



Высокомолекулярные СОЕДИНЕНИЯ

Серия А

Физика полимеров

Журнал теоретической и экспериментальной
химии и физики высокомолекулярных соединений



НАУКА

— 1727 —



Российская академия наук

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

(Серия А)

Том 66 № 3 2024 Май–Июнь

Основан в январе 1959 г.

Выходит 6 раз в год

ISSN: 2308-1120

*Журнал издается под руководством
Отделения химии и наук о материалах РАН*

Главный редактор

А.А. Ярославов

Международный консультативный совет:

M. Antonietti (Potsdam, Germany), M. Ballauff (Berlin, Germany),
A.A. Berlin (Moscow, Russia), V.M. Buznik (Moscow, Russia), J. Genzer (Raleigh, USA),
A. Grosberg (New York, USA), A.V. Kabanov (Omaha, USA),
P.G. Khalatur (Ulm, Germany/Moscow, Russia), V.G. Kulichikhin (Moscow, Russia),
A.M. Muzafarov (Moscow, Russia), I.A. Novakov (Volgograd, Russia),
A.N. Semenov (Strasbourg, France), S.S. Sheiko (Chapel Hill, USA),
S. Slomkowski (Lodz, Poland), Y.S. Vygodskii (Moscow, Russia),
V.P. Zubov (Moscow, Russia)

Редакционная коллегия:

А.Ю. Бобровский, Э.Р. Бадамшина, В.В. Василевская, Д.Ф. Гришин,
С.А. Дубровский, Я.В. Кудрявцев (зам. главного редактора), С.В. Люлин,
А.Л. Максимов, Ю. Мэнь, А.Н. Озерин, П.М. Пахомов, А.А. Полоцкий,
С.А. Пономаренко, В.Г. Сергеев, И.Л. Федюшкин, О.Е. Филиппова, А.Р. Хохлов,
Е.В. Черникова (отв. секретарь), С. Чжу, Ю.А. Щипунов, А.В. Якиманский

Зав. редакцией Е.Г. Горшенина

Адрес редакции: 119991 Москва, Ленинский пр., 29
ИНХС РАН, тел. 8(495)952-50-68, E-mail: vms@ips.ac.ru

Москва

ФГБУ «Издательство «Наука»

СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 3, серия А, 2024

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА

Изучение проницаемости изделий гироидной структуры, изготовленных по аддитивной технологии 3d-печати термопластичным полимером

В. Б. Демьяновский, Д. А. Каушанский, А. С. Дрозд 175

ПОЛИМЕРНЫЕ ГЕЛИ

Ионно-индуцированное гелеобразование альгината в присутствии аланингидроксиматных металлакранов Sr(II), Ca(II) и La(III)

М. А. Батенькин, Н. Д. Анисимова, М. Ю. Захарина, Г. С. Забродина, М. А. Каткова, С. А. Чесноков 181

Реологические свойства и кинетика набухания гидрогелей на основе полимерных комплексов пектина и арабиногалактана

В. А. Киселев, Р. Х. Мударисова, Л. А. Бадыкова, С. В. Колесов, В. З. Мингалеев 191

МЕДИЦИНСКИЕ ПОЛИМЕРЫ

Синтез, реологические свойства и гемосовместимость альгиновой кислоты, модифицированной фрагментами этилендиамина

М. А. Торлопов, Н. Н. Дрозд, П. А. Ситников, В. И. Михайлов, Е. В. Удортина 201

КОМПОЗИТЫ

Влияние магнитного поля на структуру и сорбционные свойства плёнок на основе гидроксиэтилцеллюлозы и углеродных нанотрубок

С. А. Вшивков, Е. В. Русинова, А. Г. Галяс 216

Применение гуанидинсодержащих органоминеральных комплексов для защиты пластикутов поливинилхлорида от фото- и биодеструкции

В. А. Герасин, М. В. Журина, В. В. Куренков, Д. И. Менделеев 222

РЕОЛОГИЯ

Удар упругой капли по тонкому цилиндру

А. О. Руденко, А. Н. Рожков 232

ТЕОРИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ

О разделении пептидов с инвертированными последовательностями

А. В. Горшков, И. Г. Роздина, М. Л. Придатченко 244

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ИЗДЕЛИЙ ГИРОИДНОЙ СТРУКТУРЫ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ ПО АДДИТИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ 3D-ПЕЧАТИ ТЕРМОПЛАСТИЧНЫМ ПОЛИМЕРОМ

© 2024 г. В. Б. Демьяновский, Д. А. Каушанский, А. С. Дрозд*

Институт проблем нефти и газа Российской академии наук

119333 Москва, ул. Губкина, 3

**e-mail: asd@ipng.ru*

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 25.07.2024 г.

Принята в печать 04.08.2024 г.

Впервые исследована зависимость пористости (степени заполнения) от проницаемости гироидной структуры на установке для фильтрационных свойств. Изготовлены образцы с использованием систем автоматизированного проектирования и 3D-принтера. Также показана анизотропность проницаемости гироидной структуры в различных направлениях.

DOI: 10.31857/S2308112024030011, EDN: LXGRBQ

ВВЕДЕНИЕ

Аддитивная технология – это метод создания трехмерных объектов путем добавления различных материалов, например пластика, металла и т.д. В настоящее время разработано большое количество таких технологий, среди них создание объектов наплавлением полимерной нити, лазерная стереолитография, селективное лазерное спекание и другие методы [1].

На применение аддитивных технологий установлены национальные и международные стандарты [2–4]. Однако благодаря своей доступности, наибольшее распространение получила технология послойного наплавления полимерной нити (Fused Deposition Modeling – FDM).

Основные этапы FDM-технологии печати:

- создание модели изделия в системе автоматизированного проектирования (CAD-системы) [5];
- создание STL-файла модели [6];
- нарезка модели на слои специальной программой для создания управляющего файла в формате G-кода, т.е. программой, непосредственно управляющей работой принтера при изготовлении изделия [7];
- 3D-печать.

Хотя традиционно считается, что этап создания модели в CAD-системе является приоритетным в проектировании изделия, для

исследований в настоящей работе была выбрана стадия нарезки модели на слои. На этой стадии используется программное обеспечение для принтера, преобразующее файл в формате STL в файл в формате G-кода, который непосредственно контролирует работу принтера. Кроме того, эта программа позволяет управлять механическими свойствами создаваемого изделия через формирование заданной структуры материала, что аналогично созданию надмолекулярной структуры вследствие влияния сил внутримолекулярного и межмолекулярного взаимодействия полимерных звеньев. Типов надмолекулярных структур много, но при их классификации наиболее распространено деление по их размерным группам, нм: 2–10 (кристаллиты), 10–50 (монокристаллы), 10^2 – 10^5 (фибриллы) и 10^4 – 10^6 (сферолиты) [8].

Если сопоставить размер надмолекулярных структур с возможностями образования структур аналогичной размерности с применением аддитивных технологий ($\sim 10^3$ – 10^6 нм), то такие технологии можно рассматривать не только как средство создания изделий, но и как инструмент создания новых материалов с различными свойствами.

В связи с этим возникла идея использовать технологию 3D-печати для проницаемых структур, которые можно использовать в областях, когда процессы фильтрации жидкостей играют определяющую роль. Первоначально проницаемая структура по технологии 3D-печати была

изготовлена в виде модели фиктивного грунта – массива сферических элементов [9]. Анализ работ в этом направлении выявил, что имеется патент [10], описывающий скважинный гравийный фильтр, в котором структура гранул и форма фильтра выполняются из полимеров, представляющих собой спроектированную пористую структуру из гранецентрированных сфер, называемую цифровой упаковкой и напечатанную 3D-принтером как единый блок. С помощью 3D-печати также можно создавать щелевой скважинный фильтр [11].

Практическое управление структурой материала изделия при 3D-печати производится в меню “разрезающей” программы – слайсера. Меню программы предлагает различные топологии заполнения внутреннего пространства [12], однако их использование приводит к образованию закрытых объемов во всех или некоторых направлениях.

В процессе работы по созданию проницаемых структур методом 3D-печати применен такой функционал программного обеспечения 3D-принтера, как опция заполнения пространства изделия структурой типа гироид.

Гироид, открытый и описанный математической моделью в 1970 году американским ученым Аланом Шоэном [13], представляет собой трижды периодическую минимальную поверхность. А. Шоэн вычислил угол ассоциации, но не привел доказательство возможности вложения. Это уже было представлено в более поздних работах, а также некоторые другие численные исследования [14, 15]. Данная поверхность обладает уникальными механическими свойствами, что обуславливает интерес к гироидам в различных сферах наукоемкой промышленности [16]. Вместе с тем гироидные структуры обнаружены и в живой природе как на уровне клеток (мезофазы липидов), так и на более крупном уровне (структурная окраска крыльев бабочек, оперение птиц) [17].

Сегодня изучение гироидных структур имеет важное прикладное значение для различных сфер, среди них биомедицинские технологии, химическая промышленность, космическая и оборонная отрасли, изготовление стойких к ударным нагрузкам материалов [16, 18–22]). Механические свойства гироидов (прочность, высокая степень поглощения механических волн и другие) в сочетании с их легкостью открывают перспективу создания новых материалов самого широкого применения.

С появлением технологии 3D-печати гироиду было найдено применение в качестве одного из вариантов заполнений внутреннего пространства 3D-моделей. Использование так

называемого “гироидного” заполнения позволяет снизить расход материала для печати при сохранении высоких прочностных свойств целого изделия [23–25].

Интересным представляется рассмотреть свойства этих структур с позиции соотношения пустого пространства к массе материала для его создания. Благодаря связанной структуре пространства предполагается высокая проницаемость материалов для жидкостей и газов, а следовательно, возможность их использования в процессах фильтрации.

Исследование фильтрационных способностей гироидной структуры является актуальным и нуждается в экспериментальных разработках [26]. Среди способов создания гироидов наибольший прогресс достигнут в технологии экструзии полимерной нити при 3D-печати (FDM) [27, 28].

В настоящей работе разработана методика исследования фильтрационных свойств и изучена связь структуры гироида с коэффициентом проницаемости материалов, произведенных по этой технологии, которая может быть установлена как на стадии изготовления физического объекта, так и на стадии проектирования.

Для создания гироидных структур применяют следующие программные обеспечения: MeshLab [29] и Autodesk Fusion 360 [30]. На стадии изготовления цифровой модели гироида ориентируются на его уравнение в тригонометрическом представлении [16]:

$$\sin y \cos x + \sin z \cos y + \sin x \cos z = t$$

Несмотря на то что гироид рассматривается как двумерная поверхность, ее физический эквивалент должен иметь некоторую толщину, а значит, занимать определенный объем. При этом пространство реального (физического) гироида разделяется как бы на две части объема, одна из которых заполняется твердым материалом, например полимером, а другая – остается пустой. Таким образом, важной характеристикой реального гироида является отношение объема, заполненного твердым материалом пространства, гироида к общему объему объекта, которое можно назвать степенью заполнения. Если в приоритете пустой объем, то удобнее применять дополнительную величину – отношение пустого объема к общему объему, которое следует назвать пористостью.

Пустое пространство, отделенное гироидом, считается связанным, т.е. гироид образует материал с открытой пористостью. По этим порам допускается движение жидкой и газовой фазы. Данное обстоятельство позволяет использовать

методики исследования и показатели, применяемые в гидродинамических моделях для пористых сред.

Традиционно в качестве гидродинамической модели фильтрации жидкости через такие среды применяют уравнение Дарси:

$$Q = \frac{kA \Delta P}{\mu L}, \quad (1)$$

где Q – расход жидкости через модель, м³/с; k – коэффициент проницаемости, м²; A – площадь фильтрации, м²; μ – динамическая вязкость жидкости, Па·с; ΔP – перепад давления, Па; L – длина образца, м.

Существует возможность создания структур физического гироида с широким диапазоном варьирования показателей степени заполнения или проницаемости. Практика 3D-печати с применением параметра степени заполнения до 10% и менее свидетельствует о том, что эти структуры должны обладать особо высокой проницаемостью, в связи с чем для ее измерения необходимо было разработать нестандартную методику определения, описание которой представлено далее в экспериментальной части.

Формула гироида в силу симметрии не имеет выделенных направлений относительно координатных осей, поэтому предполагается, что проницаемость не будет зависеть от направления потока. Вместе с тем анализ процесса создания изделия по FDM-технологии показывает, что имеются отличия в процессе формирования структуры печати в горизонтальном и вертикальном направлениях. По этой причине при изготовлении и изучении образцов была исследована возможность измерения проницаемости образцов в различных направлениях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве технологии создания гироида использовали технологию производства способом наплавления нитей (FDM) на 3D-принтере “Picasso Designer X”. Материалом для печати служил натуральный бесцветный пластик полиэтилентерефталатгликоль (ПЭТФГ), так как он обладает низкой усадкой и химической стойкостью к воде и другим реагентам. Параметры печати: сопло 0.30 мм, диаметр филамента 1.75 мм, температура сопла 240 °С, температура стола 70 °С, скорость печати 20 мм/с.

Образцы со структурой гироид изготовили в виде кубов со стороной 30 мм с использованием

программного обеспечения 3D-принтера, которое имеет встроенные настройки для создания различной топологии заполнения внутреннего пространства куба (рис. 1). При печати удалили в настройках поверхности граней. Для создания разных по размеру пор в структуре заполнения использовали параметр “степень заполнения” при значениях 40, 50, 60 и 70% или 60, 50, 40 и 30% пористости соответственно. Кроме того, автоматически создали цифровую копию модели, позволяющую провести предварительный просмотр процесса послойного изготовления изделия:

При образовании одного слоя гироида в горизонтальной плоскости формируется двумерная проекция внутренней структуры изделия с характерным периодическим расположением полимерной нити. Наблюдение за процессом печати позволило установить, что пространственная периодическая структура гироида в трехмерном пространстве связана параметрами печати в единичном слое. Пример печати слоя при настройках принтера для различных степеней заполнения приведен на рис. 2, где видна характерная периодическая структура траектории филамента на первом слое печати. Последующие слои накладываются на предыдущие с поворотом на 90°, образуя сетку. Размер поровых каналов гироида можно оценить из отношения длины грани куба (30 мм задается при проектировании), разделенное на число периодов траектории филамента (например, 12 – для степени заполнения 40%), что в результате дает величину 2.5 мм. Для степени заполнения 70% рассчитанный размер порового канала равен 1.4 мм. Реальный размер канала следует уменьшить на величину диаметра нити, выдавливаемой из экструдера (примерно соответствует размеру сопла экструдера, в данном случае – 0.3 мм). Рассчитанный размер каналов может быть необходим для оценки возможности применения гироида в качестве фильтрующего материала при удалении механических примесей известного размера из жидкостного потока:

Исследование фильтрационных свойств проводили на специально сконструированной установке (схема установки показана ниже), состоящей из резервуара для жидкости (3), вертикальной прозрачной измерительной трубки (2), в нижней части которой закреплен переходник, соединяющий круглую измерительную трубку и измеряемый объект в виде куба (4). Переходник спроектирован и изготовлен на 3D-принтере под размер куба. Компоновка, включающая трубку, переходник и образец, закреплена на платформе (5), которая перемещается линейным приводом (6) в вертикальном направлении под действием электродвигателя. Контроль за перемещением

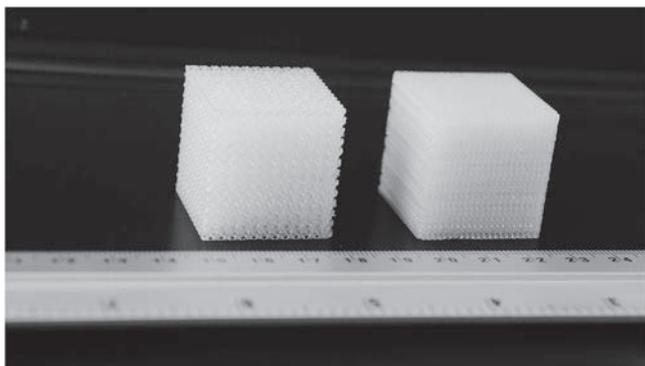
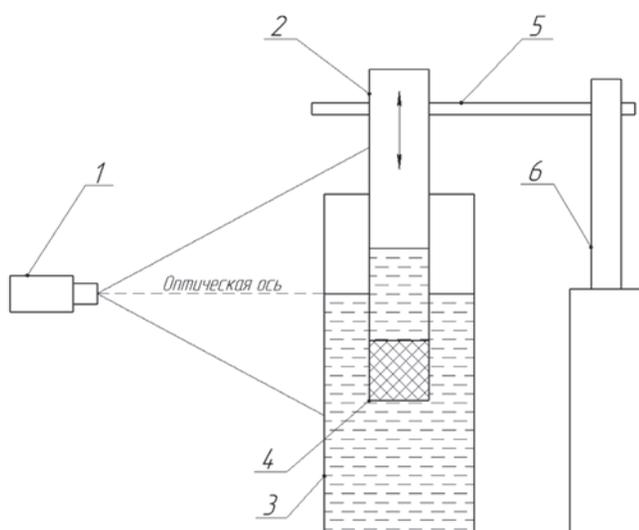


Рис. 1. Образцы кубов с гироидным заполнением, изготовленные по FDM-технологии.

платформы и положением мениска жидкости в измерительной трубке и резервуаре осуществляли посредством регистрации событий цифровой камерой (1):



Условия проведения гидродинамических испытаний: скорость движения жидкости 1 см/с, внутренний размер трубки прибора 37 мм. В качестве жидкости использовали воду, а измерения вели при температуре 20–25 °С. Применяемые параметры течения жидкости в измерительной трубке и образце указывали на ламинарный режим потока (число Рейнольдса < 400).

Измерения выполняли в два этапа: на первом этапе осуществляли погружение образца в резервуар с водой с закрепленной при помощи переходника к прозрачной измерительной трубке под мениск жидкости; на втором – подъем компоновки измерительной трубки и образца с постоянной скоростью с фиксацией видеозаписью положения менисков жидкости в сосуде и измерительной трубке. При анализе видеозаписи отбирали фрагменты с кадрами, на которых наблюдаются

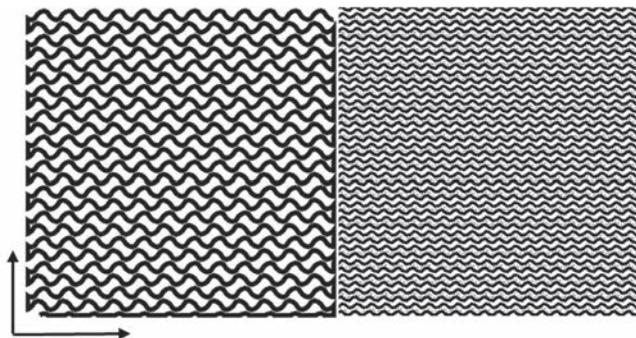


Рис. 2. Изображение первого слоя печати структуры гироида при параметрах степени заполнения 40 и 70%.

постоянные скорость движения платформы и разность уровней менисков воды в трубке и резервуаре, что соответствует режиму стационарной фильтрации жидкости. Объемную скорость фильтрации жидкости в этом случае находили из линейной скорости движения платформы и внутреннего диаметра измерительной трубки.

Для измерения проницаемости образца в вертикальном и горизонтальном направлениях положение кубического образца изменяли в соответствии с направлениями куба, создаваемого на столе 3D-принтера. Принятые обозначения: ось Z – соответствует вертикальной оси, X и Y – соответствуют направлениям в горизонтальной плоскости.

Результаты экспериментального определения зависимости коэффициента проницаемости гироидной структуры от направления координатных осей при печати (рис. 3) указывают на возрастание проницаемости в вертикальном направлении печати по сравнению с горизонтальным.

Полученная зависимость проницаемости ожидаемо оказалась обратной от степени заполнения общего пространства образца. Однако измерение проницаемости, проведенное в направлении различных пространственных осей, показало более высокую в образцах в вертикальном направлении по сравнению с горизонтальным. Отклонение заметно при малых значениях степени заполнения, соответственно, при высокой пористости.

Кроме того, было проведено сравнение проницаемости гироидных структур, полученных по аддитивной технологии, с типичными материалами, через которые протекает жидкость. К таким материалам, например, относятся гравий и песок, встречающиеся в природе и используемые в качестве материалов фильтров. Из табл. 1 видно, что в сравнении с породами нефтяного пласта проницаемость гироидных структур на два–три порядка оказывается выше:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучен процесс 3D-печати структуры “гиرويد” по технологии наплавления полимерной нити с помощью программного обеспечения 3D-принтера “Picasso” и показана возможность определения размера поровых каналов на этапе подготовки модели перед загрузкой в принтер. Разработана лабораторная методика измерения проницаемости гиرويدных структур на основе уравнения Дарси.

Было установлено, что проницаемость структуры “гиرويد” находится в обратной зависимости от степени заполнения изделия (согласно настройкам принтера) и может достигать значений от 1 000 до 5 000 Дарси. Также выявлена повышенная проницаемость гироида в направлении, перпендикулярном горизонтальному положению рабочего стола 3D-принтера, в области малых степеней заполнения, которая связывается с асимметрией траектории филамента в вертикальном и горизонтальном направлениях в процессе печати.

Работа выполнена в рамках Госзадания Института проблем нефти и газа РАН на тему “Фундаментальный базис энергоэффективных, ресурсосберегающих и экологически безопасных, инновационных и цифровых технологий поиска, разведки и разработки нефтяных и газовых месторождений, исследование, добыча и освоение традиционных и нетрадиционных запасов и ресурсов нефти и газа; разработка рекомендаций по реализации продукции нефтегазового комплекса в условиях энергоперехода и политики ЕС по декарбонизации энергетики (фундаментальные, поисковые, прикладные, экономические и междисциплинарные исследования)” (№ 122022800270-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ляпков А.А. Полимерные аддитивные технологии: учебное пособие. Томск: Изд-во Томского политех. ун-та, 2016.
2. ГОСТ Р 57558-2017. Аддитивные технологические процессы. Базовые принципы. Ч. 1. Термины и определения.
3. ГОСТ Р 57558-2017. Аддитивные технологические процессы. Базовые принципы. Ч. 2. Материалы для аддитивных технологических процессов. Общие требования.
4. ГОСТ Р ИСО/АСТМ 52950-2022. Представление и обработка данных технологического процесса.
5. https://ru.wikipedia.org/wiki/Система_автоматизированного_про-ектирования (дата обращения 29.05.2024).

