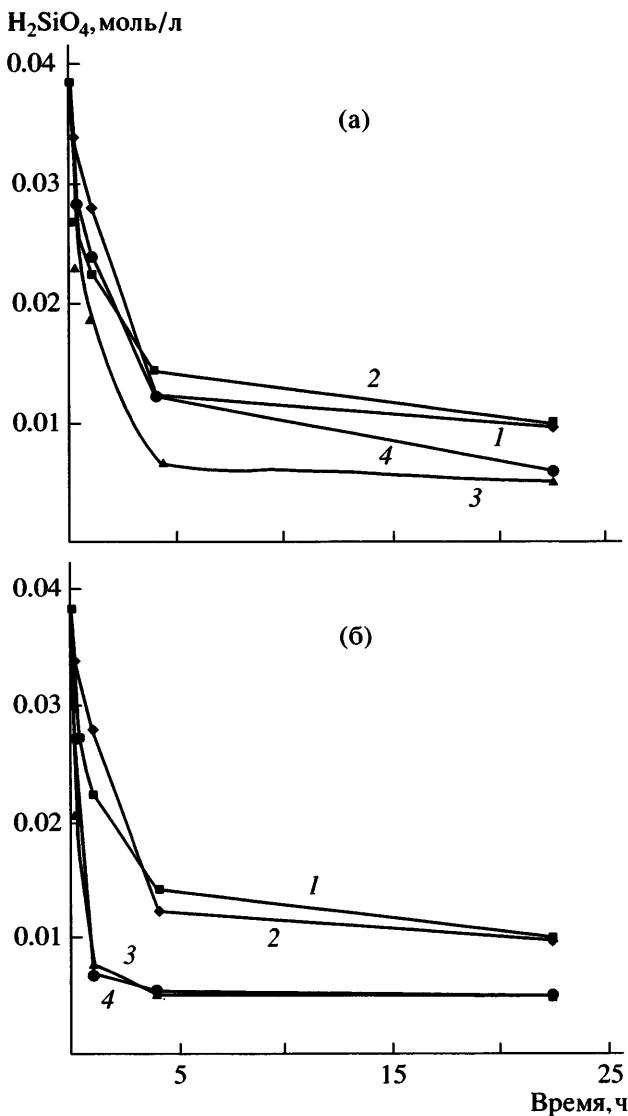
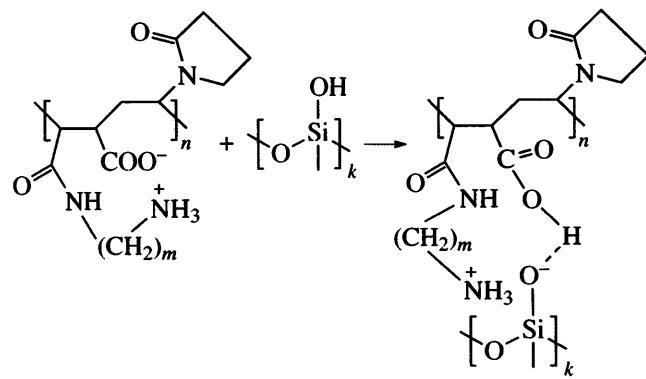


Рис. 2. Зависимость содержания свободной кремниевой кислоты от времени. Исходная концентрация H_4SiO_4 составляет 0.04 моль/л, полимера – 0.032 моль/л. рН 5.5 (а) и 6.2 (б). 1 – ПА-2, 2 – ПА-6, 3 – полиаллиламин, 4 – контроль.

ков. Таким образом, наблюдаемое осаждение кремнистых осадков в слабо кислой области не связано с ускорением конденсации кремниевой кислоты. Кроме того, олигомеры и полимеры H_4SiO_4 способны взаимодействовать с органическими полимерами посредством кооперативных связей [17, 18]. Например, при нейтрализации смеси силиката натрия с поли-1-венилимидазолом получены водородно связанные композитные осадки [19]. На образование осадков при реакции именно с первичными кремнеземными частицами указывает повышение содержания

кремния при увеличении времени начала осаждения (табл. 2). Как известно [9], конденсация кремниевой кислоты в кислой области рН сопровождается постепенным ростом первичных кремнистых наночастиц. Следовательно, чем позже начинает выпадать композитный осадок, тем больший размер имеют кремнеземные частицы в его составе и соответственно повышается содержание кремния.