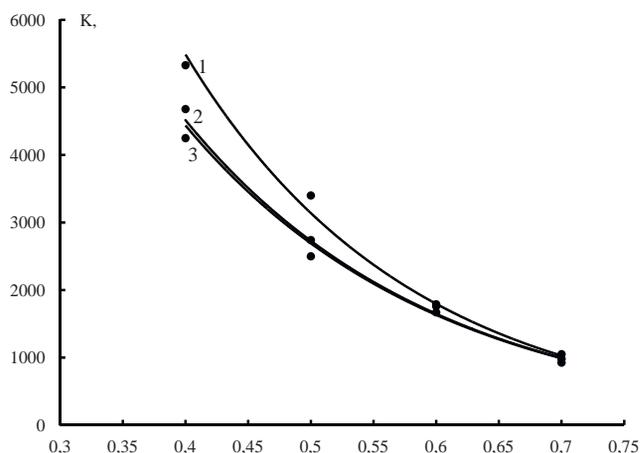


Рис. 3. Зависимость проницаемости материала со структурой порового пространства “гиرويد” от степени заполнения в направлениях Z (1), X (2) и Y (3).

Таблица 1. Сравнение проницаемости гиرويدных структур с типичными распространенными материалами, через которые протекает жидкость

Среда	Пористость	Проницаемость, Д
Полимерный гиرويد	60	4753
	50	2880
	40	1740
	30	985
Гравий	30	(10–100) × 10 ³
	20–30	100–1000
Сортированный песок	20–30	0.1–10.0
Породы нефтяного пласта	20–30	0.1–10.0

6. <https://ru.wikipedia.org/wiki/STL> (дата обращения 29.05.2024).
7. <https://ru.wikipedia.org/wiki/G-code> (дата обращения 29.05.2024).
8. <https://bigenc.ru/c/kristallichesкое-sostoianie-polimerov-96ff83> (дата обращения 29.05.2024).
9. Демьяновский В.Б. // Актуальные проблемы нефти и газа. 2022. № 4(39). С. 117.
10. Пат. 2020/0378219 US. Способ и системы для борьбы с песком, опубл. 05.12.2020.
11. Пат. 2808822 С1 Российская Федерация. 2022 // Институт проблем нефти и газа РАН. 2023. МПК E21B 43/08, E03B 3/18. EDN NEPQDP.
12. Шалыгин С.В. // Молодежь. Наука. Творчество: Матер. XIX Всеросс. науч.-практич. конф.

- Омск: Омский гос. технич. ун-т, 2021. С. 20. EDN DBFVDE.
13. Schoen A.H. Infinite Periodic Minimal Surfaces Without Self-Intersections. NASA Technical Note, 1970.
 14. Karcher H. The Triply Periodic Minimal Surfaces of Alan Schoen and their Constant Mean Curvature Companions. *Manuscripta Math* 64, 1989. P. 291.
 15. Große-Brauckmann K., Meinhard W. The Gyroid is Embedded and has Constant Mean Curvature Companions. *Calc. Var* 4, 1996. P. 499.
 16. Дьяченко С.В., Лебедев Л.А., Сычев М.М., Нефедова Л.А. // Журн. технич. физики. 2018. Т. 88. С. 1014.
 17. Pelanconi M., Ortona A. // *Materials* (Basel). 2019. V. 12. № 24. P. 4134.
 18. Крупнин А.Е., Чичаев И.А., Крашенинников С.В., Алексанян М.М., Спириун О.А., Седуш Н.Г., Чвалун С.Н. // V Национальный конгресс по регенеративной медицине: “Применение гироидных PLA-скаффолдов для замещения дефектов костных тканей”, 2022. Т. 17. № 3. С. 125.
 19. Musthafa N.H.-S., Walker J., Rahman T., Bjørkum A., Mustafa K., Velauthapillai D. // *Computation*. 2023. V. 11. P. 181.
 20. Ramos H., Santiago R., Soe S., Theobald P., Alves M. // *Int. J. Impact. Eng.* 2022. V. 164. P. 104202.
 21. Mirables R., Ranz D., Higuera S. // *Study of the Application of Gyroid Structures in Cyclist Helmets*. Valencia, 2021. P. 64.
 22. Simsek U., Gayir C., Kavas B., Sendur P. // II Int. Conf. on Simulation for Additive Manufacturing: “Computational and Experimental Investigation of Vibration Characteristics of Variable Unit-Cell Gyroid Structures”, 2019. P. 369.
 23. Rahmat Neda, Kadkhodapour Javad, Arbabtafti Mohammadreza // *Phys. Mesomech.* 2023. V. 26. № 4. P. 443.
 24. Арсентьев М.Ю., Калинина М.В., Тихонов П.А., Ковалько Н.Ю., Сычев М.М. // XVII Всеросс. молодежная науч. конф. с элементами науч. школы: “Функциональные материалы: синтез, свойства, применение”, посвященной 110-летию со дня рождения член.-корр. АН СССР Н.А. Торопова : Тез. докл. Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН. СПб: ЛЕМА, 2018. С. 211. EDN YUXVDF.
 25. Бурдина П.А. // Наука, образование, производство в решении экологических проблем (Экология-2022). Матер. XVIII Межд. науч.-технич. конф. Уфа: Уфимский гос. авиационный технич. ун-т, 2022. С. 124. Т. 2. EDN DEDGVY.
 26. Alizadeh-Osgouei M., Li Y., Vahid A., Ataee A., Wen C. // *Smart Mater. Medicine*. 2021. V. 2. P. 15.
 27. Chen P., Wang H., Su J., Tian Y., Wen S., Su B., Yang C., Chen B., Zhou K., Yan C., Shi Y. // *Adv. Mater.* 2022. V. 34. P. 2200750.
 28. Козадаева М.П., Сурменева М.А., Сурменев Р.А., Леонова Л.А., Храпов Д.А., Панин А.В., Коптюг А.В. // Межд. конф. “Физическая мезомеханика. Материалы с многоуровневой иерархически организованной структурой и интеллектуальные производственные технологии”, посвященная 90-летию со дня рождения основателя и первого директора ИФПМ СО РАН академика Виктора Евгеньевича Панина в рамках Межд. междисциплинарного симп. “Иерархические материалы: разработка и приложения для новых технологий и надежных конструкций”. Томск: Томский гос. ун-т, 2020. С. 529.
 29. Макаренко М.С., Лештаев Д.В., Гопкало В.Н., Пиотрович А.А. // Научно-техническое и экономическое сотрудничество стран АТР в XXI веке. 2020. Т. 2. С. 366. EDN NEXPLZ.
 30. [https://en.wikipedia.org/wiki/Permeability_\(materials_science\)#cite_note-12](https://en.wikipedia.org/wiki/Permeability_(materials_science)#cite_note-12) (дата обращения 30.05.2024).

ИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЕ ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ АЛЬГИНАТА В ПРИСУТСТВИИ АЛАНИНГИДРОКСИМАТНЫХ МЕТАЛЛАКРАУНОВ Sr(II), Ca(II) И La(III)

© 2024 г. М. А. Батенькин, Н. Д. Анисимова, М. Ю. Захарина, Г. С. Забродина,
М. А. Каткова, С. А. Чесноков

*Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева Российской академии наук
603137, г. Нижний Новгород, ул. Троишнина, 49*

**e-mail: batenkinmax@iomc.ras.ru*

Поступила в редакцию 28.03.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Впервые исследована возможность использования водорастворимых гетероядерных металлмакроциклических комплексов Sr(II)–Cu(II), Ca(II)–Cu(II), La(III)–Cu(II) в качестве сшивающих агентов для альгинатных гидрогелей. Экспериментально продемонстрирована возможность ион-индуцированного сшивания альгината катионами металлкраунов. Методом экструзии синтезированы гидрогелевые альгинатные микросферы с применением металлкраунов в качестве сшивающих центров. Установлено, что степень сшивки гидрогелей зависит от природы центрального элемента металлкрауна. По своим сшивающим способностям рассмотренные металлкрауны (MC(M)) располагаются в следующий ряд: MC(La) > MC(Sr) > MC(Ca).

DOI: 10.31857/S2308112024030021, EDN: LXFNZI

ВВЕДЕНИЕ

Гелеобразование биополимеров активно исследуется для получения прочных и не растворимых в воде и в водных растворах полимерных комплексов – гидрогелей [1–5]. Гидрогели на основе биополимеров, благодаря своим уникальным механическим и физико-химическим свойствам, а также высокой биосовместимости и нетоксичности, находят широкое и разностороннее применение в медицине [6–10], биомедицине [10], в пищевой промышленности [11, 12], фармакологии [6], косметике, биотехнологии и биоинженерии [13–15]. Одним из самых универсальных природных материалов, который образует гидрогели, является натриевая соль альгиновой кислоты [16, 17, 18]. Альгинат натрия – это линейный неразветвленный полисахарид, получаемый из морских водорослей, который содержит в составе полимолекулы повторяющиеся звенья 1,4-связанной β-D-маннуриновой кислоты и α-L-гулуриновой кислоты. Он способен быстро формировать обратимые гидрогели в мягких условиях (нейтральный pH и умеренные температуры) [19–21]. Полимерные гидрогели на его основе нетоксичны, биосовместимы, биодеградируемы и обладают мукоадгезионными свойствами, что делает их перспективными для

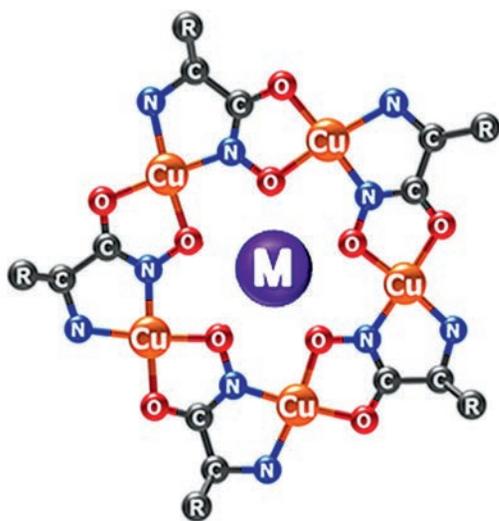
создания гидрогелей биомедицинского применения, в том числе для систем доставки лекарственных веществ с регулируемым высвобождением [7, 22–25]. Необходимо отметить, что альгинат используется для получения микросфер-биоcontainers для клеточного материала, которые должны обладать максимальной стабильностью для сохранения его жизнеспособности и функциональной активности [21].

В основе образования альгинатных гидрогелей лежит ионно-индуцированное взаимодействие карбоксильных групп альгиновой кислоты с положительно заряженными ионами [3]. Молекулы полимера координируются вокруг центра/ядра, роль которого выполняет подходящий по химическим свойствам ион металла, с образованием металл-альгинатного комплекса. Природа и тип сшивающего иона во многом определяет конечные свойства гидрогеля, его характеристики и область применения [26, 27]. Как правило, в качестве сшивающих центров для сборок полимерных гидрогелей используют катионы двухвалентных металлов. Наиболее часто встречающиеся в литературе – катионы Va^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Эти системы достаточно хорошо изучены как с точки зрения механизма гелеобразования и внешних факторов, влияющих на него,

так и конечных свойств геля [19, 28–33]. В случае нахождения микросфер из таких гидрогелей в живом организме сшивающие ионы могут вымываться из геля, что будет приводить к ухудшению его физико-механических свойств, вплоть до полного разрушения. Использование трехвалентных и четырехвалентных металлов Al^{3+} , Fe^{3+} , Sr^{3+} [19, 29] и Ti^{4+} и Zr^{4+} [34] в качестве сшивающих катионов позволяет формировать гидрогели с более высокой по сравнению с двухвалентными металлами степенью сшивки и соответственно стабильностью.

Особый интерес вызывают трехвалентные ионы лантаноидов (Nd, Gd, Ce и Yb), проявляющие высокую координационную способность в ионно-индуцированной сшивке альгината натрия [35–37]. Гибридные полимерные материалы на их основе обладают уникальными флуоресцентными свойствами ионов лантаноидов и характеризуются уникальной механической гибкостью и высокой химической стабильностью [37].

В рамках дальнейшего изучения применения ионов необычного строения несомненный интерес вызывают комплексные соединения, представляющие класс полиядерных аланингидроксиматных металамакроциклических соединений – металакраунов, структурно напоминающих краун-эфир [38–42], которые известны своим широким спектром биологической активности [43, 44]. Особенность их строения – наличие плоского металамакроцикла, состоящего из ионов меди(II) и аланингидроксиматных лигандов, а также координационно связанного центрального иона металла. Ниже приведена молекулярная структура металакраунов: $M = Ca(II)$, $Sr(II)$, $La(III)$.



Такая структура обеспечивает потенциальную возможность для аксиальной координации дополнительных анионов, что может позволить

использовать металакрауны в качестве центров сшивки альгината натрия.

В настоящей работе впервые исследована способность альгината натрия к образованию гидрогелей в присутствии водорастворимых гетероядерных металамакроциклических комплексов $Sr(II)-Cu(II)$, $Ca(II)-Cu(II)$, $La(III)-Cu(II)$ в качестве новых сшивающих агентов. Интерес к таким исследованиям обусловлен возможностью получения нового гибридного полимерного материала с перспективными свойствами за счет биологически активных аланингидроксиматных металакраунов и нетоксичной природы гидрогеля альгината-Na.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Натриевая соль альгиновой кислоты из бурых водорослей (альгинат натрия) была приобретена у “Sigma” (A1112, низкая вязкость, $\eta = 4–12$ сП, 1% в H_2O при $25^\circ C$). Аланингидроксиматные металакрауны ($MC(M)$), где $M = Ca(II)$, $Sr(II)$, $La(III)$ были получены ранее по методикам [45, 46].

Формирование $MC(M)$ -альгинатных гидрогелевых микросфер

Гелеобразующие растворы готовили из кристаллических металакраунов и дистиллированной воды (концентрация 50, 25 и 12.5 мг/мл). Альгинат натрия растворяли в дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл. Для формирования гидрогелевых микросфер полученный раствор в объеме 2 мл добавляли капельно через инъекционную иглу (маркировка 21G, скорость подачи 0.023 мл/с) к гелеобразующим растворам объемом 10 мл при непрерывном умеренном перемешивании ($T = 25^\circ C$).

Полученные микросферы выдерживали в гелеобразующем растворе в течение 45 мин в режиме постоянного перемешивания на магнитной мешалке для предотвращения возможного слипания. Для определения количества $MC(M)$ вошедшего в гидрогель в ходе гелеобразования через заданные промежутки времени из гелеобразующего раствора металакрауна отбирали пробы по 0.2 мл, разбавляли дистиллированной водой до объема, равного 3 мл, и определяли концентрацию $MC(M)$ в них спектрофотометрически. Спектр поглощения исходного гелеобразующего раствора снимали до начала экструзии раствора альгината натрия. Первый отбор производили через 30 с после прекращения экструзии, затем брали пятнадцать проб каждые две минуты,

после этого временные интервалы между пробами составляли 5 мин.

Массу вошедшего в гидрогель МС(М) (m_{in}) определяли по убыли концентрации МС(М) в гелеобразующем растворе:

$$m_{in} = (C_0 - C_{end}) \cdot V_0 - \left(\sum_{i=1}^N C_i - N \cdot C_{end} \right) \cdot \Delta V, \quad (1)$$

Здесь C_0 , C_{end} – исходная и конечная концентрации МС(М) в гелеобразующем растворе, C_i – концентрации МС(М) в пробе, $V_0 = 10$ мл – исходный объем гелеобразующего раствора, $\Delta V = 0.2$ мл – объем отбираемых проб, N – количество проб. Стоит отметить, что второе слагаемое в выражении учитывает уменьшение объема гелеобразующего раствора за счет отбора проб для спектрофотометрического анализа.

Считая, что весь альгинат натрия переходит в гидрогель, и пренебрегая изменением его объема, концентрацию вошедшего в гидрогель МС(М) (C_{in}) можно найти из выражения

$$C_{in} = \frac{m_{in}}{V_{Alg}}, \quad (2)$$

где $V_{Alg} = 2$ мл – объем альгината натрия, добавленного в гелеобразующий раствор.

После завершения гелеобразования образовавшийся гидрогель отделяли от гелеобразующих растворов и помещали в 20 мл дистиллированной воды. Концентрацию вышедшего из гидрогеля МС(М) определяли также методом спектрофотометрии. Спектры поглощения регистрировали через определенные промежутки времени в течение 60 мин до постоянного значения оптической плотности раствора. Первый спектр снимали через 30 с после помещения гидрогеля в воду, последующие – через неэквидистантные промежутки времени, которые при этом фиксировались. Массу МС(М) (m_{out}), вышедшего из гидрогеля в ходе промывания, определяли следующим образом:

$$m_{out} = C_{wash} \cdot V_{wash}, \quad (3)$$

где C_{wash} – установившаяся концентрации МС(М) в промывочном растворе, $V_{wash} = 20$ мл – объем промывочного раствора.

Концентрацию участвующего в образовании МС(М)-альгинатного комплекса МС(М) (C_{gel}) вычисляли по формуле

$$C_{gel} = \frac{m_{in} - m_{out}}{V_{Alg}}. \quad (4)$$

Средний диаметр сформировавшихся МС(М)-альгинатных микросфер (МС(М)-Alg) определяли по фотографиям, сделанным с помощью оптического микроскопа МСП-1 (ЛОМО). Для каждого эксперимента выборка микросфер составляла не менее 20 штук.

Все спектрофотометрические исследования проводили на приборе СФ-56 (ЛОМО).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления способности металлакранов индуцировать сшивку альгината натрия по ионному механизму была исследована возможность формирования альгинатных гидрогелевых микросфер в присутствии МС(М) методом экструзии (рис. 1). В этом случае гелеобразование альгината натрия протекает по внешнему механизму [39]. Сначала сшивается полимер, находящийся на периферии капли, с образованием внешней оболочки микросферы. Затем ионы сшивающего агента проникают внутрь альгинатной капли, формируя устойчивую гидрогелевую микросферу. Соответственно, при использовании в качестве сшивающих центров МС(М) процесс гелеобразования альгинатных микросфер должен проходить аналогично. На способность к сшиванию альгината натрия были исследованы три металлакрана, различающиеся природой центрального иона: МС(Ca), МС(Sr), МС(La). Количество металлакрана, вошедшего в гидрогель, определялось по разнице исходной (C_0) и конечной (C_{end}) концентрации МС(М) в гелеобразующем растворе. После завершения процесса гелеобразования получившийся гидрогель помещали в дистиллированную воду. При этом не участвующий в ионно-индуцированном сшивании МС(М) диффундирует в промывочный раствор. Количество последнего определяли по его концентрации в промывочном растворе (C_{wash}). Количество МС(М), связанного с молекулами альгината, вычисляли как разницу вошедшего в гидрогель и вымытого из него МС(М).

Значения максимумов оптической плотности D для металлакранов МС(Ca), МС(Sr) и МС(La) соответствуют длине волн $\lambda = 550, 555$ и 570 нм. На примере МС(Sr) приведены характерные изменения спектров поглощения проб гелеобразующего раствора в ходе желирования альгината (рис. 2а). Видно, что положение максимального значения оптической плотности не смещается, а само значение уменьшается, что свидетельствует о снижении содержания МС(М) в гелеобразующем растворе. При промывании полученных микросфер в дистиллированной воде значение D наоборот увеличивается, что свидетельствует

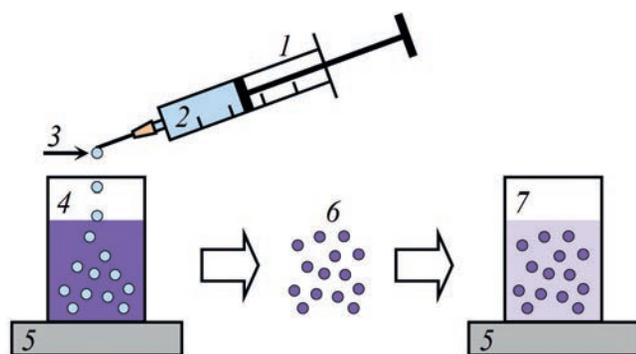


Рис. 1. Схема эксперимента: 1 – шприц, 2 – раствор альгината натрия, 3 – альгинатные микрокапли, 4 – емкость с гелеобразующим раствором МС(М), 5 – магнитная мешалка, 6 – гидрогелевые микросферы, 7 – емкость с промывочным раствором. Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

о росте концентрации МС(М) в промывочном растворе (рис. 2б).

Исследование процесса желирования альгинатных капель показало, что в течение первых 10–15 мин концентрация МС(Са) в гелеобразующем растворе уменьшается (рис. 3а, кривая 1), далее её изменения незначительны. При исходной концентрации МС(Са) в гелеобразующем растворе $C_0(\text{МС}(\text{Са})) = 50$ мг/мл содержание металакрауна уменьшается до постоянного значения $C_{\text{end}}(\text{МС}(\text{Са})) = 41.3$ мг/мл. При этом образуются не слипающиеся друг с другом гидрогелевые микросферы каплевидной формы со средним диаметром $d = 2.3$ мм (рис. 4а). При помещении готовых микросфер в дистиллированную воду

молекулы МС(Са), которые не участвуют ионно-индуцированном сшивании альгината, вымываются из гидрогеля в течение 20–30 мин (рис. 3б, кривая 1). После этого концентрация МС(Са) в промывочном растворе стабилизируется и составляет 1.7 мг/мл.

С уменьшением $C_0(\text{МС}(\text{Са}))$ с 50 до 25 мг/мл времена диффундирования МС(Са) внутрь микросфер в процессе их желирования и из них при промывании не меняются. Конечная концентрация оставшегося в растворе МС(Са) равна 20.7 мг/мл (рис. 2а, кривая 2), а концентрация МС(Са) в промывочном растворе – 1.2 мг/мл (рис. 2б, кривая 2). Средний диаметр формирующихся микросфер – 2.5 мм (рис. 4б).

При желировании альгинатных микросфер в гелеобразующем растворе с $C_0(\text{МС}(\text{Са})) = 12.5$ мг/мл содержание металакрауна также снижается и достигает значения 10.0 мг/мл (рис. 2а, кривая 3). Однако в этом случае альгинатные капли практически сразу же разрушаются при перемешивании, и образуются бесформенные гелевые сгустки (рис. 4в). По всей видимости, этой концентрации МС(Са) недостаточно для образования прочной стабильной гидрогелевой микросферы. Эксперименты по определению количества вышедшего МС(Са) показали, что концентрация МС(Са) в промывочном растворе сразу достигает максимального значения 9 мг/мл (рис. 3б, кривая 3).

Замена центрального иона в структуре металакрауна с Са(II) на Sr(II) не приводит к существенным изменениям в процессе образования гидрогелевых микросфер. Изменения концентраций МС(Sr) в гелеобразующих растворах

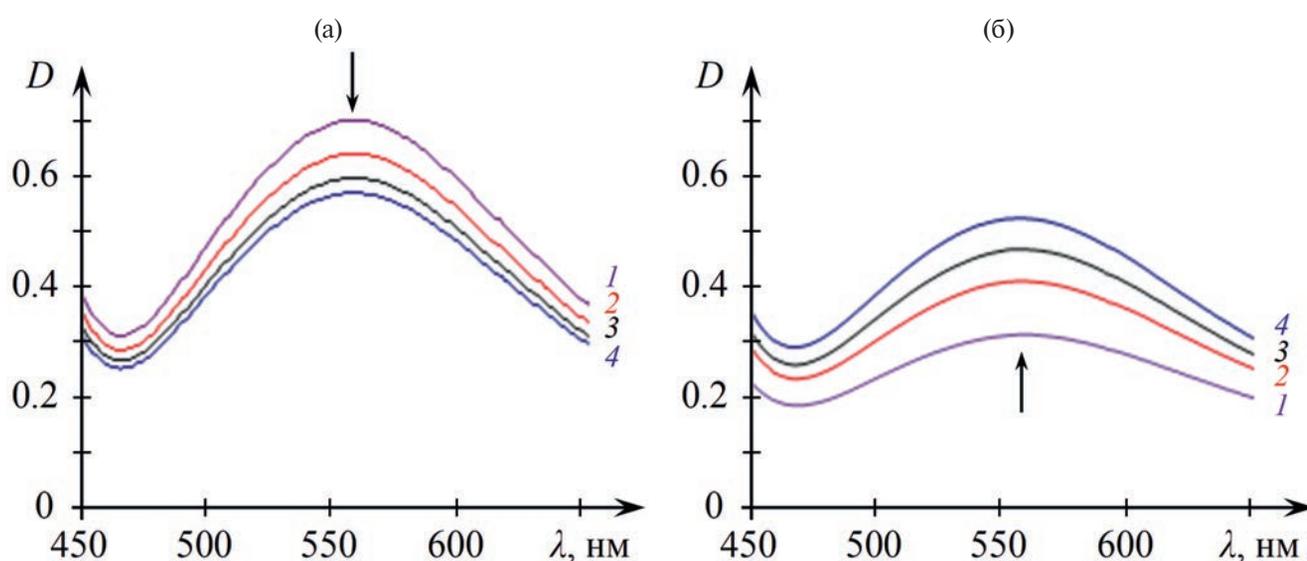


Рис. 2. Изменение спектров поглощения растворов МС(Sr) гелеобразующего (а) и промывочного (б) растворов. Время 0 (1), 0.5 (2), 6 (3) и 20 мин (4) (а); 0.5 (1), 2 (2), 6 (3) и 20 мин (4) (б).

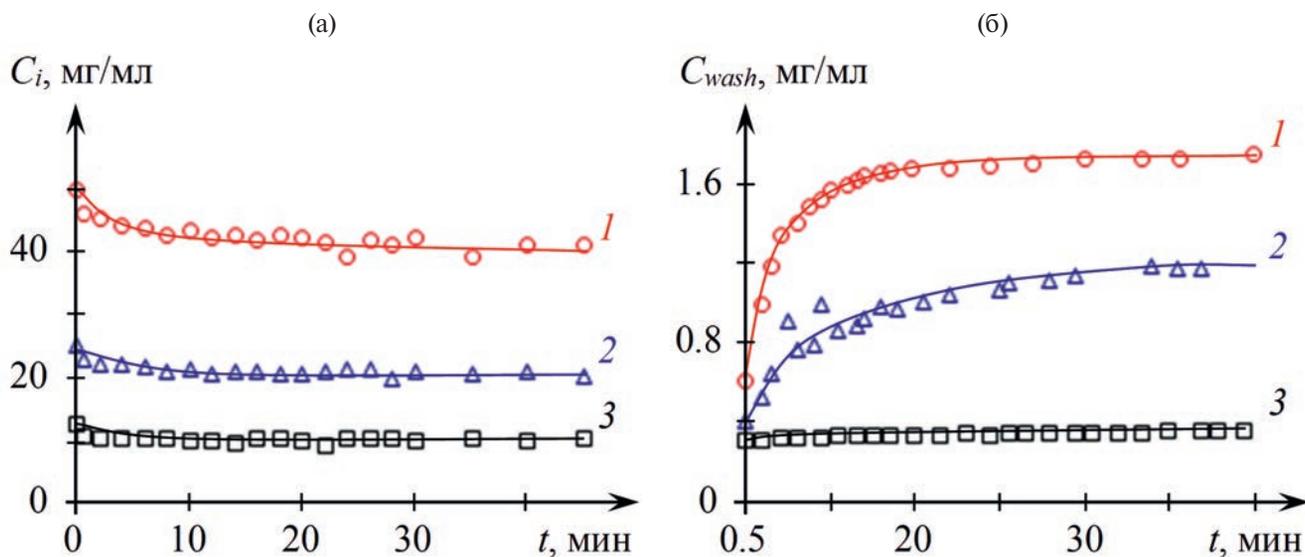


Рис. 3. Изменение концентраций МС(Са) в пробах гелеобразующего раствора (C_i) (а) и в промывочном растворе (C_{wash}) (б). Концентрация МС(Са) в исходных растворах 50 (1), 25 (2) и 12.5 мг/мл (3).

наблюдаются в течение первых 10–15 мин, а затем они не меняются (рис. 5а). При исходных концентрациях C_0 (МС(Sr)) 50 и 25 мг/мл получают стабильные микросферы со средним диаметром 2.3 и 2.6 мм, соответственно (рис. 6а и 6б). При этом концентрация МС(Sr) в гелеобразующих растворах уменьшается с 50 до 41.8 мг/мл и с 25 до 20.4 мг/мл. После промывания сшитых микросфер в промывочном растворе устанавливаются следующие концентрации МС(Sr): C_{wash} (МС(Sr)) = 1.0 мг/мл при сшивании альгината в растворе с C_0 (МС(Sr)) = 50 мг/мл и C_{wash} (МС(Sr)) = 0.8 мг/мл при C_0 (МС(Sr)) = 25 мг/мл (рис. 5б). С уменьшением концентрации МС(Sr) в гелеобразующем растворе до 12.5 мг/мл в ходе гелеобразования устанавливается концентрация C_{end} (МС(Sr)) = 9.7 мг/мл, при этом, как и в случае использования раствора МС(Са) низкой концентрации, образуются бесформенные гидрогелевые образования (сгустки) (рис. 5в). При помещении последних в промывочный раствор там устанавливается концентрация 10 мг/мл (рис. 5б, кривая 3).

При использовании МС(La) в качестве сшивающего агента наблюдаемые изменения концентрации МС(La) в гелеобразующем растворе имеет ту же тенденцию, как и в случаях с МС(Са) и МС(Sr). Уменьшение концентрации МС(La) происходит в течение первых 10–15 мин (рис. 7), дальнейшие изменения концентрации металлакрауна в растворе незначительны. При последовательном уменьшении исходной концентрации МС(La) в гелеобразующем растворе с 50 до 25 и 12.5 мг/мл конечное содержание металлакрауна составило 41.8, 17.0 и 5.8 мг/мл, соответственно.

По мере прикапывания альгината натрия в раствор МС(La) наблюдается формирование МС(M)-альгинатных микросфер, однако образующиеся гидрогелевые микросферы неустойчивые, при перемешивании раствора практически сразу же разрушаются для всех использованных концентраций МС(La). В результате образуются гидрогелевые сгустки (рис. 8). Проследить за динамикой вымывания металлакрауна из сшитого гидрогеля в случае использования МС(La) нет возможности, так как получающиеся гидрогелевые сгустки осаждаются на дно кюветы очень медленно и преграждают путь лучу анализирующего излучения спектрофотометра. В связи с этим была определена только конечная концентрация металлакрауна в промывочном растворе. Она составляла около 28–30 мг/мл для всех исходных концентраций МС(La).

Для наглядного сравнения сшивающей способности металлакраунов с различными центральными ионами металла (Са, Sr и La) экспериментальные результаты были сведены в табл. 1. Для каждого случая приведены следующие данные: исходная и конечная концентрации МС(M) в гелеобразующем растворе (C_0 и C_{end}), концентрация МС(M) в гидрогеле до и после промывания в дистиллированной воде (C_{in} и C_{gel}).

Сравнивая МС(Са) и МС(Sr) можно отметить, что при желировании концентрация металлакрауна, вошедшего в гидрогель, всегда близка конечной концентрацией МС(M) в гелеобразующих растворах и равновесной концентрации, которая должна устанавливаться при добавлении 2 мл раствора альгината натрия к 10 мл гелеобразующего раствора (т.е. при разбавлении в 1.2 раза). При

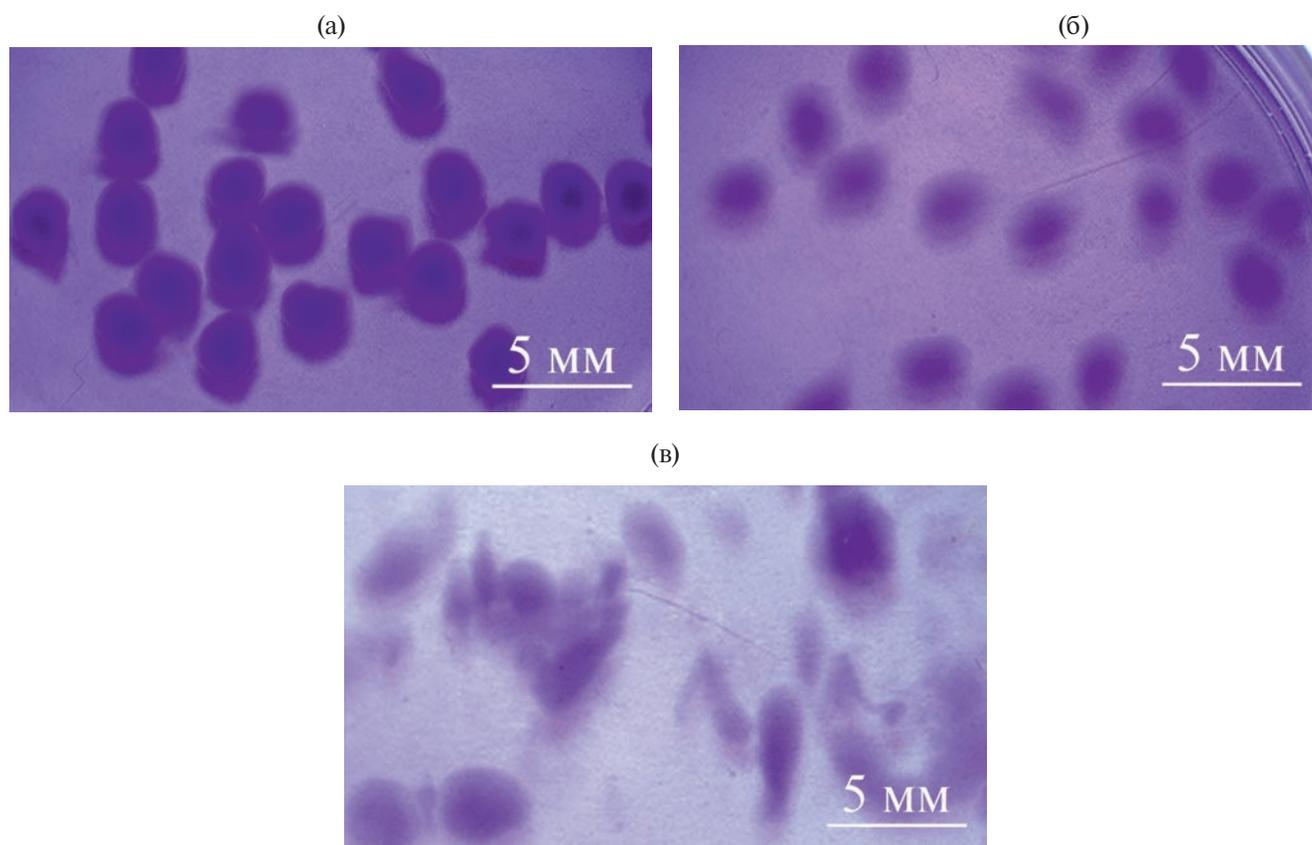


Рис. 4. Альгинатные микросферы, сшитые МС (Са) в гелеобразующих растворах концентрации 50 (а), 25 (б) и 12.5 мг/мл (в).

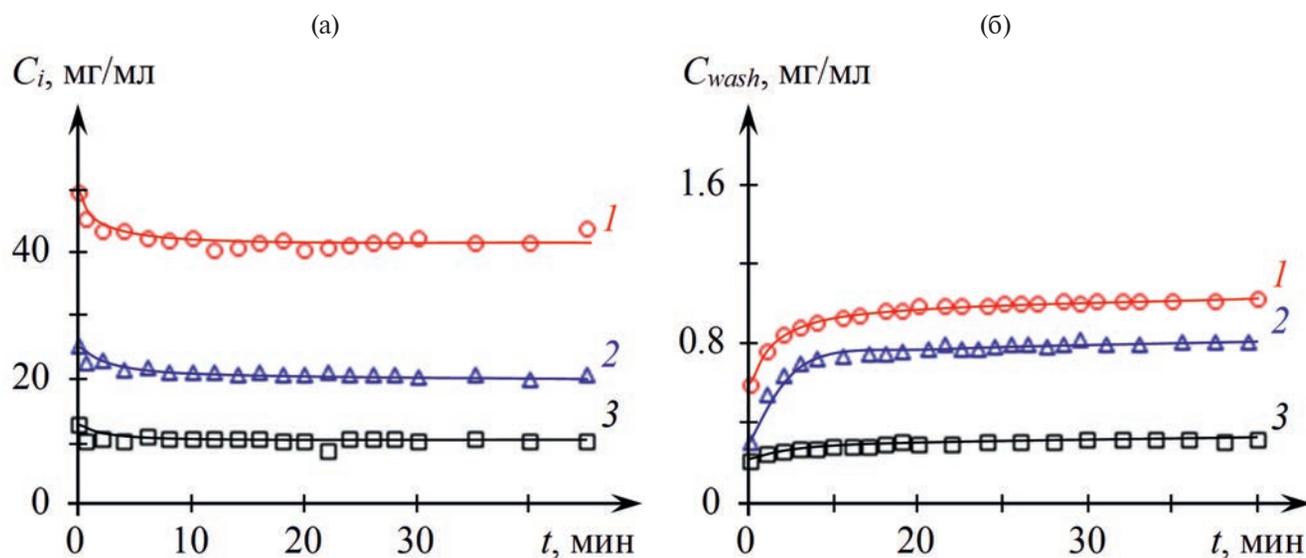


Рис. 5. Изменение концентраций МС(Sr) в пробах гелеобразующего раствора (C_i) (а) и в промывочном растворе (C_{wash}) (б). Концентрация МС(Sr) в исходных растворах 50 (1), 25 (2) и 12.5 мг/мл (3).

этом после промывки получающихся микросфер в дистиллированной воде в гидрогелях на основе МС(Sr) по сравнению с МС(Са) остается больше ионов металлакуна. Соответственно в этих гидрогелях образуется больше стабильных центров сшивки.

В случае использования в качестве гелеобразующего агента МС(La) при $C_0(\text{МС(La)}) = 50$ мг/мл в гидрогель входит столько же МС(La), что и других рассмотренных МС, т.е. устанавливается равновесная концентрация. При $C_0(\text{МС(La)}) = 25$ мг/мл концентрация МС(La), вошедшего

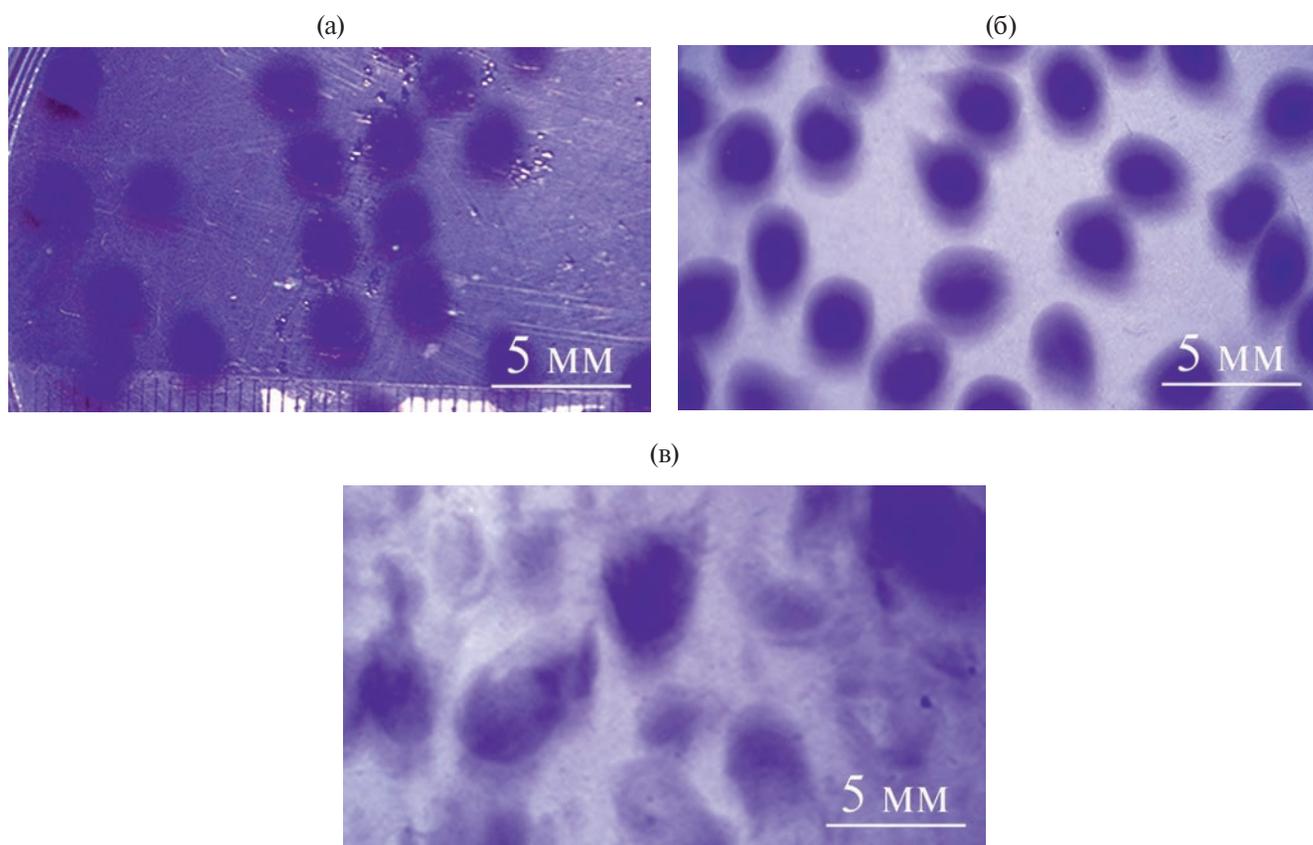


Рис. 6. Альгинатные микросферы, сшитые MC(Sr) в гелеобразующих растворах концентрации 50 (а), 25 (б) и 12.5 мг/мл (в).

в гидрогель (C_{in}), превосходит его конечную концентрацию в гелеобразующем растворе в 2 раза ($C_{in}(MC(La)) = 40$ мг/мл, $C_{end}(MC(La)) = 17.0$ мг/мл). А при $C_0(MC(La)) = 12.5$ мг/мл C_{in} больше C_{end} более чем в 5 раз. После промывки таких гидрогелей концентрация MC(La) в них превышает аналогичные величины для гидрогелей, полученных с использованием других металлакранов. Концентрация MC(La) участвующего в гелеобразовании составляет 28–30 мг/мл, причем она практически не зависит от исходной концентрации MC(La) в гелеобразующем растворе. Следовательно, из всех рассмотренных металлакранов MC(La) наиболее эффективно образует MC(M)-альгинатный комплекс, и образующийся при этом гидрогель имеет очень высокую плотность сшивки. Это подтверждает и экспериментально наблюдаемое разрушение микросфер при желировании альгинатных капель в растворе MC(La) (рис. 8). При попадании капель в гелеобразующий раствор, по-видимому, образуется плотная внешняя оболочка, которая замедляет дальнейшую диффузию молекул MC(La) внутрь альгинатной сферы и тем самым препятствует сшивке ядра. Это приводит к разрушению образующихся микросфер даже при их умеренном перемешивании в гелеобразующей среде. При

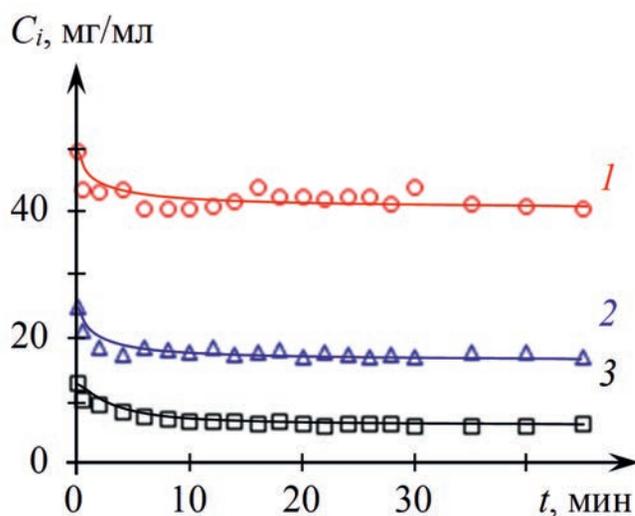


Рис. 7. Изменение концентраций MC(La) в пробах гелеобразующего раствора (C_i). Концентрация MC(La) в исходных растворах 50 (1), 25 (2) и 12.5 мг/мл (3).

механическом разрыве оболочки свободный альгинат натрия выходит из микросферы и, попадая в гелеобразующий раствор, сшивается с образованием гелевых сгустков (рис. 8).

Таблица 1. Концентрация МС(М) в гелеобразующих растворах и гидрогелях

МС	Исходная концентрация МС(М) в гелеобразующем растворе C_0 , мг/мл	Конечная концентрация МС(М) в гелеобразующем растворе C_{end} , мг/мл	Концентрация МС(М), вошедшего в гидрогель C_{in} , мг/мл	Концентрация МС(М), участвующего в гелеобразовании C_{gel} , мг/мл
МС(Ca)	50.0	41.3	44	26
	25.0	20.7	21	10
	12.5	10.0	13	9
МС(Sr)	50.0	41.8	41	30
	25.0	20.4	23	15
	12.5	9.7	14	10
МС(La)	50.0	41.8	41	28
	25.0	17.0	40	30
	12.5	5.8	33	29

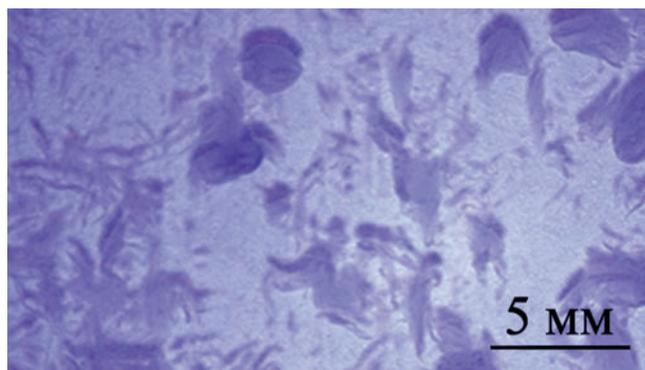


Рис. 8. Альгинатные микросферы, сшитые МС(La) в гелеобразующем растворе концентрации 50 мг/мл.