Строение композитных осадков на основе полиамфолитов изучали методом ИК-спектроскопии (рис. 3). Как и следовало ожидать, в спектрах наблюдаются полосы поглощения фрагментов $Si-O-Si$ (1100 cm^{-1}) и силанольных групп (970 cm^{-1}). Наиболее интересным оказалось изменение интенсивности полосы карбоксилатных групп (1575 cm^{-1}) при образовании композитов. В спектрах полиамфолитов, в том числе выделенных лиофильной сушкой растворов, имеющих рН 5.5 за счет ацетатно-карбонатного буфера, эта полоса достаточно интенсивна (рис. 3, кривые 1–5), что согласуется с малой долей групп $\sim COOH$ в указанной области (рис. 1). В отличие от спектров исходных полимеров полоса при 1575 cm^{-1} существенно менее интенсивна или исчезает вообще при взаимодействии с кремнеземом. Кроме того, заметного увеличения полосы карбоксильных групп ($1710\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) в этих образцах не наблюдается. Данные факты можно объяснить взаимодействием силанольных групп с цвиттер-ионными парами полиамфолитов с образованием системы, стабилизированной водородными и ионными связями:



($m = 2, 4, 6$).

Результаты квантово-химического моделирования (рис. 4) указывают на возможность существования подобных систем. При этом структура