Таким образом, все три рассмотренных металлакрана способны индуцировать сшивку альгината натрия по ионному механизму и могут использоваться в качестве сшивающих агентов. При помещении альгинатных капель в водные растворы МС(Ca) и МС(Sr) образуются гидрогелевые микросферы, причем МС(Sr) обладает несколько большей сшивающей способностью по сравнению с МС(Ca). При применении МС(La) эффективность сшивки настолько велика, что для получения стабильных гидрогелевых микросфер необходим более тщательный подбор условий их формирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые продемонстрирована возможность ион-индуцированного сшивания молекул альгината натрия водорастворимыми гетероядерными

металламикроциклическими комплексами Sr(II)–Cu(II), Ca(II)–Cu(II), La(III)–Cu(II). Методом экструзии синтезированы гидрогелевые альгинатные микросферы с применением металлакранов в качестве сшивающих агентов. Экспериментально установлено, что по своим способностям к ион-индуцированному сшиванию альгината натрия рассматриваемые металлакраны располагаются в следующий ряд МС(La) > МС(Sr) > МС(Ca). Получено, что при использовании из гелеобразующих растворов на основе МС(Ca) и МС(Sr) формируются гидрогелевые микросферы размером 2.3–2.6 мм, которые устойчивы к внешнему механическому воздействию. При сшивании альгинатных капель в растворе на основе МС(La) образуется плотная внешняя оболочка, которая лимитирует дальнейшую диффузию молекул МС(La) внутри формирующейся гелевой микросферы. Альгинат натрия, находящийся внутри микросферы, остается свободным, т.е. формируется неустойчивая к механическим воздействиям микросфера. В этом случае для получения стабильных гидрогелевых микросфер, вероятно, нужно уменьшать их размер или подбирать более деликатные условия формирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 23-13-00139) (<https://rscf.ru/project/23-13-00139/>).

Исследования проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования “Аналитический центр Института металлоорганической химии Российской академии наук”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pavlyuchenko V.N., Ivanchev S.S.* // Polymer Science A. 2009. V. 51. №7. P.743.
2. *Li Y., Rodrigues J., Tomas H.* // Chem. Soc. Rev. 2012. №41. P. 2193.
3. *Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thom D.* // Federation Eur. Biochem. Soc. (FEBS) Lett. 1973. V.32 №1. P. 195.
4. *Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C., Alhaique F.* // J. Control Release. 2007. V.119. №1. P. 5.
5. *Kuen Yong Lee, Mooney D.J.* // Prog. Polym. Sci. 2012. V. 37. № 1. P. 106.
6. *Giri T. K.* // Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting / Ed. by A.M. Holban, A.M. Grumezescu. Oxford: Elsevier, 2016. P. 565.
7. *Gorshkova M.Yu., Volkova I.F., Grigoryan E.S., Valuev L.I.* // Polymer Science B. 2020. V. 62. № 6. P.678.
8. Chitosan Based Biomaterials. Tissue Engineering and Therapeutics. / Ed. by J. Amber. Jennings, Joel. D. Bumgardner. Duxford: Woodhead Publ., 2017. V.2.
9. *Бикбов М.М., Хуснитдинов И.И., Сигаева Н.Н., Вильданова Р.Р.* // Практич. медицина. 2017. Т.110. № 9. С.131.
10. *Dang J.M., Leong K.W.* // Adv. Drug. Deliver Rev. 2006. V.58. № 4. P. 487.
11. *Benalaya I., Alves G., Lopes J., Silva L.R.* // Int. J. Mol. Sci. 2024. V.25. № 2. P. 31.
12. *Cao Y., Mezzenga R.* // Nat. Food. 2020. V. 1. № 2. P. 106
13. *Mitura S., Sionkowska A., Jaiswal A* // J Mater Sci., Mater Med. 2020. V.31. Art.50.
14. *Kakita H., Kamishima H.* // J. Appl. Phycol. 2009. V.20. № 5. P. 93.
15. Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes / Ed. by A.Steinbüchel. Weinheim: Wiley, 2002.
16. Alginates: Biology and Applications. Microbiology Monographs. / Ed. by Bernd H. A Rehm. New York: Springer, 2009. V. 13
17. Carbohydrate Biotechnology Protocols / Ed. by C. Bucke. Totowa: Humana Press, 1999.
18. *Cattelan G., Gerbolés A. Guerrero, Foresti R., Pramstaller P.P., Rossini A., Miragoli M., Malvezzi C. Caffarra* // Frontiers Bioeng. Biotechnol. 2020. V.8. P.1.
19. *Cao L., Lu W., Mata A., Nishinari K., Fang Y.* // Carbohydr. Polym. 2020. V.242. P.116389.
20. *Donati I., Holtan S., Mørch Y.A., Borgogna M., Dentini M., Skjåk-Bræk G.* // Biomacromolecules. 2005. V.6. P. 1031.
21. *Len'shina N.A., Konev A.N., Baten'kin A.A., Bardina P.S., Cherkasova E.I., Kashina A.V., Zagainova E.V., Zagainov V.E., Chesnokov S.A.* // Polymer Science B. 2021. V. 63. № 6. P.640.
22. *Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ.* // Biomaterials. 1999. V.20. № 1. P. 45.
23. *Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ.* // J. Dent. Res. 2001. V.80. № 11. P.2025.
24. *Grigor'ev D., Musabekov K.V., Musabekov N.K., Kusainova Zh.Zh.* // Polymer Science. A. 2017. V. 59. № 4. P.506.
25. *Шилова С.В., Миргалеев Г.М., Барабанов В.П.* // Polymer Science A. 2022. Т. 64. № 5.
26. *Harper B.A., Barbut S., Lim L.-T., Marcone M.F.* // J. Food Sci. 2014. V. 79. № 4. P. E562.
27. *Urbanova M., Pavelkova M., Czernek J., Kubova K., Vyslouzil J., Pechova A., Molinkova D., Vyslouzil J., Vetchy D., Brus J.* // Biomacromolecules. 2019. V. 20. № 11. P. 4158.
28. *Athas J.C., Nguyen C.P., Kummarbc S., Raghavan S.R.* // Soft Matter. 2018. 14. P. 2735.
29. *Hu Chuhuan, Lu Wei, Mata Analucia, Nishinari Katsuyoshi, Fang Yapeng* // Int. J. Biol. Macromolecules. 2021.177. P. 578.
30. *Xiaoyan He, Leila Abdoli, Hua Li* // Colloids Surf. B. 2018. V.162. P. 220.
31. *Mørch YÄ RR A., Donati Ivan, Strand Berit L., and Skjåk-Bræk Gudmund* // Biomacromolecules. 2006. V.7. P. 1471.
32. *Donati Ivan, Asaro Fioretta, and Paoletti Sergio* // J. Phys. Chem. B. 2009. V.113. P. 12877.
33. *Dodero A., Pianella L., Vicini S., Alloisio M., Ottonelli M., Castellano M.* // Eur. Polym. J. 2019. V. 118. P. 586.
34. *Gotoh Yasuo, Makita Junya, Ohkoshi Yutaka, Nagura Masanobu* // Polym. J. 2000. V. 32. 10. P. 838.
35. *Liu Fengyi, Carlos Luis D., Ferreira Rute A. S., Joaõ Rocha, Gaudino Maria Concetta, Robitzer Mike, Quignard Franc,oise* // Biomacromolecules. 2008.V. 9. P.1945.
36. *Qianmin Ma, Qianming Wang* // Carbohydr. Polymers. 2015.V.133. P. 19.
37. *Mezei G., Zaleski C.M., Pecoraro V.L.* // Chem. Rev. 2007. V.107. P. 4933.
38. *Tegoni M., Remelli M.* // Coord. Chem. Rev. 2012. P. 256.
39. *Ostrowska M., Fritsky I.O., Gumienna-Konteccka E., Pavlishchuk A.V.* // Coord. Chem. Rev. 2016. P. 327.

40. Pavlyukh Y., Rentschler E., Elmers H.J., Hubner W., Lefkidis G. // *Phys. Rev. B*. 2018. V.97. P.214408.
41. *Katkova M.A.* // *Russ. J. Coord. Chem.* 2018. V.44. P. 284.
42. *Muravyeva M. S., Zabrodina G. S., Samsonov M. A., Kluev E. A., Khrapichev A. A., Katkova M. A., Mukhina I. V.* // *Polyhedron*. 2016. V.114. P.165.
43. *Katkova M. A., Zabrodina G. S., Baranov E. V., Muravyeva M. S., Kluev E. A., Shavyrin A. S., Zhigulin G. Y., Ketkov S. Y.* // *Appl. Organomet. Chem.* 2018. V.32. № e4389.
44. *Katkova M.A., Zabrodina G.S., Zhigulin G.Yu., Baranov E.V., Trigub M., Terentiev A., Ketkov S.Yu.* // *Dalton Transactions*. 2019. V.10. P.1039.
45. *Katkova M.A., Zabrodina G.S., Rumyantsev R.V., Zhigulin G.Yu., Muravyeva M.S., Shavyrin A.S., Sheven D.G. Ketkov S.Yu.* // *Inorg. Chem.* 2023. V.62. P.3827.
46. *Rumyantsev R.V., Zhigulin G.Yu., Zabrodina G.S., Katkova M.A., Ketkov S.Yu., Fukin G.K.* // *Mendeleev Commun.* 2023. V.33. P.41.

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КИНЕТИКА НАБУХАНИЯ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЕКТИНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА

© 2024 г. В. А. Киселев, Р. Х. Мударисова*, Л. А. Бадькова, С. В. Колесов, В. З. Мингалеев

Уфимский институт химии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
450054 Уфа, пр. Октября, 71, Россия

*e-mail:mударисова@anrb.ru

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 03.06.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Изучено взаимодействие макромолекул пектина и арабиногалактана в водном растворе. Показано образование полимерных комплексов за счет водородных связей между макромолекулами. Сшивание полимерного комплекса с помощью ионов Ca^{2+} приводит к образованию гидрогелей, свойства которых в значительной степени определяются содержанием арабиногалактана. При низких концентрациях ионов Ca^{2+} (от 0.05 до 0.15 мас. %) введение арабиногалактана способствует повышению модуля сдвига, росту концентрации сшивков и приводит к уменьшению размеров полимерной сети по сравнению с гидрогелями на основе нативного пектина. С увеличением содержания арабиногалактана повышается вклад диффузии Фика в набухание полученных гидрогелей¹.

DOI: 10.31857/S2308112024030032, EDN: LWXESU

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых гидрогелей для направленного локального применения и пролонгированного высвобождения лекарственных препаратов является актуальной задачей для современной медицины. Гидрогели на основе полисахаридов обладают высокой водопоглощающей способностью, отсутствием токсичности, высокой физиологической активностью и биodeградируемостью [1–3]. В ряду полисахаридов можно выделить пектин, который является анионным полиэлектролитом и обладает хорошими гелеобразующими свойствами. Гидрогели, приготовленные из концентрированных растворов пектина, являются неограниченно набухающими и поэтому не могут использоваться как препаративные формы [4, 5].

В общем случае успешность применения гидрогелей для биомедицинских приложений во многом зависит от их сорбционных (способности к набуханию) и реологических свойств. Для получения гидрогелей, сочетающих высокую способность к набуханию с устойчивыми реологическими характеристиками, применяются различные методы химического сшивания [6, 7]. В частности, для пектина широко используются ионы двухвалентных щелочноземельных

металлов [8–11], которые сшивают полимерные цепи пектина с образованием пористых трехмерных надмолекулярных структур.

Одним из способов регулирования пористой структуры гидрогелей пектина может быть его частичная замена другим полисахаридом, который не образует гидрогелей с ионами Ca^{2+} [12–14]. Такие смешанные гидрогели интересны сочетанием двух форм структурирования: химической (за счет образования комплексов между карбоксилат-анионами и катионами Ca^{2+}) и физической (за счет межмолекулярных взаимодействий). В качестве второго полисахарида для получения смешанных гидрогелей на основе пектина нами был выбран арабиногалактан листовницы сибирской), который отличается высокой разветвленностью и неспособностью образовывать гели под действием ионов двухвалентных металлов. Главная цепь арабиногалактана состоит из 1→3 связанных β-D-галактопиранозных остатков, большинство из которых несет боковые ответвления при C-6. Боковые цепи содержат 3,6-ди-О- и 6-О-замещенные остатки β-D-галактопиранозы и 3-О-замещенные остатки β-L-арабинофуранозы, а концевыми невозстановливающими остатками являются β-D-галактопираноза, β-D-арабинофураноза и β-L-арабинопираноза. Арабиногалактан

¹ Дополнительные материалы доступны по DOI статьи: 10.31857/S2308112024030032

Таблица 1. Физико-химические характеристики полисахаридов

Полисахарид	$C_{\text{эксп.}}$, %	$H_{\text{эксп.}}$, %	Влажность, %	Свободные СООН-группы, %	$a_{D, 20}^{20}$, (град·см ³)/(дм г)	I_{max} , нм Н ₂ О	$M \times 10^{-3}$
Пектин	40.25	5.49	2.30	7.70	+180 ± 2	210	26
Арабиногалактан	42.00	6.72	4.0	4.5	+16 ± 1	210, 290	40

обладает разнообразной биологической активностью, характеризуется хорошей биосовместимостью и может солиubilизировать широкий спектр биологически активных соединений [15–17].

Целью настоящего исследования – изучение реологических свойств и кинетики набухания гидрогелей на основе полимерных комплексов пектина и арабиногалактана, трехмерно сшитых ионами Ca^{2+} .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования

В экспериментах использовали яблочный пектин товарной марки Unipectine XPP 240 с молекулярной массой 2.6×10^3 [18], степенью метоксилирования 66%, арабиногалактан листовницы сибирской (Закрытое акционерное общество “Аметис”, Амурская обл., г. Благовещенск, ТУ 9325-008-70692 152–08; молекулярная масса 40×10^3). Методика определения молекулярной массы арабиногалактана приведена в Дополнительных материалах.

Степень метоксилирования, влажность и содержание свободных карбоксильных групп пектина определяли по методике [19]. Подробно это описано в Дополнительных материалах. Элементный анализ полисахаридов проводили на анализаторе марки ЕУКОЕА-3000 (табл. 1).

Синтез гидрогелей

Гидрогели пектин + хлористый кальций и арабиногалактан + пектин + хлористый кальций готовили путем смешения полимерных растворов различного состава в заданных объемных соотношениях (25 : 75, 50 : 50, 75 : 25 об.%). Суммарная концентрация по полисахаридам оставалась постоянной (2 мас. %). Для получения гидрогелей в приготовленные полимерные растворы вводили водный раствор хлорида кальция заданной концентрации в интервале 0.05–0.5 мас.%.

Спектроскопические исследования

ИК-спектры записывали на спектрофотометре “Shimadzu IR-Prestige-21” (700–3600 cm^{-1} ,

вазелиновое масло). Величину удельного вращения измеряли на поляриметре “Perkin-Elmer” (модель 141). Размер надмолекулярных частиц образцов определяли методом лазерного рассеяния на приборе “Sald 7101” (“Shimadzu”). Длина волны полупроводников оголазера 375 нм. Рабочий диапазон измерения диаметров частиц 10 нм–300 мкм. УФ-спектры водных растворов снимали в кварцевых кюветках на спектрофотометре “Shimadzu UV-VIS-NIR 3100” при толщине поглощающего слоя 1 см в области 200–350 нм. (Спектрофотометрические данные представлены в Дополнительных материалах).

Термический анализ образцов

Для изучения термического разложения образцов измерения проводили на приборе синхронного термического анализа ТГА-ДСК (“Mettler Toledo”) в среде воздуха при скорости нагревания 5 град/мин, в интервале температур 298–573 К. Для измерений использовали образцы соединений массой 5–8 мг, применяли тигли из оксида алюминия объемом 70 мкл.

Реологические исследования

Частотные зависимости модуля упругости и модуля потерь определяли на реометре MCR-101 (“Anton Paar”, Австрия). Использовали систему типа плоскость–плоскость с диаметром плоскостей 35 мм и зазором 1 мм. Температура исследования 25 °С.

Расчет молекулярных параметров полимерной сети гидрогелей

Молекулярные параметры полимерной сети гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} определяли с использованием модуля сдвига G . Модуль сдвига рассчитывали по данным реологических экспериментов с помощью обобщенной модели Максвелла [20–22]. Более подробное описание этой модели и основные уравнения для расчетов представлены в Дополнительных материалах.

Капиллярная вискозиметрия

Характеристическую вязкость растворов полисахаридов измеряли при 30 ± 0.2 °С в вискозиметре

Уббелде с висязим уровнем с диаметром капилляра 0.56 мм [23]. Для определения характеристической вязкости как индивидуальных полисахаридов, так и их смесей использовали водные растворы с концентрацией 0.3 мас.% в растворе 0.3 М NaCl. Все растворы и растворитель фильтровали через фильтр Шотта (ПОР 16). Чтобы найти характеристическую вязкость, измерения проводили для семи различных концентраций полимера, полученных непосредственным разбавлением исходного раствора в вискозиметре. Перед измерением образцы термостатировали в течение 15 мин, температуру в ячейке поддерживали с точностью ± 0.2 °С. Значения характеристической вязкости рассчитывали методом двойной экстраполяции зависимостей $\eta_{\text{уд}}/C$ и $\ln \eta_{\text{отн}}/C$ к нулевой концентрации.

Изучение набухания гелей

Гидрогели высушивали до постоянной массы. Затем навеску высушенного гидрогеля (ксерогеля) погружали в растворитель. После истечения заданного времени набухший гидрогель извлекали из растворителя и взвешивали, удалив предварительно капли воды с поверхности гидрогеля. В качестве растворителей использовали дистиллированную воду и буферные растворы: ацетатный с рН 4, фосфатный с рН 6 и карбонатно-бикарбонатный с рН 9. Кислотность растворов контролировали на рН-метре "АНИОН 4100".

Экспериментальную величину набухания S рассчитывали, как относительное увеличение содержания воды в гидрогеле:

$$S\%(t) = S(t)100 = \frac{m(t) - m_0}{m_0} 100, \quad (1)$$

где m_0 – масса ксерогеля, г; $m(t)$ – масса набухшего гидрогеля в момент времени t , г; $S(t)$ – коэффициент набухания, г воды/г ксерогеля (г/г).

Набухание полимеров, в том числе гидрогелей, как правило, отклоняется от законов диффузии Фика [24]. Если набухание происходит только за счет фиковской диффузии, то это формально соответствует кинетике реакции первого порядка и для равновесного (ограниченного) набухания описывается уравнением [25]

$$S(t) = S_e \left(1 - e^{-k_D \sqrt{t}}\right), \quad (2)$$

в котором S_e – равновесное набухание, k_D – эффективная константа набухания по уравнению первого порядка. Причины нефиковского транспорта воды в полимерную сетку гидрогеля связаны с низкой подвижностью сегментов полимерной

цепи между сшивками вследствие их нековалентного взаимодействия с соседними цепями. В этих условиях набухание будет лимитироваться процессами релаксации, т.е. повышением подвижности сегментов полимерных цепей в результате разрушения нековалентных связей под действием молекул воды [26]. Релаксация будет способствовать фиковскому транспорту молекул воды в сформированный свободный объем между полимерными цепями. Нефиковская диффузия (Case II аномальная диффузия [24]) формально соответствует кинетике реакции второго порядка

$$S(t) = S_e^2 \frac{K_R t}{1 + S_e K_R t}, \quad (3)$$

(k_R – эффективная константа релаксации).

Экспериментальные кривые набухания полученных гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} анализировали в соответствии с линейными формами уравнений (2) и (3), которые описываются следующими выражениями;

$$\ln \frac{S_e}{S_e - S(t)} = k_D \sqrt{t}, \quad (4)$$

$$\frac{t}{S(t)} = \frac{1}{S_e} t + \frac{1}{S_e^2 k_R}. \quad (5)$$

Как видно из этих уравнений, фиковская диффузия соответствует прямолинейной зависимости

$\ln \frac{S_e}{S_e - S(t)}$ от \sqrt{t} , а нефиковская диффузия, контролируемая релаксацией (Case II, аномальная диффузия) – прямолинейной зависимости $\frac{t}{S(t)}$ от t .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование взаимодействия между пектином и арабиногалактаном

ИК-спектр смеси пектина и арабиногалактана (рис. 1 кривая 1) имеет полосы поглощения, характерные для обоих компонентов (рис. 1, кривые 2 и 3). Из сравнения спектров нативных полисахаридов и их смеси (рис. 1, кривая 1) полоса поглощения $\nu(\text{C}=\text{O})$ пектина (1736 см^{-1}) при его взаимодействии с арабиногалактаном смещается в высокочастотную область на 6 см^{-1} до 1742 см^{-1} . Кроме того, в области $3200\text{--}3600 \text{ см}^{-1}$ наблюдается смещение полосы поглощения $\nu(\text{OH})$ арабиногалактана и пектина в сторону больших волновых чисел. Таким образом, наличие протоноакцепторных ($\text{C}=\text{O}$) и протонодонорных (OH) функциональных групп в цепях пектина и арабиногалактана обуславливает

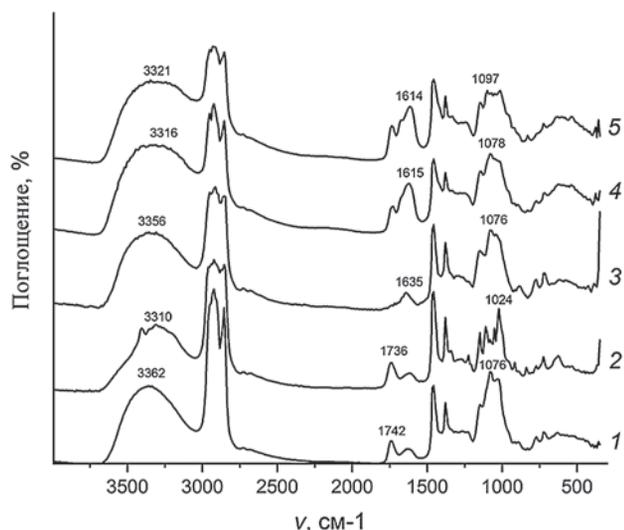


Рис. 1. ИК-спектры индивидуальных веществ и гидрогелей на их основе: 1 – пектин–арабиногалактан, 2 – пектин, 3 – арабиногалактан, 4 – пектин– Ca^{2+} , 5 – пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} .

образование как межмолекулярных, так и внутримолекулярных водородных связей в смеси пектин–арабиногалактан.

Межмолекулярное взаимодействие пектина и арабиногалактана в растворе подтверждается формированием частиц и изменением характеристической вязкости растворов. Арабиногалактан не образует ассоциатов и частиц в растворе. В растворах пектина и в растворах его смесей с арабиногалактаном присутствуют наноразмерные надмолекулярные частицы (рис. 2). Модальный размер частиц нативного пектина в водном растворе составляет 200 нм при сравнительно узком распределении частиц. Добавление арабиногалактана в раствор пектина и повышение его содержания в полимерной смеси приводит к изменению размерных характеристик частиц в данных системах. В растворе смеси пектин–арабиногалактан состава 75 : 25 об.% присутствуют частицы с модальным размером 224 нм, а в смеси состава 25 : 75 об.% – частицы с модальным размером 282 нм. При этом с увеличением содержания арабиногалактана в смеси происходит расширение распределения частиц по размерам и повышение содержания частиц с размерами от 300 до 1100 нм, что, по нашему мнению, свидетельствует об образовании интерполимерных комплексов.

Обнаружено, что с увеличением концентрации арабиногалактана в полимерной смеси происходит монотонное падение значений характеристической вязкости от 1.4 дл/г для нативного пектина и до 0.5 дл/г для смеси пектин–арабиногалактан состава 25 : 75 об.%. Снижение характеристической вязкости растворов полимеров

свидетельствует об уменьшении размеров полимерных клубков. Формирующиеся компактные клубки образуют более крупные частицы полимерных комплексов пектин–арабиногалактан, наличие которых подтверждается методом лазерного рассеяния (рис. 2).

Полимерная смесь пектин–арабиногалактан характеризуется заметно более высокой термической стабильностью при высоких температурах по сравнению с исходными пектином и арабиногалактаном (рис. 3). Видно, что температуры начала снижения массы как для исходных полисахаридов, так и для их смеси близки и находятся в интервале 27–37 °С. Количество низкомолекулярных продуктов, удаляемых из смеси пектин–арабиногалактан в интервале температур от 27 до 45 °С, составляет 3.5%, т.е. сопоставимо со значением, полученным для индивидуальных полисахаридов. Более заметное снижение массы наблюдается на второй стадии, а общее снижение массы продуктов, соответствующее температуре 300 °С, для смеси пектин–арабиногалактан на 39.2–46.6% меньше по сравнению с исходными полимерами. Вероятно, на начальной стадии термического разложения происходит отщепление боковых коротких цепочек в арабиногалактане, которое мало отражается на общей потере массы комплекса пектин–арабиногалактан. При более высоких температурах происходит деградация полимерных цепей с образованием низкомолекулярных продуктов со значительной потерей массы. В целом это воспринимается как более высокая термоустойчивость комплексов пектин–арабиногалактан.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о взаимодействии пектина и арабиногалактана, которое приводит к образованию полимерных комплексов. Формирование таких комплексов может оказать заметное влияние на свойства гидрогелей на основе пектина, сшитого ионами Ca^{2+} .

Изучение физико-химических характеристик гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+}

При образовании геля ионы Ca^{2+} связывают карбоксильные группы макромолекул пектина и пектин–арабиногалактан, что демонстрируют ИК-спектры систем пектин– Ca^{2+} и пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} в которых появляются полосы поглощения карбокси-анионов (1615, 1614 cm^{-1}) (рис. 1, кривые 4 и 5). Кроме того, в области 3000–3400 cm^{-1} наблюдается высокочастотный сдвиг полос поглощения $\text{p}(\text{-OH})$ для пектин– Ca^{2+} на 6, а для пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} на 41 cm^{-1} , что указывает на разрыв или ослабление водородных связей в результате координации катионов Ca^{2+} к гидроксильным группам

пектина и/или пектин–арабиногалактан. Следует отметить значительное изменение формы полосы поглощения $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ в области $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$, что свидетельствует о вовлечении эфирных связей пиранозных и фуранозных колец пектина и пектин–арабиногалактан во взаимодействие с ионами Ca^{2+} при гелеобразовании.

По данным ТГА (рис. 3) видно, что гидрогель пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} обладает термической стабильностью на уровне гидрогеля пектин– Ca^{2+} . С повышением температуры способность гидрогеля пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} удерживать воду снижается аналогично гидрогелю пектин– Ca^{2+} , причем примерно до 200 °C масса гидрогелей изменяется незначительно (на $14\text{--}16\%$). Из рис. 3 также следует, что термическая стабильность пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} находится примерно на уровне с пектин–арабиногалактан. Поэтому можно предположить, что в геле пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} макромолекулы пектина прочно связаны не только с ионами Ca^{2+} , но и с макромолекулами арабиногалактана.

Реологические характеристики гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+}

На рис. 4 представлены частотные зависимости модуля накоплений G' и модуля потерь G'' для гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} , а также для соответствующего однокомпонентного гидрогеля при тех же концентрациях компонентов.

Для всех образцов упругий отклик преобладает над вязким ($G' > G''$) во всей исследованной области частот, что типично для гелей. С увеличением содержания арабиногалактана в гидрогеле пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} значения модуля накоплений снижаются. Параметры, определенные в уравнениях (6с) и (7с) и необходимые для расчета модуля сдвига уравнение (8с), представлены в Дополнительных материалах.

В табл. 2 показаны результаты расчета модулей сдвига, концентрации сшивок и среднего размера ячеек. Видно, что с увеличением содержания арабиногалактана при прочих равных условиях наблюдается снижение модуля сдвига. Причем более заметное снижение отмечается при содержании арабиногалактана более $25\text{ об.}\%$. Гидрогели, приготовленные в присутствии арабиногалактана с его содержанием более $25\text{ об.}\%$, характеризуются значительно меньшим количеством сшивок и большим размером ячеек. Уменьшение количества сшивок и формирование полимерной сети с большим размером ячеек при повышении содержания арабиногалактана может быть объяснено уменьшением вклада пектиновой части гидрогелей, которая сшита ионами Ca^{2+} , когда их содержание достаточно велико. Однако,

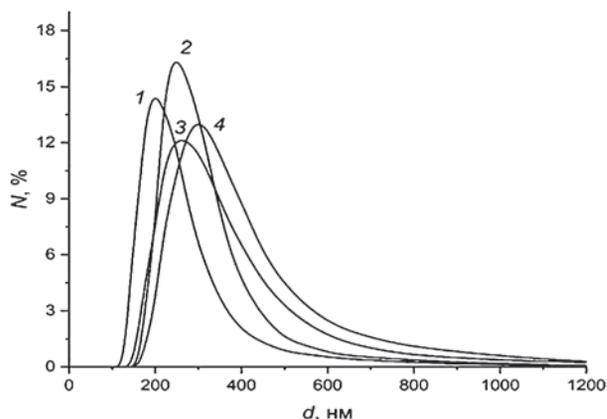


Рис. 2. Распределение частиц по размерам для индивидуального пектина (1) и полимерной смеси пектина с арабиногалактаном с соотношением компонентов $75 : 25$ (2), $50 : 50$ (3) и $25 : 75\text{ об.}\%$ (4). d – диаметр частиц (нм), N – количество частиц (%).

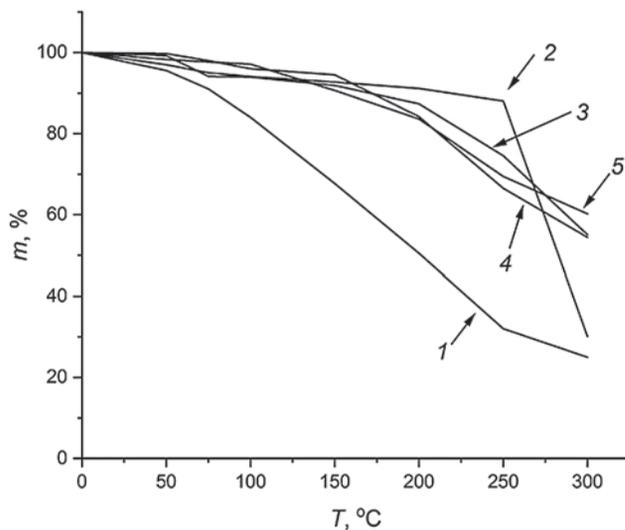


Рис. 3. Кривые ТГА индивидуальных полисахаридов пектина (1), арабиногалактана (2), пектин–арабиногалактан (3) и высушенных гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} (4), пектин– Ca^{2+} (5).

как видно из табл. 2, при содержании ионов Ca^{2+} ниже $0.05\text{ мас.}\%$ в присутствии $50\text{ об.}\%$. Гидрогели арабиногалактана характеризуются большим значением модуля сдвига, большей концентрацией сшивок и меньшим размером ячеек полимерной сети.

Так, при $[\text{Ca}^{2+}] = 0.1\text{ мас.}\%$ и $[\text{арабиногалактан}] = 0\%$ значение G составляет 0.50 кПа , а при $[\text{арабиногалактан}] = 50\text{ об.}\%$ в составе геля $G = 3.97\text{ кПа}$ (табл. 2). Данные табл. 2 согласуются с результатами исследования взаимодействия пектина и арабиногалактана в растворе без ионов Ca^{2+} . В гидрогелях, приготовленных при низком

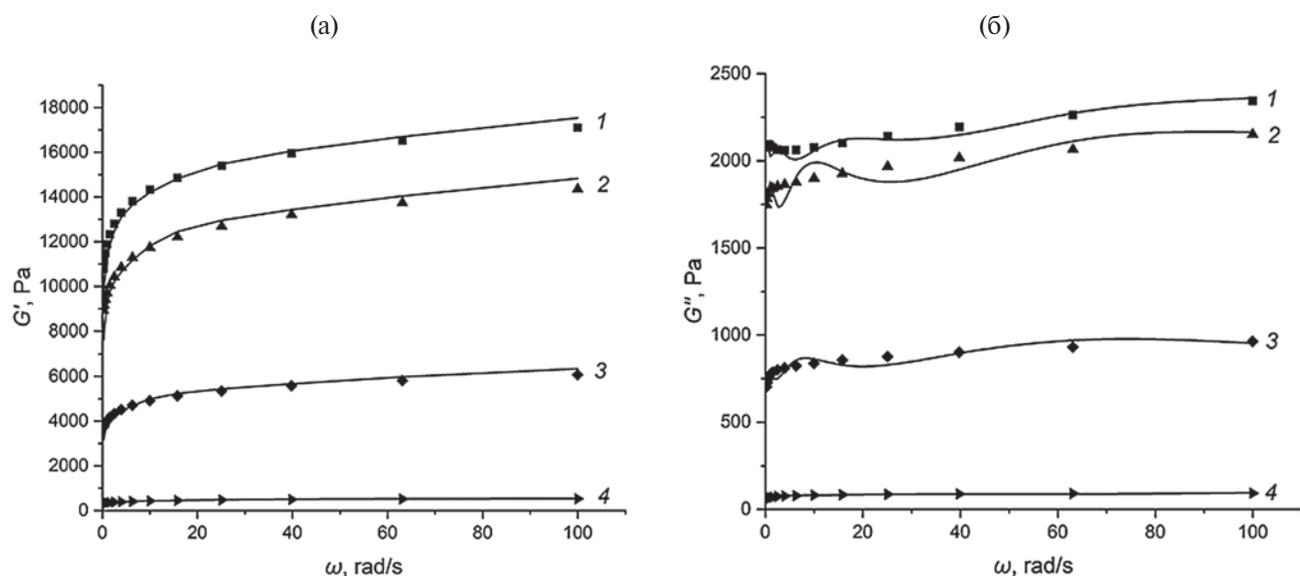


Рис. 4. Частотные зависимости модулей накопления G' (а) и потерь G'' (б) гелей пектина (1) и пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}] = 0.25$ мас. %) состава 75 : 25 (2), 50 : 50 (3) и 25 : 75 об. % (4). Частота осциллирующего напряжения $\omega = 1$ Гц, 25°C . Точки – экспериментальные значения, линии – расчет в соответствии с обобщенной моделью Максвелла.

Таблица 2. Модуль сдвига и параметры полимерной сетки при различных условиях приготовления гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+}

Содержание арабиногалактана в геле, об. %	Ca^{2+} , мас. %	G , кПа	ν , моль/ м^3	ξ , нм
Влияние содержания арабиногалактана				
0	0.25	19.9	8.20	7.3
25	0.25	18.5	7.60	7.5
50	0.25	7.60	3.10	10.1
75	0.25	1.16	0.50	18.8
Влияние концентрации Ca^{2+} при разном содержании арабиногалактана				
0	0.05	0.01	0.004	91.0
0	0.1	0.50	0.20	24.9
0	0.5	41.6	17.10	5.7
50	0.05	0.02	0.01	71.8
50	0.1	3.97	1.60	12.5
50	0.5	24.5	10.10	6.8

содержании ионов $[\text{Ca}^{2+}] < 0.1$ мас. %, не связанные полимерные цепи пектина взаимодействуют с арабиногалактаном, что упрочняет и структурирует полимерную сетку.

Таким образом, варьирование концентрации арабиногалактана и ионов Ca^{2+} значительно расширяет возможности регулирования

реологических свойств пектиновых гидрогелей и структурных параметров их полимерных сеток. Это в свою очередь будет оказывать влияние на кинетику набухания гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} .

Кинетика набухания гидрогелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+}

На рис. 5а представлены кривые набухания гидрогелей, приготовленных с различным содержанием арабиногалактана. Видно, что все кривые соответствуют равновесному набуханию, типичному для химически и ионно-сшитых гидрогелей. Обработка кривых набухания гидрогелей при разном содержании арабиногалактана по уравнению первого порядка (4) показана на рис. 6а и 6б. В отсутствие арабиногалактана и при его содержании до 25 об. % наблюдаются нелинейные (S-образные) зависимости на всей продолжительности набухания гидрогелей до равновесного значения. Это указывает на отсутствие вклада диффузии Фика в процесс набухания. Однако с повышением содержания арабиногалактана выраженный S-образный вид зависимостей в координатах уравнения (4) сменяется на более прямолинейный вид (рис. 6б), о чем свидетельствует повышение коэффициента корреляции R^2 для уравнения прямой с 0.93 (рис. 6а) до 0.97 (рис. 6б).

Это указывает на то, что увеличение содержания арабиногалактана повышает вклад диффузии Фика в набухание гидрогелей. Данный

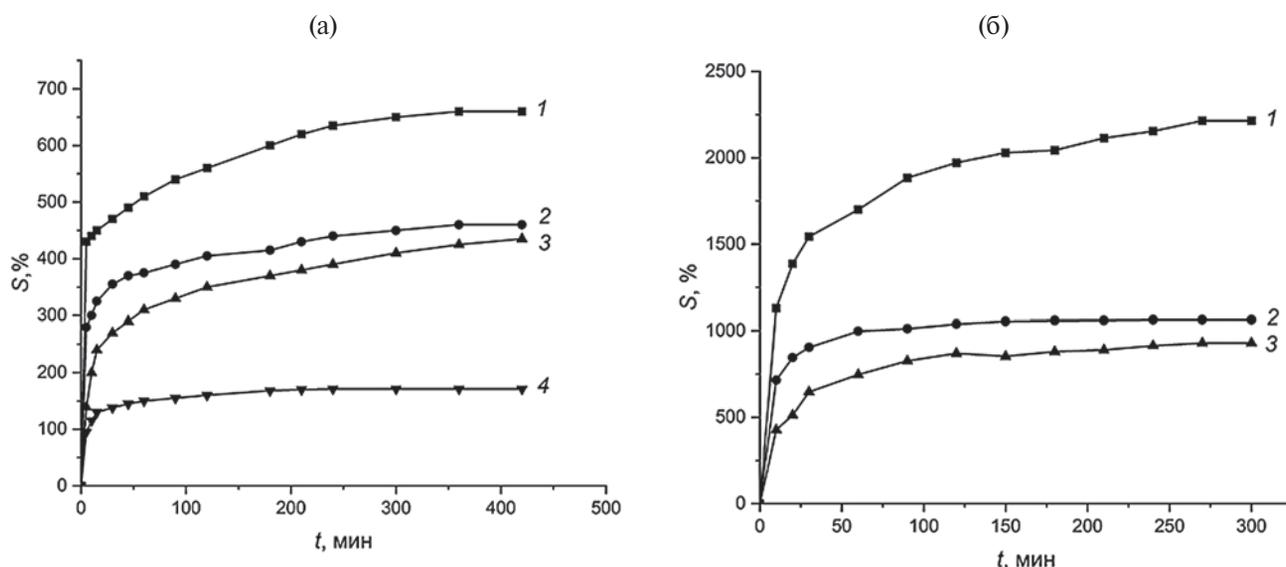


Рис. 5. Кинетические кривые сорбции воды гелями в зависимости от состава (а) и рН среды (б). а: 1 – пектин, 2–4 – пектин : арабиногалактан состава 75 : 25 (2), 50 : 50 (3), 25 : 75 об.% (4), $[Ca^{2+}] = 0.5$ мас.%, рН 7.0; б: рН 9 (1), 6 (2), 4 (3), [пектин : арабиногалактан] = 50 : 50 об.%, $[Ca^{2+}] = 0.25$ мас.%

результат коррелирует с тем, что введение разветвленного арабиногалактана, не способного к сшиванию ионами Ca^{2+} , приводит к увеличению средних размеров ячеек полимерной сети, в которых транспорт воды обусловлен исключительно градиентом концентрации (фиковская диффузия).

Обработка кривых набухания гидрогелей при разном содержании арабиногалактана (рис. 5а) по уравнению второго порядка (5) приведена на рис. 6в. Видно, что независимо от содержания арабиногалактана набухание гидрогелей соответствует кинетике реакции второго порядка.

Кинетика набухания пектиновых гидрогелей, приготовленных в присутствии арабиногалактана, демонстрирует заметный отклик на изменение рН, что видно на рис. 5б. Обработка кривых набухания гидрогелей при разных рН среды (рис. 5б) по уравнению первого порядка (4) показана на рис. 7а. Линейные зависимости охватывают практически весь диапазон времени набухания, что указывает на транспорт воды в процессе набухания по типу диффузии Фика. Кроме того, набухание гидрогелей при варьировании рН может быть охарактеризовано кинетикой реакции второго порядка, что следует из рис. 7б.

В табл. 3 представлены величины равновесного набухания S_e , констант релаксации k_R , рассчитанных по данным рис. 6в, 7б и констант набухания k_D , рассчитанных по данным рис. 6а, 6б, 7а. Из табл. 3 следует, что при нейтральном рН повышение содержания арабиногалактана уменьшает величину равновесного набухания, но увеличивает скорость релаксации (повышение константы

Таблица 3. Равновесное набухание и кинетические параметры набухания гидрогелей ПК- Ca^{2+} и пектин-арабиногалактан- Ca^{2+} ($[Ca^{2+}] = 0.25$ мас.%)

Содержание арабиногалактана в гидрогеле, об.%	рН	S_e , %	k_R , (г/г) $^{-1}$ мин $^{-1}$	k_D , мин $^{-0.5}$
Влияние содержания арабиногалактана				
0	7	675	0.01	
25	7	466	0.02	
50	7	442	0.01	0.15
75	7	175	0.08	0.25
Влияние рН				
50	4	976	0.01	0.18
50	6	1086	0.02	0.29
50	9	2310	0.003	0.18

k_R) и скорость фиковской диффузии (повышение константы k_D). Это означает, что арабиногалактан способствует транспорту молекул воды в пектиновую часть гидрогеля, сшитую посредством ионов Ca^{2+} и вносящую основной вклад в удержание воды, т.е. величину S_e .

В присутствии 50 об.% арабиногалактана в составе геля варьирование рН приводит к изменению кинетических характеристик набухания, т.е. гидрогели пектин-арабиногалактан- Ca^{2+} являются рН чувствительными. При понижении рН с 9 до 4 ед. наблюдается уменьшение величины равновесного набухания (табл. 3).

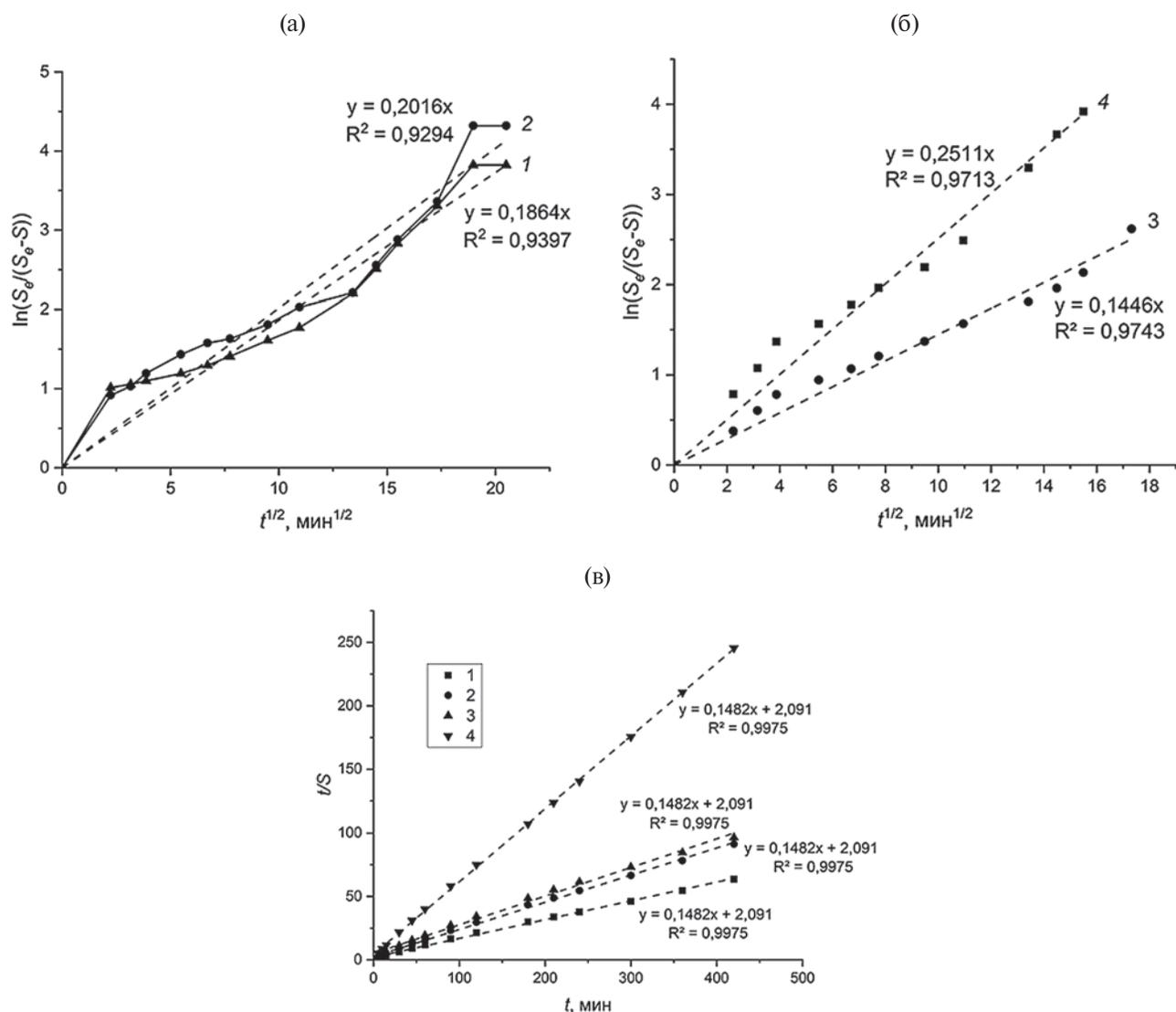


Рис. 6. Кинетические кривые набухания, обработанные в координатах уравнений (4) (а, б) и (5) (в) гелей пектин– Ca^{2+} (1) и пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}] = 0.5$ мас. %, pH 7.0) состава: 75 : 25 (2), 50 : 50 (3), 25 : 75 об.% (4). а: $y = 0.1864x$, $R^2 = 0.9397$ (1); $y = 0.2016x$, $R^2 = 0.9294$ (2); б: $y = 0.1446x$, $R^2 = 0.9743$ (3); $y = 0.2511x$, $R^2 = 0.9713$ (4); в: $y = 0.1482x + 2.091$, $R^2 = 0.9975$.