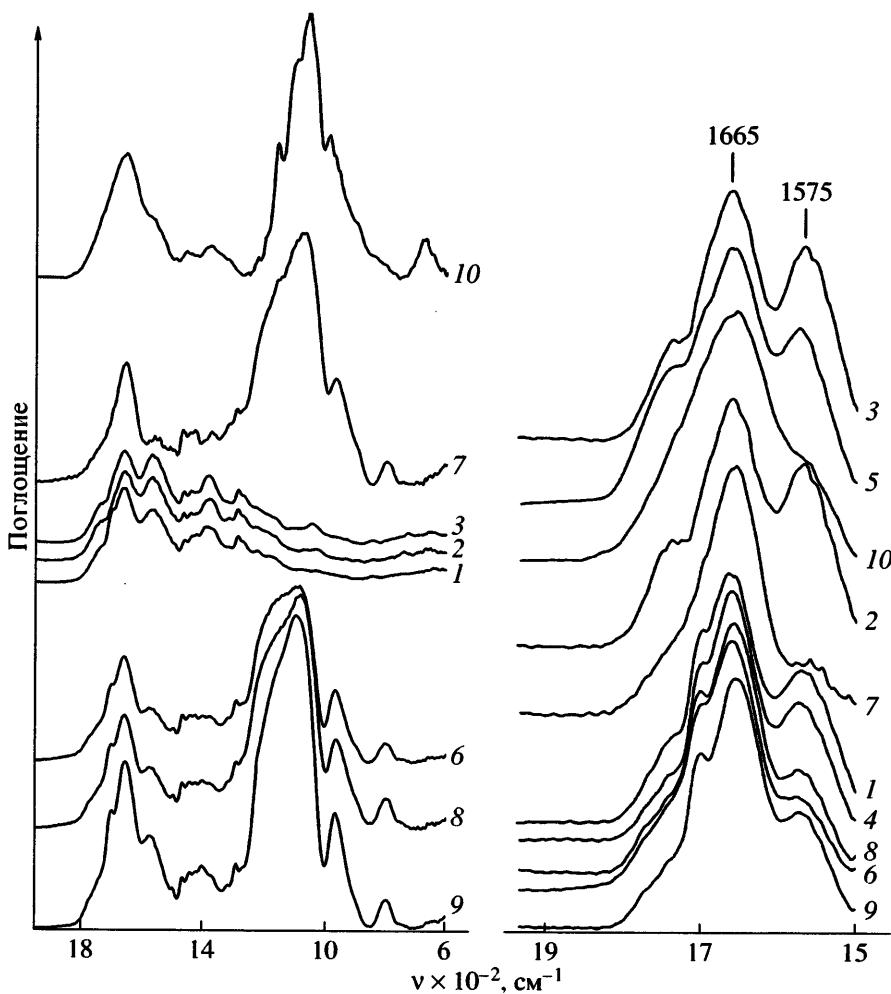


Рис. 3. ИК-спектры полiamфолитов ПА-2 (1), ПА-4 (2), ПА-6 (3), ПА-2 (4) и ПА-6 (5), подкисленных до pH 5.5 раствором KH_2PO_4 и высущенных лиофильно, а также композитных осадков (6–10). Номера и условия получения осадков указаны в табл. 1.

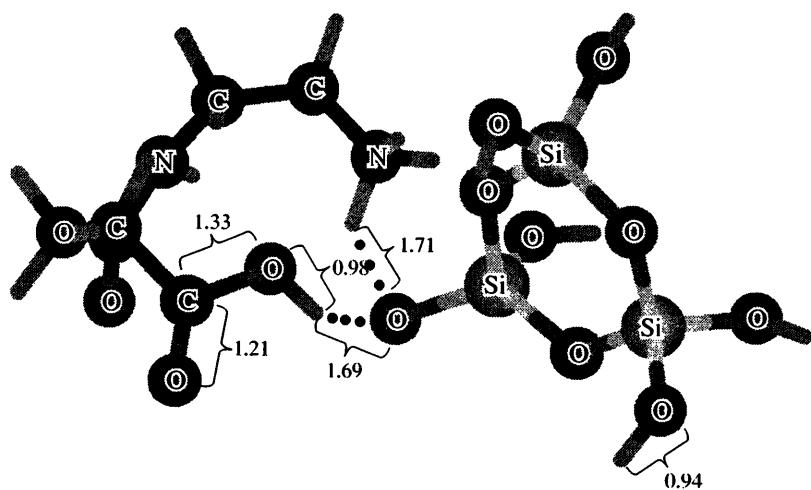


Рис. 4. Результаты квантово-химического моделирования структуры комплекса поликремниевой кислоты и полiamфолита. Для расчета использовали фрагмент ПА-2 и циклический трисиликат. Размеры указаны в ангстремах. Вычисления выполнены в рамках полуэмпирического метода РМЗ.

фрагмента ~COO оказывается промежуточной между карбоксильной и карбоксилатной, что обуславливает перекрывание полосы валентных колебаний соответствующей карбонильной группы с широкой полосой Амида (1665 см^{-1}). При переходе от ПА-2 к ПА-4 и ПА-6 аминогруппа удаляется от основной цепи, и стабильность подобных структур падает, что отражается в уменьшении активности в образовании композитных осадков.

Многозарядные фосфат-анионы, вероятно, способны конкурировать с поликремневой кислотой при взаимодействии с полиамфолитом и понижать его активность. В то же время, как показывают наши и литературные [8, 12] данные, фосфатные ионы необходимы для образования осадков при конденсации кремниевой кислоты под действием полиаллиламина в кислой области. Этот эффект объясняли [8], учитывая осаждающее действие фосфатных анионов на органический полимер с формированием положительно заряженных капель микроэмulsion, обеспечивающих конденсацию кремнезема в нерастворимые частицы. По нашему мнению, соль полиаллиламина и многоосновной фосфорной кислоты можно рассматривать в качестве своеобразного полиамфолита с ИЭТ выше pH 6 (табл. 1, область нерастворимости полиаллиламина в фосфатном буфере). При более низких значениях pH органический полимер растворим, но сохраняется достаточное количество цвиттер-ионных пар, способных реагировать с поликремневой кислотой аналогично ПА-2–ПА-6.