При этом в кислой и щелочной средах константа релаксации уменьшается относительно ее значения при pH 6 практически на порядок. Это свидетельствует о возрастании лимитирующего влияния скорости релаксации на набухание гидрогелей в кислой и щелочной средах. Схожее влияние pH оказывает и на константы набухания, с той разницей, что в этом случае наблюдается менее значительное понижение значений константы относительно pH 6 (табл. 3).

Таким образом, варьирование pH среды и содержания арабиногалактана оказывают влияние на величину равновесного набухания и скорости ее достижения в широких пределах за счет изменения скорости релаксации и скорости фиковской диффузии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования свидетельствуют об образовании полимерного комплекса между макромолекулами пектина и арабиногалактана за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий, в результате чего формируются микрочастицы, размер которых зависит от концентрации и состава полимерной смеси. В свою очередь это определяет физико-химические свойства получаемых на их основе гидрогелей, сшитых ионами Ca^{2+} . Обнаружено, что формирование гидрогеля в присутствии арабиногалактана при низком содержании ионов Ca^{2+} приводит к увеличению концентрации сшивок и уменьшению размера ячеек полимерной сети, что улучшает реологические свойства таких гелей. Это имеет важное

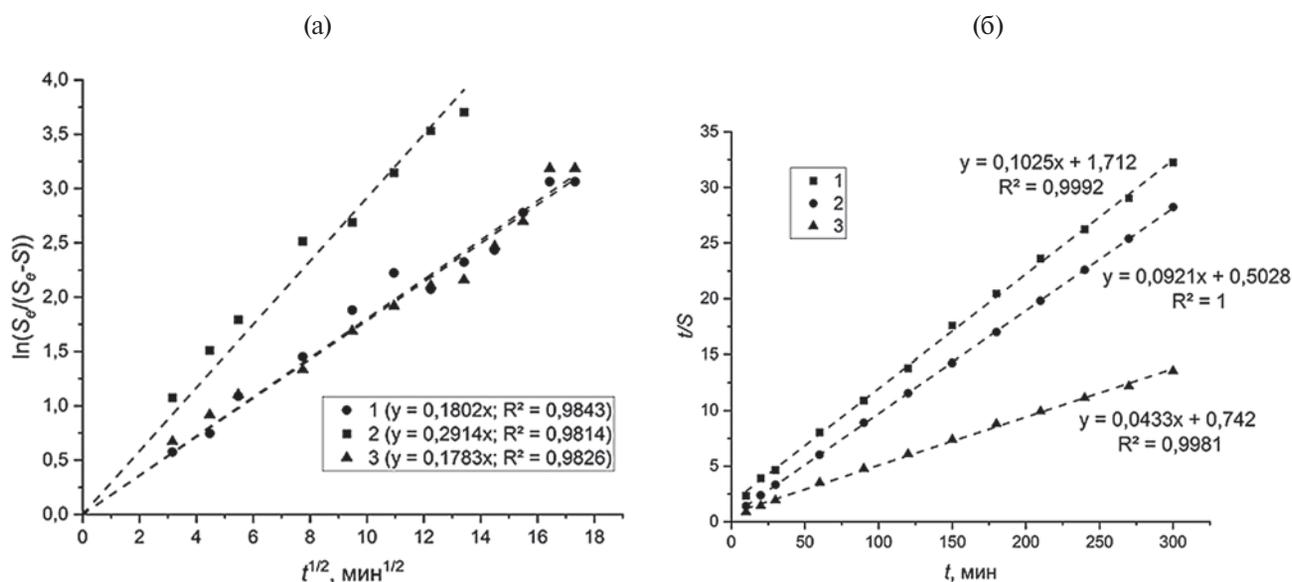


Рис. 7. Кинетические кривые набухания гелей пектин–арабиногалактан– Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}] = 0.25$ мас.%) состава 50 : 50 об.% в координатах уравнений (4) (а) и (5) (б) при рН среды 4(1), 6 (2), 9 (3). а: $y = 0.1802x$, $R^2 = 0.9843$ (1); $y = 0.2914x$, $R^2 = 0.9814$ (2); $y = 0.1783x$, $R^2 = 0.9826$ (3); б: $y = 0.1025x + 1.712$, $R^2 = 0.9992$ (1); $y = 0.0921x + 0.5028$, $R^2 = 1$ (2); $y = 0.0433x + 0.742$, $R^2 = 0.9981$ (3).

значение для технологии получения инъекционных гидрогелей и медицинских пленок. Судя по данным кинетики набухания, в перспективе появляется возможность регулировать скорость высвобождения иммобилизованных лекарственных средств, изменяя состав полимерной смеси в полученных гидрогелях и используя их высокую рН чувствительность.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2022–2024 г.г. (Госзадание: “Развитие фундаментальных основ управления структурой полимеров и кинетикой процесса в каталитической полимеризации, направленной модификации синтетических и биогенных полимеров и получение полимерных систем для биомедицинских приложений” № 1021062311391-0-1.4.4) с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Химия” Уфимского института химии Российской академии наук и Регионального центра коллективного пользования “Агидель” Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varaprasad K., Raghavendra G.M., Jayaramudu T., Yallapu M.M., Sadiku R. // Mater. Sci. Eng. 2017. V. 79. P. 958.
2. Narayanaswamy R., Torchilin V.P. // Molecules. 2019. V. 24. P. 603.
3. Wang K., Hao Y., Wang Y., Chen J., Mao L., Deng Y., Chen J., Yuan S., Zhang T., Ren J., Liao W. // Int. J. Polym. Sci. 2019. P. 1.
4. Kedir W.M., Deresa E.M., Diriba T.F. // Heliyon. 2022. V. 8. e10654.
5. Liu L.S., Fishman M.L., Hicks K.B. // Cellulose. 2007. V. 14. № 1. P. 15.
6. Hu W., Wang Z., Xiao Y. // Biomater. Sci. 2019. V. 7. № 3. P.843.
7. Huang S., Kong X., Xiong Y., Zhang X., Chen H., Jiang W., Niu Y., Xu W., Ren C. // Eur. Polym. J. 2020. V. 141. P.110094.
8. Ciriminna R., Fidalgo A., Scurria A., Ilharco L.M., Pagliaro M. // Food Hydrocolloids. 2022. V. 127. P. 107483.
9. Cai R., Pan S., Li R., Xu X., Pan S., Liu F. // Food Chem. 2022. V. 389. P. 133130.
10. Li D., Li J., Dong H., Li X., Zhang J., Ramaswamy S., Xu F. // Int. J. Biological Macromol. 2021. V. 185. P. 49.
11. Cao L., Lu W., Mata A., Nishinari K., Fang Y. // Carbohydr. Polymers. 2020. V. 242. P. 116389.
12. Upadhyay U., Sireesha S., Gupta S., Sreedhar I., Anitha K.L. // Carbohydr. Polymers. 2023. V. 301. P. 120294.
13. Alsakhawy M.A., Abdelmonsif D.A., Haroun M., Sabra S.A. // Int. J. Biological Macromol. 2022. V. 222. P. 701.
14. Revuelta M.V., Villalba M.E.C., Navarro A.S., Güida J.A., Castro G.R. // React. Funct. Polym. 2016. V. 106. V. 8.

15. *Mudarisova R.Kh., Badykova L.A.*// Polymer Science A. 2012. V. 54. № 2. P. 106.
16. *Babkin V.A., Medvedeva E.N., Neverova N.A., Levchuk A.A., Sapozhnikov A.N.* // Chem. Nat. Comp. 2014. V. 50. № 2. P. 225.
17. *Badykova L.A., Mudarisova R.K., Kolesov S.V.*// Polymer Science A. 2021. V. 63. № 2. P. 117.
18. *Шелухина Н.П., Абаева Р.Ш., Аймухамедова Г.Б.* Пектин и параметры его получения. Фрунзе: Илим, 1987. С. 90.
19. *Донченко Л.В.* Технология пектинов и пектино-продуктов. М.: ДеЛи, 2000.
20. *Корас Т., Rucigaj A., Krajnc M.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 159. P. 557.
21. The Science and Technology of Rubber / Ed. by James E. Mark, Burak Erman, C. Michael Roland. Acad.Press, 2013. Ch. 5. P. 193.
22. Fluids, Colloids and Soft Materials: An Introduction to Soft Matter Physics/ Ed. by Alberto Fernandez Nieves and Antonio Manuel Puertas. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2016.
23. *Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б.* Введение в физико-химию растворов полимеров. М.: Наука, 1978.
24. *Yavari N., Azizian S.* // J. Molec. Liq. 2022. V. 363. P. 119861.
25. *Schott H.* // Macromol. Sci., Physics. 1992. V. 31. № 1. P. 1.
26. *Ganji F, Vasheghani-Farahani S., Vasheghani-Farahani E.* // Iran. Polym. J. 2010. V. 19. № 5. P. 375.

СИНТЕЗ, РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ФРАГМЕНТАМИ ЭТИЛЕНДИАМИНА

© 2024 г. М. А. Торлопов¹, Н. Н. Дрозд², П. А. Ситников¹, В. И. Михайлов¹,
Е. В. Удоратина^{1,*}

¹Институт химии Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук” 16700, Республика Коми, Сыктывкар, ул. Первомайская, 48

²Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

*e-mail: udoratina-ev@chemi.komisc.ru

Поступила в редакцию 07.11.2024 г.

После доработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 20.06.2024 г.

Производное альгиновой кислоты, содержащее амидные и аминогруппы, синтезировано присоединением этилендиамина к активированным карбодимидом карбоксильным группам полисахарида. Анализ его структуры с использованием ЯМР-спектроскопии подтверждает, что присоединение этилендиамина осуществляется с образованием амидной связи и появлением свободных первичных аминогрупп в эквимолярном соотношении. Методами ротационной и капиллярной вискозиметрии в комбинации с динамическим рассеянием света и потенциометрическим титрованием показано, что критическая концентрация перехода к режиму раствора с зацеплениями *Се* коррелирует со степенью замещения и изменением дзета-потенциала модифицированных полисахаридов. Последние характеризуются более низкой концентрацией *Се* и в среднем более низкой энергией активации вязкого течения растворов, чем альгинат натрия. В интервале рН 6.5–6.0 для полуразбавленных растворов модифицированного полисахарида и альгината натрия наблюдается противоположно направленное изменение размера агрегатов макромолекул. Гемосовместимость модифицированного полисахарида исследована *in vitro* в тестах времени рекальцификации крови, активированного частичного тромбопластинового времени и агрегации тромбоцитов. Показано, что модифицированный полисахарид не влияет на коагуляцию крови (в концентрациях 0.033 и 2.22 мг/мл), коагуляцию плазмы (в концентрации до 0.0465 мг/мл) и агрегацию тромбоцитов (в концентрации до 0.182 мг/мл).

DOI: 10.31857/S2308112024030045, EDN: LWUJAL

ВВЕДЕНИЕ

Материалы на основе биополимеров используются в биомедицинских разработках для поддержки, улучшения или замены поврежденных тканей или биологических функций. В применяемых и перспективных разработках для клинической практики материалы на основе альгиновой кислоты занимают особое место в области создания раневых покрытий, медицинских имплантатов и устройств для ускорения заживления [1–3]. В недавнем обзоре [4] описано получение волокон, сфер, гидрогелей и матриц для 3D-печати на основе альгината и обсуждены последние тенденции, связанные с использованием этих материалов для перевязки ран, доставки лекарств и тканевой инженерии.

Альгиновая кислота — гетерополисахарид, содержащийся в бурых морских водорослях и в капсулах некоторых бактерий. Он состоит из звеньев гулурановой и маннурановой кислот, соединенных β (1 → 4) гликозидными связями. Соответствующие моносахаридные звенья расположены, как правило, чередующимися блоками [5], что в свою очередь определяет часть практически значимых свойств альгинатов, например гелирующие свойства в присутствии ионов металлов.

Основные методы настройки свойств материалов на основе альгиновой кислоты под конкретные биомедицинские приложения включают создание композитов и химическую модификацию. Рациональным подходом является синтез сравнительно низкозамещенных производных для сохранения ценных свойств данного полисахарида.

Химическая модификация альгиновой кислоты осуществлена различными методами, среди которых распространено образование амидной связи с применением химии карбодимидов [6, 7]. Использование бифункциональных агентов в этой реакции открывает возможность синтеза амидов альгиновой кислоты, содержащих дополнительно новые типы химических функций, интересных с точки зрения присоединения целевых биологически активных компонентов и модификации физико-химических свойств материалов. По причинам гидрофильности, отсутствия пространственно-затруднённых элементов и доступности этилендиамин хорошо подходит для реализации такой стратегии получения соответствующих производных альгиновой кислоты. Например, в работе [8] альгиновая кислота модифицирована этилендиамином для получения имплантируемых гелей с определёнными свойствами. Свободные аминогруппы модифицированной альгиновой кислоты позволили провести сшивку с низкомолекулярным гиалуронатом. Авторы делают важный вывод, что не только количество конъюгированной гиалуроновой кислоты, но и максимальное сохранение структуры альгиновой кислоты оказывает положительное влияние на рост и развитие клеток в получаемых гидрогелях. Прежде всего это связано с возможностью управления реологическими свойствами материала.

Помимо физико-химических свойств материалов, контактирующих с тканями животных и человека, принципиальное значение имеет также их гемосовместимость, определение которой является важнейшим этапом в оценке биосовместимости материалов. В процессе определения гемосовместимости биоматериалы должны пройти испытания, включающие тестирование в опытах *in vitro* и *in vivo* [9]. Тестирование на гемосовместимость включает также оценку взаимодействий инородных материалов с кровью для изучения возможных побочных эффектов для пациента, возникающих в результате воздействия материалов на клетки и компоненты крови [10, 11]. Такие побочные эффекты разнообразны и сложны и, как правило, очень опасны для благополучия носителя материала. Тесты *in vivo* включают адсорбцию белка; активацию комплемента; анализ протромбинового времени, неактивированного частичного тромбопластинного времени, активированного частичного тромбопластинного времени, времени свертывания крови; агрегации тромбоцитов; гемолиз эритроцитов.

Цель настоящей работы заключается в комплексном исследовании водорастворимых производных альгината натрия, модифицированного этилендиамином (Альг-ДЭА), содержащих

свободные аминогруппы, включая синтез, реологические свойства растворов и анализ влияния *in vitro* производных альгината натрия на плазменные и клеточные компоненты крови человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реактивы

В работе использовали натриевую соль альгиновой кислоты ($M_w = 4.07 \times 10^5$ по данным ГПХ), этилендиамин (“Alfa Aesar”); 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид солянокислый (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), NaCl, натриевую соль лимонной кислоты ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$), CaCl_2 (“Sigma-Aldrich”); HCl, NaOH (х.ч. “Реакор”, Россия); *tris*-HCl буфер, набор реагентов для определения активированного частичного тромбопластинного времени в плазме крови (АЧТВ-реагент) (Научно-производственное объединение “Ренам”, Россия); нефракционированный гепарин (“Гепарин-Белмед”, 25000 ЕД, Республиканское унитарное предприятие “Белмедпрепараты”); раствор аденозин 5'-дифосфата (АДФ) (“Sigma-Aldrich”) и деионизированную воду.

Синтез альгиновой кислоты, модифицированной этилендиамином (стандартный эксперимент)

В колбу, снабженную перемешивающим и термостатирующим устройствами, датчиками температуры и pH, помещали 2.0 г (10.1 ммоль) альгината натрия и растворяли при перемешивании в 100 мл деионизированной воды. Раствор подкисляли 0.1 н HCl до pH 5.5 ± 0.1 . Такое значение pH среды поддерживали в течение всего времени реакции, контроль осуществляли с помощью pH-метра / кондуктометра “Seven Compact Duo” (“Mettler Toledo”). К полученному раствору прибавляли 0.581 г (3.03 ммоль) EDC, 0.173 г (1.50 ммоль) NHS и приводили pH к заданному значению. Реакционную смесь выдерживали 60 мин при 25 °C для активации карбоксильных групп полисахарида. Отдельно готовили водный раствор этилендиамина, для чего 0.91 г (15.15 ммоль) этилендиамина (пятикратный избыток относительно EDC) в 10 мл воды охлаждали и при перемешивании подкисляли 1 н HCl до pH 5.5 ± 0.1 . Готовый раствор этилендиамина добавляли к раствору альгиновой кислоты. Полученную реакционную смесь перемешивали 24 ч при 25 °C, контролируя pH. Затем смесь подкисляли 0.1 н раствором HCl до pH 5.0 и проводили осаждение полимера этиловым спиртом (500 мл). Осадок отделяли центрифугированием, промывали этиловым спиртом и растворяли в воде при pH 8.5. Раствор очищали от низкомолекулярных

примесей методом диализа (диализные мешки CelluSep, размер пор 3.5 кДа). Контроль очистки осуществляли методом кондуктометрии, определяя изменение проводимости раствора. Очищенный раствор полимера лиофилизировали. Элементный анализ Альг-ДЭА (%): N 1.95, C 33.5, H 4.7. Степень замещения (СЗ) в препаратах Альг-ДЭА находили из данных элементного анализа как

$$CЗ = \frac{198 \cdot \omega_N}{28 \cdot 100 - \omega_N \cdot (60.1 - 1)}, \quad (1)$$

где 198 – ММ статистического элементарного звена альгиновой кислоты; ω_N – содержание азота, %; 28 – ММ двух атомов азота в присоединённом фрагменте этилендиамина; 60.1 – ММ молекулы этилендиамина. Для обозначения степени замещения образца, численное значение степени замещения прибавляли к сокращению, например, Альг-ДЭА-0.14. Для синтеза Альг-ДЭА с другими степенями замещения изменяли соотношение альгиновая кислота: EDC, сохраняя соотношения прочих реагентов относительно EDC.

Методы анализа

Элементный анализ осуществляли на приборе EA-1110 (“SE instruments”) с хроматографическим определением продуктов сжигания.

Спектры ЯМР ^1H записывали на приборе “Bruker Avance II 300” (рабочая частота 300 МГц) в D_2O при температуре 30 °С; время релаксации 3.5 с.

ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре “IR Prestige 21” (“Shimadzu”) в таблетках с KBr в диапазоне длин волн 400–4000 cm^{-1} .

ММ альгината натрия определяли методом гель-проникающей хроматографии. Для анализа использовали хроматографическую систему “Shimadzu” (Япония): насос LC-20AD, термостат СТО-10AS, рефрактометр RID-10A, колонка Shodex OHpac SB804 HG (8 мм × 30 см). Элюирование проводили 0.15 М NaCl при 40 °С со скоростью потока 0.3 $\text{cm}^3/\text{мин}$. Колонку калибровали по образцам сульфатированных пуллуланов с ММ в диапазоне $(1.3 \times 10^3) - (8 \times 10^3)$.

Реологические свойства водных растворов исследовали с помощью реометра “DV-III+ Ultra” (“Brookfield”, USA), система “ротор-стакан” с набором сменных шпинделей. Перед измерением образец помещали в измерительную ячейку и термостатировали в течение 25 мин. Продолжительность измерения составляла 20 с. Измерения проводили при температуре 20.0 ± 0.05 °С и 37.0 ± 0.05 °С.

Вязкость полимерных растворов определяли на капиллярном вискозиметре Уббелюде в интервале концентраций 0.03–1.0 г/дл при 25 ± 0.05 °С. Удельную вязкость $\eta_{\text{уд}}$ и приведённую вязкость $\eta_{\text{пр}}$ рассчитывали по формулам

$$\eta_{\text{уд}} = \frac{t - t_0}{t_0}, \quad (2)$$

$$\eta_{\text{пр}} = \frac{\eta_{\text{уд}}}{C}, \quad (3)$$

где t и t_0 – время истечения раствора полимера и чистого растворителя, C – концентрация полимера.

Энергию активации вязкого течения $\Delta E_a(\eta)$ растворов альгиновой кислоты и её производных рассчитывали по уравнению Аррениуса–Эйринга

$$\eta = A e^{\Delta E_a/RT}. \quad (4)$$

Здесь R – универсальная газовая постоянная, A – константа. Расчёт осуществляли для каждой концентрации полимера по тангенсу угла наклона зависимости $\ln \eta - T^{-1}$. Для оценки энергии активации измерения проводили в температурном диапазоне 15–50 °С через каждые 5 °С.

Размер полимерных агрегатов (средние гидродинамические диаметры D_h) в растворе при 25 °С измеряли методом динамического рассеяния на приборе “Zetasizer Nano ZS” (“Malvern”, Великобритания), снабжённом He/Ne лазерным источником света с длиной волны 633 нм. Угол детектирования 173°.

Кислотно-основные свойства полиэлектролитов исследовали методом потенциометрического титрования на автоматическом титраторе “Аквилон АТП-02” с комбинированным электродом ЭСЛК-01.7. Титрование проводили 0.1 н HCl или 0.01 н NaOH. Значения pH измеряли после добавления каждой порции титранта и установления равновесия. Каждый образец титровали три раза. На основании полученной зависимости объема титранта V_{titr} от pH рассчитывали адсорбцию ионов водорода n_b (ммоль/г) на изучаемой поверхности от pH раствора (в расчёте на 1 г образца). Расчёт проводили по формуле

$$n_b = \frac{V_{\text{total}} (C_{\text{H}^+, \text{OH}^-, 0} - C_{\text{H}^+, \text{OH}^-, e})}{m}. \quad (5)$$

При расчёте константы ионизации pK_a использовали математическую модель, описанную в работе [12].

Исследование гемосовместимости *in vitro*

В исследовании применяли стабилизированную раствором $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ (0.106 моль/л) кровь из локтевой вены доноров, а также богатую и обедненную тромбоцитами плазму человека. Кровь отбирали до метки в пластиковый шприц S-Monovette 5 ml 9NC (“Sarstedt”, Германия); все доноры давали письменное информированное согласие на взятие и использование крови в Национальном медицинском исследовательском центре гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. Богатую тромбоцитами плазму человека получали в результате центрифугирования крови в течение 7 мин при 1000 об/мин и температуре 22.0 ± 0.5 °С. Обедненная тромбоцитами плазма была приготовлена путем центрифугирования крови в течение 20 мин при 3000 об/мин. Для растворения образцов использовали 0.05 М *Трис*-HCl буфер с 0.175 М NaCl, pH 7.4.

Время появления сгустка крови или плазмы в тестах времени рекальцификации крови и активированного частичного тромбопластинового времени фиксировали на программируемом полуавтоматическом коагулометре АПГ2-01 (Минилаб-701-М, Научно-производственное объединение “Эмко”, Россия).

Влияние образцов на время свертывания цельной крови человека в тесте времени рекальцификации крови оценивали как описано G.L. Gulliani с соавторами [13]: к 0.1 мл цитратной крови, содержащей образцы Альг-ДЭА (0.033–2.220 мг/мл), добавляли 0.1 мл раствора 0.02 М CaCl_2 и фиксировали время появления сгустка.

Влияние образцов на время свертывания плазмы в тесте АЧТВ находили как описано R. Stuart, A. Michel [14] и в инструкции к набору ПГ-7/1 Научно-производственного объединения “Ренам” (Россия). К обедненной тромбоцитами плазме крови человека (0.05 мл), содержащей 0.00465–2.325 мг/мл образцов Альг-ДЭА, добавляли 0.05 мл АЧТВ-реагента и инкубировали в течение 3 мин при 37 °С. Затем вносили 0.05 мл 0.025 М раствора CaCl_2 и определяли время появления фибринового сгустка.

По графику зависимости времени свертывания плазмы от концентрации образцов находили

концентрации 2АЧТВ (мг/мл), при которых время свертывания плазмы было в два раза больше, чем в контроле с добавлением 0.05 М *Трис*-HCl буфера (с 0.175 М NaCl, pH 7.4) вместо образцов. При расчете антитромбиновой активности образцов аПа тест-систему калибровали по нефракционированному гепарину [15].

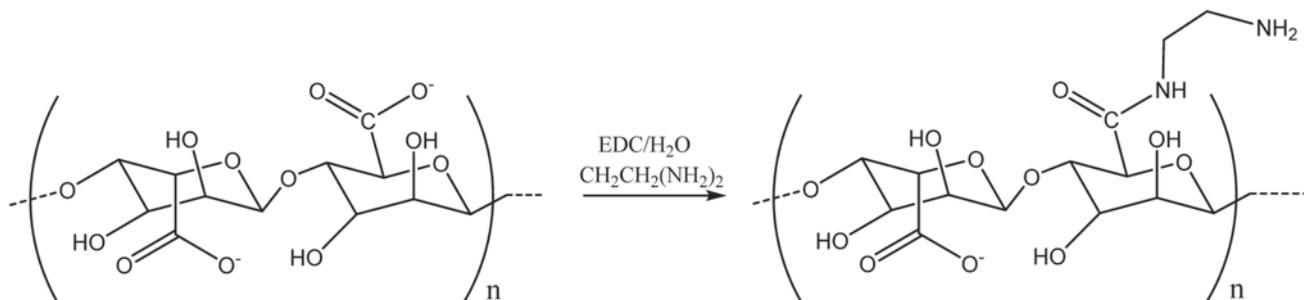
Влияние образцов Альг-ДЭА на агрегацию тромбоцитов человека оценивали с помощью агрегометра “Model 500” (“Chrono-Log”, США) с самописцем, фиксирующим изменения пропускания света обогащенной тромбоцитами плазмы человека (по методу G. Born) [16]. Индуктором агрегации служил раствор АДФ. Богатую тромбоцитами плазму человека (0.500 мл), содержащую 0.00182 – 1.82 мг/мл образцов Альг-ДЭА, инкубировали 1 мин при 37 °С, затем в нее вносили 0.05 мл раствора АДФ (конечная концентрация 2×10^{-5} моль/л). Для контроля использовали плазму с добавлением 0.05 мл 0.05 М *трис*-HCl буфера, pH 7.4, содержащего 0.175 М NaCl. Определяли агрегацию тромбоцитов в течение 5 мин; за 100% принимали пропускание света обедненной тромбоцитами плазмы человека. На кривой агрегации тромбоцитов находили максимальную амплитуду в процентах.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ Biostat и Statistica. Для сравнения ненормально распределенных данных применяли непараметрический U критерий Манна-Уитни. Результаты работы представлены средними арифметическими значениями со стандартными отклонениями средних арифметических для 4-9 независимых определений. Статистически значимые отличия между рядами данных наблюдали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез амид/аминосодержащего производного альгиновой кислоты

Производные альгиновой кислоты, содержащие остатки этилендиамина, синтезировали в водном растворе с использованием карбодииmidного метода.



С целью предотвращения реакций “сшивки”, которые могут быть запущены этилендиамином, его брали в большом избытке по отношению к карбоксильным группам альгиновой кислоты и к конденсирующему агенту. Данным методом синтезированы водорастворимые образцы со степенью замещения 0.02–0.3.

Структуру производного альгината натрия исследовали методом ЯМР. На рис. 1а представлены ЯМР ^1H спектры Альг-ДЭА и альгиновой кислоты (врезка). Спектры ^1H модифицированного образца содержат характерные химические сдвиги аномерных протонов звеньев гулуруновой (G-N1) и мануруновой кислот (M-N1) в области 5.1–4.9 м. д.; сигналы в области 4.5–3.9 м. д. соотношены с химическими сдвигами протонов H5, а сигналы в области 3.8–3.1 м. д. – с химическими сдвигами протонов H2–H4 G и M единиц, их блоков и сочетаний [17–19].

В спектре ЯМР ^1H образцов после амидирования также сохраняются характерные сигналы протонов структуры альгината натрия; дополнительно в спектрах ЯМР ^1H модифицированных образцов присутствуют сигналы химических сдвигов присоединённого этилендиамина: метиленовой группы при первичной аминогруппе (CH_2NH_2 , $\delta = 3.08$ м. д.) и метиленовой группы при монозамещённой амидной группе ($\text{CH}_2\text{NHC}=\text{O}$, $\delta = 3.46$ м. д.). Площади этих пиков, найденные интегрированием, равны, что указывает на равное количество протонов метиленовых групп в амидной группе и аминогруппе. Это в свою очередь прямо свидетельствует о протекании реакции амидирования (присоединения этилендиамина к карбоксильной группе элементарного звена полимера) в выбранных условиях с участием лишь одной из двух аминогрупп этилендиамина. Анализ спектров ЯМР показывает, что рассматриваемая модификация альгината натрия приводит к сохранению основной структуры поликислоты с одновременным введением остатков этилендиамина в виде соответствующего монозамещённого амида.

ИК-Фурье-спектры альгината натрия и Альг-ДЭА представлены на рис. 1б. Оба соединения содержат широкую полосу с максимумом в области 3410 см^{-1} , относящуюся к валентным колебаниям связи O–H. Сигнал, отвечающий за колебания связи NH_2 первичных аминогрупп, находится также в этой области. Максимумы в области 2930 см^{-1} отнесены к симметричным колебаниям связи C–H (алифатические группы CH_2). В спектре альгината натрия присутствуют полоса антисимметричных колебаний карбоксилат-аниона с максимумом в области 1630 см^{-1} и полоса симметричных колебаний карбоксилат-аниона в области 1410 см^{-1} , наблюдаемая также в спектре Альг-ДЭА. Полосы с максимумами при

1300 см^{-1} , 1100 см^{-1} и 1033 см^{-1} относятся к деформационным колебаниям связям C–C–N, C–O–C и валентных колебаний пиранозных колец. Группа сигналов, характерная для полисахаридов в области $950\text{--}812\text{ см}^{-1}$ (колебания связи C–O связи и деформационные колебания C1–N аномерных центров полисахаридов), указывает на присутствие остатков мануруновой и α -L-гулуруновой кислот [20–22]. Спектр Альг-ДЭА, кроме того, содержит основные полосы, характерные для альгината натрия, но с некоторыми отличиями. В спектре Альг-ДЭА дополнительно присутствует плечо (слабый изгиб на фоне основной полосы) при 1715 см^{-1} – сигнал, относимый к валентным колебаниям связи C=O карбоксильных групп. Второе плечо при 1670 см^{-1} относится к полосе поглощения карбонильной группы ($\text{NHC}=\text{O}$) Амид I, а полоса с максимумом 1640 см^{-1} (деформационные колебания NH_2 , NH) – к полосе Амид II [23].

Реологические свойства водных растворов Альг-ДЭА

Реологические свойства водных растворов полимеров дают ценную информацию, позволяющую делать выводы о структурообразовании в системе полимер–растворитель. С практической точки зрения реологические свойства водных растворов имеют ключевое значение для переработки и применения биомедицинских материалов на основе альгиновой кислоты.

Динамическая вязкость водных растворов. В исследованном диапазоне концентраций, температур и скоростей сдвига водные растворы альгиновой кислоты и Альг-ДЭА представляют собой неньютоновские псевдопластичные жидкости, вязкость которых уменьшается с увеличением скорости сдвига, а в области скоростей сдвига выше 50 с^{-1} становится практически постоянной (рис. 2).

Динамическая вязкость $\eta_{\text{дин}}$ у растворов исходной альгиновой кислоты при $20\text{ }^\circ\text{C}$ выше, чем у Альг-ДЭА; при концентрациях 1.5 и 1.2 г/дл и скорости сдвига 50 с^{-1} $\eta_{\text{дин}} = 23.4$ и 16.2 мПа с для альгиновой кислоты и 17.2 и 13.0 мПа с для Альг-ДЭА. Динамическая вязкость у растворов исходного альгината натрия с концентрацией 0.8 и 0.5 г/дл также выше, чем у соответствующих растворов Альг-ДЭА. Повышение температуры до $37\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к значимому снижению вязкости как для растворов исходного альгината натрия, так и для растворов Альг-ДЭА в большинстве исследованных концентраций, но не влияет на характер течения растворов. Исключение составляет раствор альгината натрия с концентрацией 1.5 г/дл, вязкость которого с повышением температуры существенно не изменяется. При скорости сдвига больше 50 с^{-1} $\eta_{\text{дин}} = 23.2$ мПа·с.

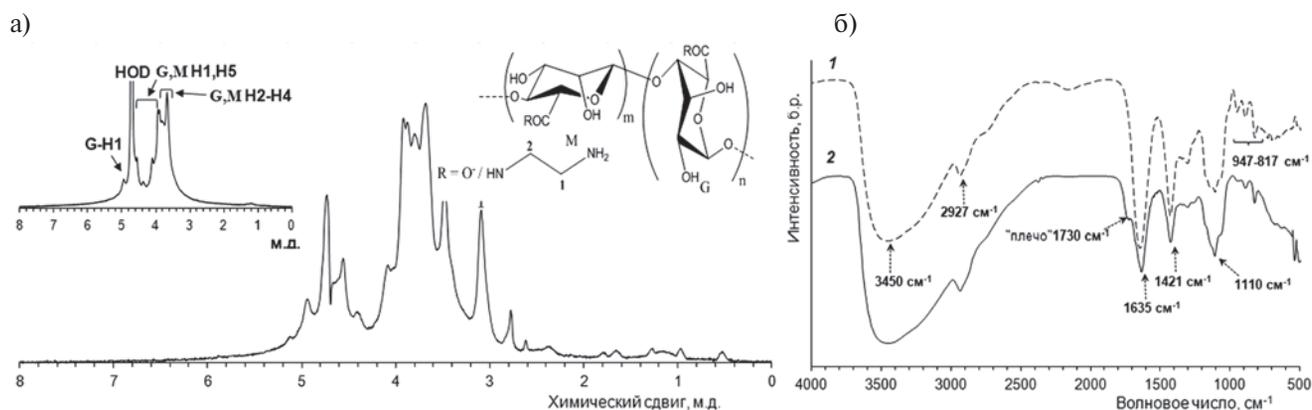


Рис. 1. ЯМР ^1H -спектр Альг-ДЭА-0.14 (степень замещения 0.14) (а) и ИК-Фурье-спектр исходного альгината натрия (1) и Альг-ДЭА-0.2 (2) (б). На вставке показан спектр исходного альгината натрия. Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

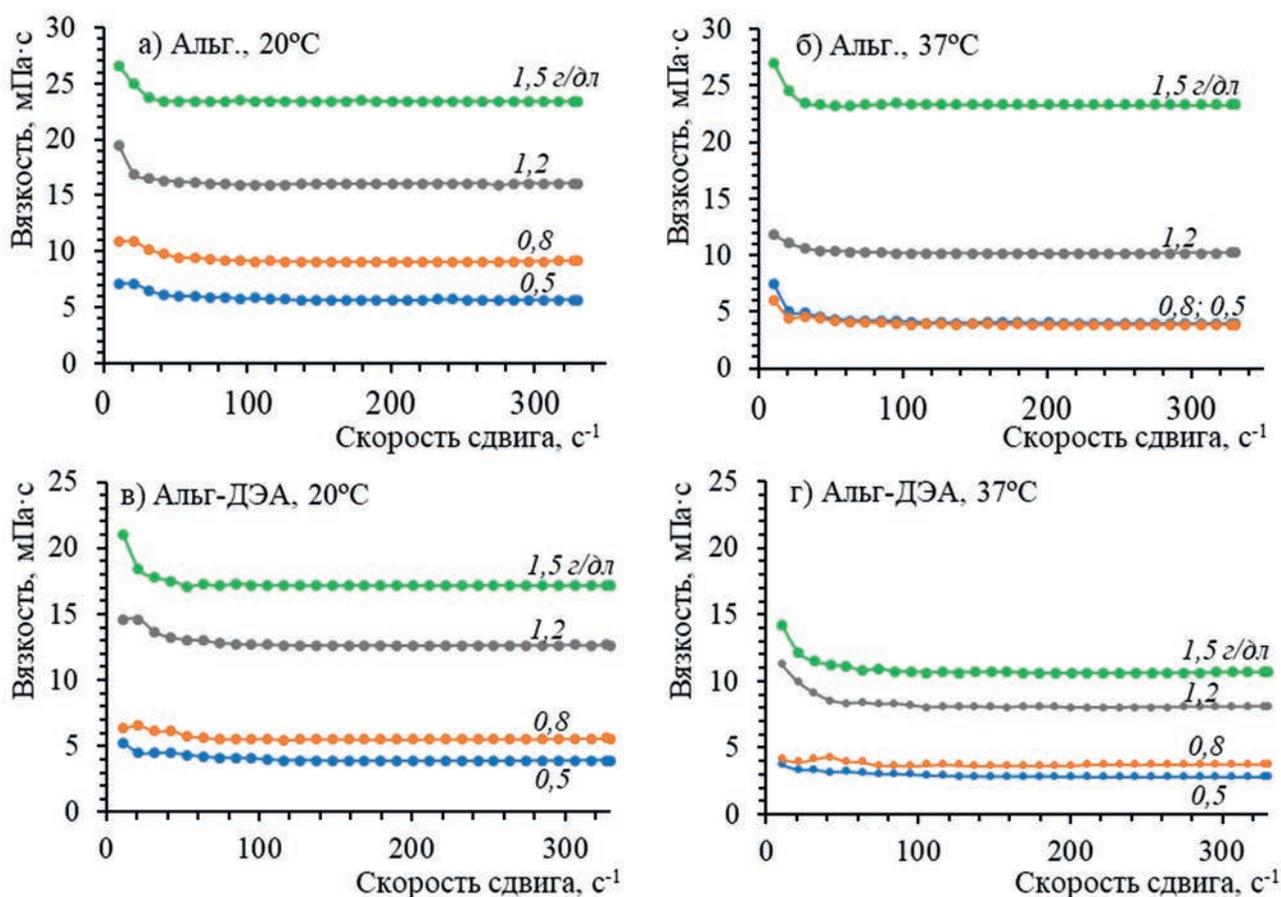


Рис. 2. Кривые вязкости водных растворов исходного альгината натрия (а, б) и Альг-ДЭА-0.14 (в, г) при 20 (а, в) и 37 °С (б, г). Концентрация полимера 1.5 (1), 1.2 (2), 0.8 (3) и 0.5 г/дл (4).

Критическая концентрация альгиновых полимеров в растворе. Форма существования полимерных цепей в растворе зависит от многочисленных факторов, среди которых химическая структура и концентрация. Если влияние взаимодействия между полимерными цепями на вязкость отсутствует, вязкость линейно возрастает

с увеличением концентрации, раствор считается разбавленным. В растворах неионогенных полимеров выше концентрации кроссовера ($C = C^*$) наблюдается отклонение от первоначального линейного роста вязкости, что свидетельствует о межмолекулярных взаимодействиях, формировании сетки зацеплений и агрегатов [24].

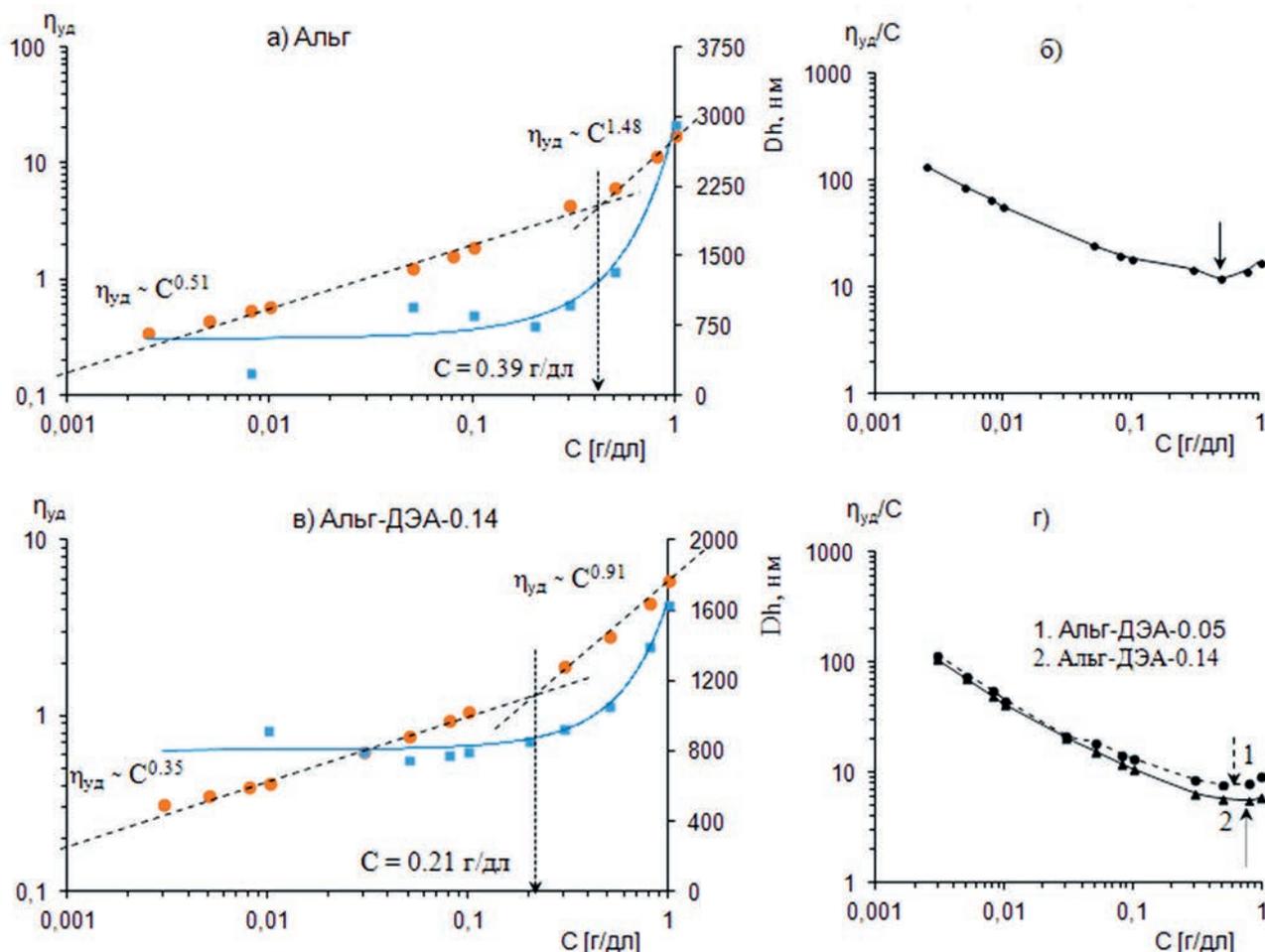


Рис. 3. Удельная вязкость $\eta_{уд}$ (1) и размер агрегатов в водном растворе D_h (2) в зависимости от концентрации альгината натрия (а) и Альг-ДЭА-0.14 (в), а также приведенная вязкость в зависимости от концентрации альгината натрия (б) и Альг-ДЭА-0.05 (1) и Альг-ДЭА-0.14 (2) (г). Бессолевого раствора, 25 °С. Пояснения в тексте.

В растворах полиэлектролитов при концентрации выше C^* наблюдается переход в полуразбавленную область, в которой существенным фактором становится взаимное отталкивание одинаково заряженных цепей и их агрегатов, препятствующее взаимопроникновению полимерных клубков и формированию сетки зацеплений [25, 26]. В бессолевых растворах дальнейший рост концентрации полиэлектролита выше $C = C_e$ приводит к полуразбавленной области с зацеплениями и затем к концентрированным растворам.

На рис. 3а, 3в представлены билогарифмические зависимости удельной вязкости от концентрации, а также зависимости размера существующих в водном растворе агрегатов альгинатных полимеров от концентрации.