Таким образом, формирование композитных осадков при конденсации кремниевой кислоты в присутствии органических полиамфолитов связано не с их катализитическим действием на реакцию образования силоксановой связи, а с реакцией первичных частиц поликремневой кислоты и органического полимера. Взаимодействие происходит с участием силенольных групп и цвиттер-ионных пар полиамфолита, хотя структура данных связей нуждается в дальнейшем исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронков М.Г., Кузнецов И.Г. Кремний в живой природе. Новосибирск: Наука, 1984.
2. Hamm C.E., Merkel R., Springer O., Jurkojc P., Maier C., Prechtel K., Smetacek V. // Nature. 2003. V. 421. P. 841.
3. Pickett-Heaps J.D. Diatoms: Life in Glass Houses. 2003. (DVD film). Available (http://www.cytographics.com/ecommerce/product_info.php?products_id=30&osCsid=63e97f5b43ae16dc015079f574a43166).
4. Zurzolo C., Bowler C. // Plant. Physiol. 2001. V. 127. P. 1339.
5. Kroeger N., Deutzmann R., Sumper M. // Science. 1999. V. 286. P. 1129.
6. Sumper M., Kroeger N. // J. Mater. Chem. 2004. V. 14. P. 2059.
7. Sumper M., Lorenz S., Brunner E. // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42. P. 5192.
8. Lutz K., Groger C., Sumper M., Brunner E. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2005. V. 7. P. 2812.
9. Айлер Р. // Химия кремнезема. М.: Мир, 1982. Ч. 1. С. 139.
10. Николаев А.Ф., Бондаренко В.М., Шакалова Н.К. // Высокомолек. соед. Б. 1973. Т. 15. № 10. С. 737.
11. Николаев А.Ф., Бондаренко В.М., Шакалова Н.К. // Высокомолек. соед. Б. 1974. Т. 16. № 1. С. 14.
12. Brunner E., Lutz K., Sumper M. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2004. V. 6. P. 854.
13. Даниловцева Е.Н., Анненков В.В., Михалева А.И., Трофимов Б.А. // Высокомолек. соед. А. 2004. Т. 46. № 2. С. 241.
14. Ponratnam S., Prabnakara R.S., Joshi S.G., Kapur S.L. // J. Macromol. Sci. A. 1976. V. 10. № 6. P. 1055.
15. Vrielink E.G., Gieskes W.W.C., Beelen T.P.M. // J. Phycol. 1999. V. 35. P. 548.
16. Patwardhan S.V., Clarson S.J. // J. Inorg. Organomet. Polym. 2002. V. 12. № 3–4. P. 109.
17. Baranovsky V.Y., Suchishvili S.A., Kasaikin V.A., Kabanov V.A. // Eur. Polym. J. 1993. V. 29. P. 111.
18. Papisov I.M., Bolyachevskaya K.I., Litmanovich A.A., Matveenko V.N., Volchkova I.L. // Eur. Polym. J. 1999. V. 35. P. 2087.
19. Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Filina E.A., Likhoshway Ye.V. // J. Polym. Sci., Polym. Chem. 2006. V. 44. № 2. P. 820.

Modeling of Biosilicification Processes with the Use of Water-Soluble Polyampholytes

V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, and I. N. Kotel'nikova

*Institute of Limnology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Ulan-Batorskaya ul. 281, Irkutsk, 664033 Russia*

e-mail: annenkov@lin.irk.ru

Abstract—Polyampholytes containing amino groups at various distances from the backbone have been prepared through the reaction of the maleic anhydride–1-vinyl-2-pyrrolidone alternating copolymer with 1,2-diaminoethane, 1,4-diaminobutane, and 1,6-diaminohexane. The acidic properties of the new polymers and their activity in reaction with silicic acid modeling the biosilicification processes under the action of natural polyampholytes have been studied. It has been established that, in a weakly acidic region ($\text{pH } 5.5\text{--}6$), the synthetic polymers do not catalyze the condensation of silicic acid but are involved in reaction with primary silica particles. The efficiency of this interaction increases with approach of the amino group to the backbone because of a higher probability of formation of the tertiary complex with participation of carboxyl, amine, and silanol groups.