Показатель степени в зависимости $\eta_{уд} \sim C^\delta$ для исходной альгиновой кислоты в бессолевого растворе при низких концентрациях составляет 0.51 (рис. 3а). При больших концентрациях полимера $\delta = 1.48$. Переход к более высокому показателю

происходит при критической концентрации $C = 0.39$ г/дл. Изменение δ коррелирует с ростом гидродинамического диаметра агрегатов в растворе. Выше указанной критической концентрации происходит быстрое увеличение размера агрегатов с 750 нм до 3000 нм. Похожие тенденции наблюдаются и для образцов Альг-ДЭА, для которых происходит быстрый рост гидродинамического диаметра агрегатов при росте концентрации выше критической. Экспериментальная критическая концентрация для Альг-ДЭА-0.05 и Альг-ДЭА-0.14 составляет 0.34 и 0.21 г/дл (рис. 3в). С этими данными коррелирует ряд значений дзета-потенциалов, определенных вблизи критических концентраций альгиновой кислоты и ее ДЭА-производных: -68 ± 1.2 мВ для исходного альгината натрия, -60 ± 0.5 мВ для Альг-ДЭА-0.05 и -55 ± 1.0 мВ для Альг-ДЭА-0.14. Наблюдается уменьшение величины абсолютной величины дзета-потенциала Альг-ДЭА с увеличением содержания аминогрупп.

Показатели степени δ для альгиновой кислоты и ее ДЭА-производных ниже критической точки близки к значению критерия Фуосса, равного 0.5 для электролитов в полуразбавленных областях [27]. Наиболее вероятной причиной некоторого отклонения экспериментальных значений δ от 0.5 является присутствие анионов HCO_3^- – продукта растворения углекислого газа в воде. Как известно [28], полиэлектролиты в разбавленной и полуразбавленной области крайне чувствительны к добавкам фоновых электролитов. Вместе с тем найденные нами величины показателя δ согласуются с литературными данными для бессолевых растворов альгиновой кислоты. Так, в работе [29] показатель δ при концентрации полимера ниже C^* составляет 0.87, выше точки кроссовера падает до 0.69, а выше C_e равен 1.33. Полученные нами данные также хорошо согласуются с теоретическими предсказаниями для показателя степени в зависимости $\eta_{\text{уд}} \sim C^\delta$ для бессолевых растворов полиэлектролитов: $\delta = 1/2$ в области полуразбавленных растворов без зацеплений и $\delta = 3/2$ в области растворов с зацеплениями [30].

Зависимости $\eta_{\text{пр}}-C$ в билогарифмических координатах (рис. 3б, 3г) имеют монотонный вид при низких концентрациях и выраженный минимум в области $C = 0.5$ г/дл. Наличие такого минимума свидетельствует о переходе в область концентрированных растворов. Выше этой концентрации формируются зацепления между макромолекулами, что отражает наблюдаемое резкое повышение гидродинамического диаметра агрегатов. Полученные результаты указывают на то, что исследованный диапазон концентраций исходного и ДЭА-модифицированных альгинатных полимеров лежит между C^*-C_e , т.е. в области полуразбавленных растворов без зацеплений. Данная область концентраций выше точки кроссовера характеризуется ориентационным порядком с формированием микродоменной структуры, стабилизированной диполь-дипольными взаимодействиями [31]. Найденные критические концентрации альгиновых полимеров $C = C_e$ соответствуют переходу в область растворов с зацеплениями.

Как было отмечено, с ростом содержания фрагментов этилендиамина наблюдается закономерное падение зета-потенциала в Альг-ДЭА. Это уменьшает силы взаимного отталкивания макромолекул, способствует процессам их сближения и агрегирования и сдвигает переход в другую область структурообразования и смену режима течения к более низким концентрациям полимера.

Энергия активации вязкого течения водных растворов. Учет влияния температуры на реологические характеристики растворов полимеров особенно необходим в случае использования

растворов для внутривенного введения. Влияние температуры связано с усилением тепловых колебаний, диссоциацией групп, образующих внутри и межмолекулярные ассоциативные связи, с изменением эффективной плотности контактов (доли групп, включенных в ассоциации), расширением набора доступных конформаций полимерного клубка. Эти причины в совокупности приводят к формированию сетки флуктуационных зацеплений. Энергия активации течения определяется как минимальная энергия, необходимая для преодоления энергетического барьера – разрушения сетки зацеплений и возникновения элементарного потока. Энергия активации вязкого течения $\Delta E_a(\eta)$ рассчитана для водных растворов исходного альгината натрия и Альг-ДЭА в диапазоне концентрации 0.5–1.5 г/дл при нескольких скоростях сдвига (рис. 4). Дополнительные данные представлены в табл. П1а, П1б Приложения.

Как видно на рис. 4, зависимость энергии активации вязкого течения от скорости сдвига для растворов альгината натрия и Альг-ДЭА с концентрацией 0.5–1.2 г/дл имеет в большинстве случаев выраженный минимум в области скоростей сдвига ~ 50 с⁻¹. Наиболее высокие значения $\Delta E_a(\eta)$ отмечены для растворов альгината натрия и Альг-ДЭА с концентрацией 0.5 и 0.8 г/дл при наименьшей скорости сдвига.

Для раствора исходного альгината натрия с концентрацией 1.5 г/дл при низких скоростях сдвига наблюдается небольшой рост $\Delta E_a(\eta)$, затем, при скоростях сдвига от 52 до 200 с⁻¹ выход на плато с $\Delta E_a(\eta)$, близкой к 20 кДж/моль (рис. 4а, табл. П1а Приложения). Зависимости для растворов Альг-ДЭА с концентрацией 1.2 и 1.5 г/дл имеют схожий характер с минимальным значением $\Delta E_a(\eta)$ в области скоростей сдвига до 52 с⁻¹ (18.5 кДж/моль). Выше 52 с⁻¹ происходит рост $\Delta E_a(\eta)$ до 19 кДж/моль (рис. 4б). В целом полученные значения $\Delta E_a(\eta)$ сравнительно низки и близки к энергии активации вязкого течения растворителя.

Представленные данные указывают на существенную зависимость $\Delta E_a(\eta)$ от скорости сдвига в области низких концентраций как для исходного альгината, так и для модифицированного. Наблюдаемый в большинстве случаев минимум энергии активации в области 50 с⁻¹ хорошо коррелирует с переходом в этой области скоростей сдвига к “квазиньютоновскому” типу течения (рис. 2), при котором энергия, необходимая для разрушения части имеющихся ассоциативных связей и перестройки сетки зацеплений, минимальна. Значения $\Delta E_a(\eta)$ для растворов Альг-ДЭА в среднем ниже, чем для растворов исходного полимера той же концентрации. По-нашему мнению, это различие может быть объяснено заменой части карбоксильных групп амидными и аминными

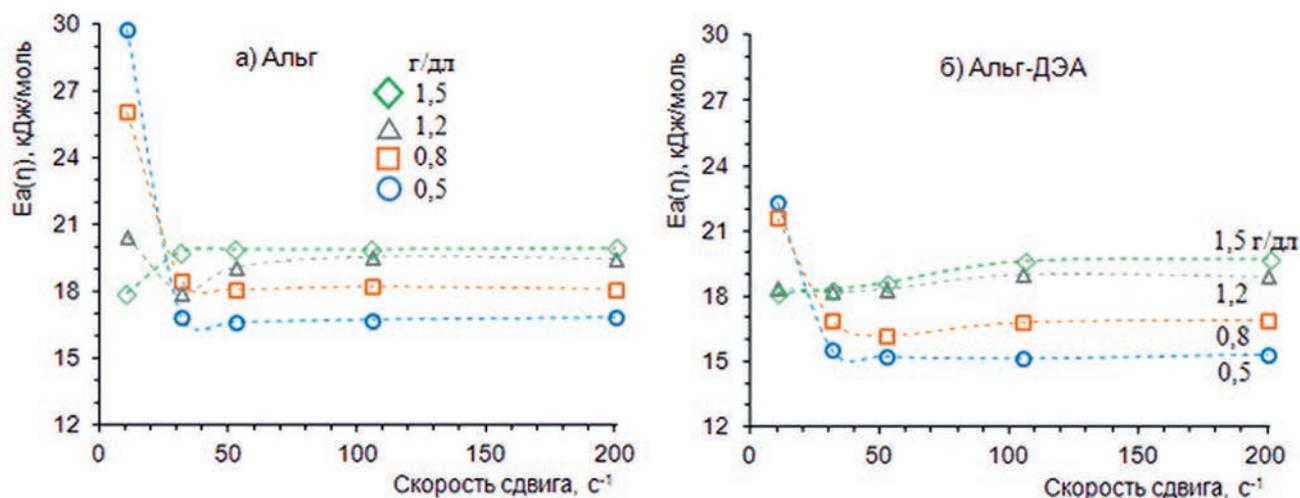


Рис. 4. Энергия активации вязкого течения водных растворов исходного альгината натрия (а) и Альг-ДЭА-0.14 (б) в зависимости от скорости сдвига при концентрации полимера 1.5 (1), 1.2 (2), 0.8 (3) и 0.5 г/дл (4).

функциями, что приводит к снижению абсолютной величины дзета-потенциала и как результат к уменьшению количества связей полимер-растворитель.

В рамках данного исследования невозможно однозначно интерпретировать увеличение $\Delta E_a(\eta)$ в области сравнительно сильных механических воздействий для более концентрированных растворов изучаемых полимеров. Если допустить, что в области слабых механических воздействий в наиболее концентрированных системах присутствуют ассоциативные связи, построенные как на взаимодействии полимера с молекулами растворителя, так и на образовании связей полимер-полимер, то повышение энергии активации в области скоростей сдвига выше 50 с^{-1} можно объяснить увеличением вклада связей полимер-полимер после первичного разрушения более слабых связей полимер-вода. Подобный вид зависимости наблюдается для исходного альгината и Альг-ДЭА только в растворах с наибольшей исследованной концентрацией (1.5 г/дл) и частично в растворах с концентрацией 1.2 г/дл. Следовательно, в растворах с более низкой концентрацией (0.5 и 0.8 г/дл) определяющим является вклад связей полимер-вода, а взаимодействие полимер-полимер менее значимо, вероятнее всего, из-за большого расстояния между одноименно заряженными молекулярными клубками.

Кислотно-основные свойства водных растворов альгината натрия и Альг-ДЭА

Расчет pK_a для водорастворимых полиэлектролитов имеет свои особенности, связанные с тем, что пограничный слой вблизи молекулы полимера может иметь рН, отличный от его значений в объеме раствора [32]. Это связано с тем,

что протоны сильнее удерживаются в пограничном слое молекулы полиэлектролита и делают рН данного слоя более кислым. Таким образом, потенциметрическое титрование, основанное на общем значении рН, не учитывает рН в пограничном слое. Как следствие, происходит завышение как рН исследуемой системы, так и величин pK_a , рассчитанных на основании экспериментальных данных [33]. Например, для альгината натрия значения pK_a , полученные на основании только данных потенциметрии, имеют разброс от 4.0 до 4.6 [34, 35]. Совмещение полученных результатов с данными лазерного доплеровского электрофореза, учитывающего заряд в пограничном слое, привело к более точной оценке $pK_a = 3.5 \pm 0.1$ [33, 36].

Также необходимо учитывать, что катион натрия не связан ковалентно с отрицательно заряженной карбоксильной группой альгината натрия, поэтому важным параметром, влияющим на кислотно-основные равновесия, будет ионная сила [37-39]. Ионы фонового электролита оказывают влияние на нейтрализацию депротонированных карбоксильных групп и способствуют переходу избытка протонов из приграничного слоя в объем раствора, что приводит к снижению рН системы [35]. Например, в 0.1 н растворе NaCl для альгината натрия значение pK_a составляет 3.5 [40].

Наличие в макромолекуле альгиновой кислоты большого количества карбоксильных групп, придающих ей отрицательный заряд, позволяет формировать полиэлектролитные комплексы с положительно заряженными макромолекулами или внутренние связи с аминогруппами остатков этилендиамина. Так, известны комплексы альгиновой кислоты и хитозана [41-43]. Формирование комплекса между альгинатом и хитозаном

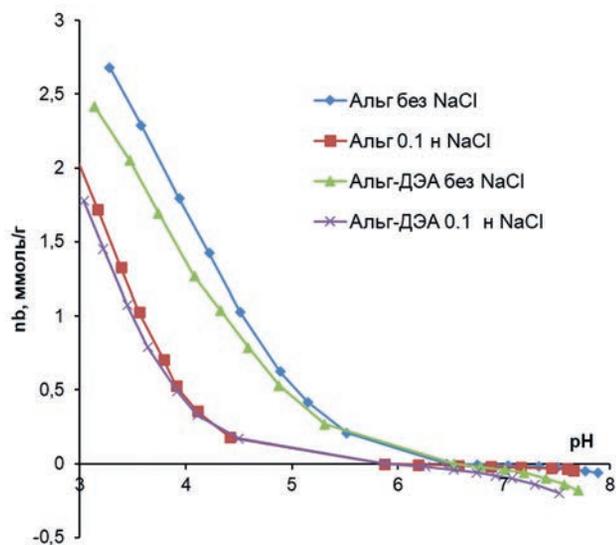


Рис. 5. Величина адсорбции протонов n_b в зависимости от pH для водных растворов альгината натрия (1, 2) и Альг-ДЭА-0.14 (3, 4). Концентрация фоновго электролита (NaCl) 0 (1, 3) и 0.1 н (2, 4).

подтверждается, в том числе, наличием кислотно-основных центров с pK_a 3.6 и 6.5, характерных для карбоксильных групп альгината и аминогрупп хитозана соответственно [44].

На рис. 5 представлена величина адсорбции протонов n_b в зависимости от pH и концентрации фоновго электролита для водных растворов альгината натрия и его производного Альг-ДЭА. Смещение кривых титрования альгината натрия и его амид/аминосодержащего производного Альг-ДЭА в более кислую область при увеличении концентрации фоновго электролита можно объяснить участием катионов фоновго электролита в нейтрализации депротонированных карбоксильных групп и переходом протонов из пограничного слоя молекулы полиэлектролита в объем раствора [35]. Этот эффект приводит к смещению pK_a равновесия $-\text{COOH} \leftrightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$ с 4.1 ± 0.15 (без фоновго электролита) до 3.50 ± 0.15 (при концентрации фоновго электролита 0.1 н).

Для производного Альг-ДЭА помимо равновесия, характерного для карбоксильных групп, имеется кислотно-основное равновесие депротонирования аминогруппы: $-\text{NH}_3^+ \leftrightarrow -\text{NH}_2 + \text{H}^+$. Для него при увеличении концентрации NaCl также наблюдается смещение pK_a с 7.10 ± 0.15 (без фоновго электролита) до 6.65 ± 0.15 (при концентрации NaCl 0.1 н) (рис. П1 Приложения). При повышении концентрации электролита происходит снижение pH для обоих полимеров. Это подтверждает представление о том, что ионы фоновго электролита способствуют переходу избытка протонов приграничного слоя в объем раствора.

Как было показано в предыдущем разделе, в водной среде молекулы исследуемых полиэлектролитов образуют устойчивые агрегаты за счет водородных связей между кислотно-основными центрами молекулы. На рис. 6 представлены дзета-потенциал и размер образующихся частиц в зависимости от pH для исходного альгината натрия и его производного Альг-ДЭА-0.14 в области разбавленных растворов.

Альгинат натрия относят к pH-чувствительным полимерам, степень диссоциации функциональных групп которых зависит от pH [45]. В случае альгината натрия (pK_{OH} (альгинат натрия) = 7.50 ± 0.15) при pH ≈ 6.5 небольшое количество OH-групп находится в диссоциированном состоянии: $-\text{OH} \leftrightarrow -\text{O}^- + \text{H}^+$. При уменьшении pH до 6.2 происходит подавление диссоциации при одновременном сжатии агрегата (рис. 6б) вследствие уменьшения электростатического отталкивания между молекулами и формирования более плотных структур. Резкое уменьшение размера при небольшом изменении pH позволяет предположить, что сжатие сопровождается формированием системы водородных связей между водородом групп OH и кислородом групп COO^- . Плотность отрицательных зарядов увеличивается, что способствует росту дзета-потенциала частицы (рис. 6а). При pH в интервале 6.2–6.0 происходит избыточная сорбция протонов, сопровождающаяся уменьшением отрицательного дзета-потенциала (рис. 6а) и полиэлектролитным набуханием частицы (рис. 6б) [46]. При pH < 6.0 равновесие $-\text{COO}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow -\text{COOH}$ начинает смещаться в сторону недиссоциированной формы карбоксильной группы. Это приводит к уменьшению дзета-потенциала и размера частицы (рис. 6а, 6б), так как ослабевают силы электростатического отталкивания между молекулами и формируются более плотные клубки.

В случае Альг-ДЭА в исследуемом интервале pH (3–8) диссоциация групп OH не выявлена. По всей видимости, введение аминогрупп приводит к смещению диссоциации групп OH в более щелочную область. Ранее [47] на примере полиэлектролитного комплекса альгината с хитозаном было установлено, что гелевые структуры образуются в результате электростатического взаимодействия между положительно заряженной аминогруппой и отрицательно заряженным карбоксилем альгината. Учитывая эти факторы, можно предположить, что с уменьшением pH в интервале 6.4–6.2 происходит избыточная сорбция протонов и полиэлектролитное набухание частицы, в которой макромолекулы за счет системы водородных связей формируют агрегаты, стабилизированные по типу полиэлектролитных комплексов. При pH 6.2, как и в случае альгината натрия, наблюдается резкое уменьшение размеров

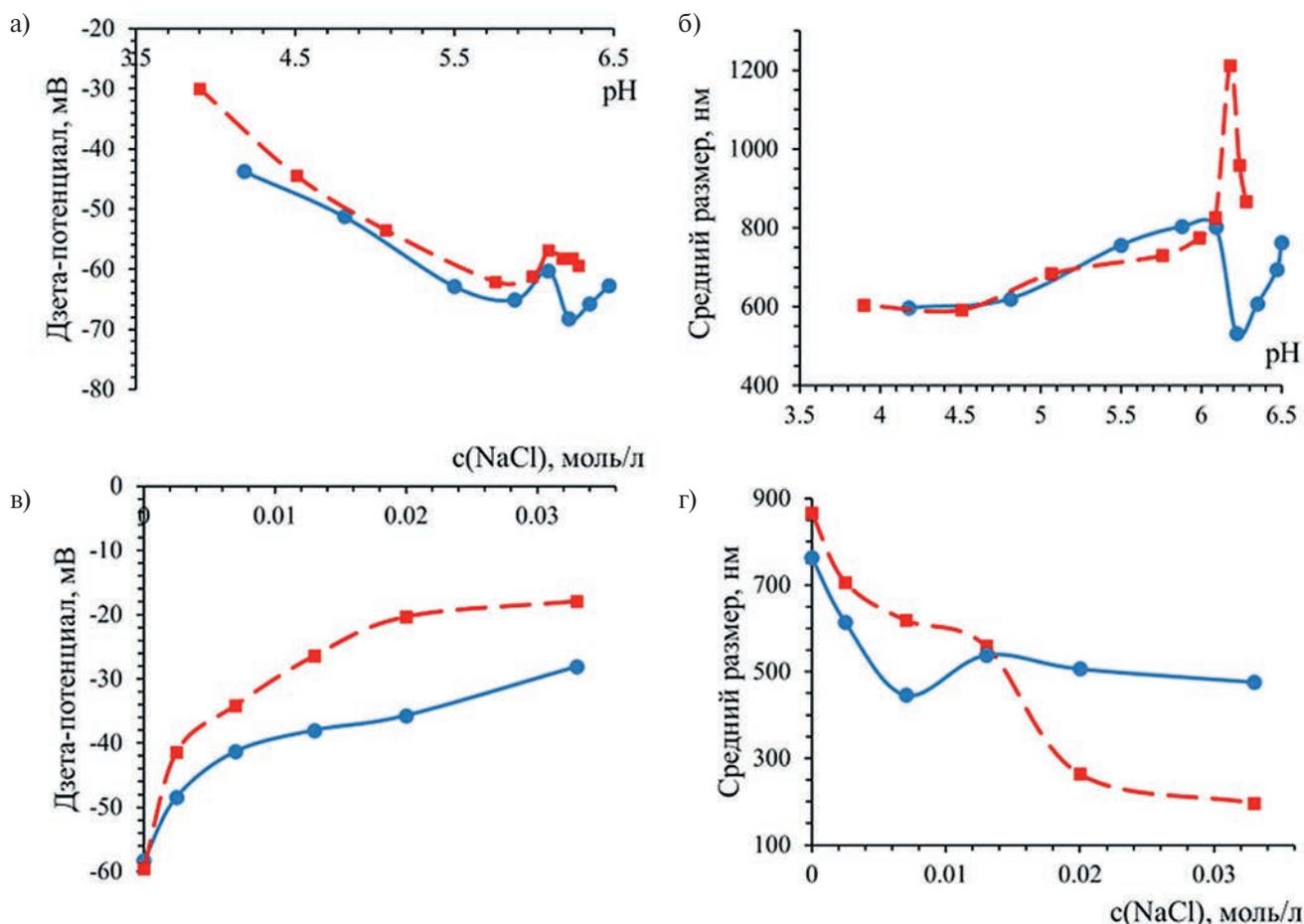


Рис. 6. Дзета-потенциал (а, в) и размер образующихся частиц (б, г) в зависимости от рН среды (а, б) и концентрации NaCl (в, г) для исходного альгината-натрия (сплошная линия) и Альг-ДЭА-0.14 (штриховая линия). $C = 0.18$ г/дл.

и дзета потенциала (рис. 6а, 6б), что можно связать с началом образования недиссоциированных форм и расходом избытка протонов в равновесии $-\text{COO}^- + \text{H}^{+\leftrightarrow} -\text{COOH}$. При $\text{pH} < 6.0$ ход зависимостей дзета-потенциала и гидродинамического диаметра для альгината натрия и Альг-ДЭА практически идентичен, что обусловлено постепенным увеличением количества недиссоциированных форм групп COOH с уменьшением pH .

При увеличении концентрации электролита (NaCl) в обоих случаях наблюдается снижение дзета-потенциала (рис. 6в), так как катионы участвуют в нейтрализации заряда депротонированных карбоксильных групп альгината натрия и Альг-ДЭА. Уменьшение электростатического отталкивания между макромолекулами при введении электролита сопровождается сжатием частиц, что приводит к уменьшению среднего гидродинамического диаметра (рис. 6г). Некоторый рост средних размеров при введении 13 mM NaCl в случае альгината натрия можно связать с понижением pH до ~ 6.0 (рис. П2 Приложения), при котором наблюдался резкий рост размеров (рис. 6б).

Гемосовместимость водных растворов альгината натрия и Альг-ДЭА

Для оценки гемосовместимости *in vitro* образцов Альг-ДЭА использовали тесты времени рекальцификации крови и АЧТВ и анализ влияния на агрегацию тромбоцитов [10, 11]. Добавление образцов альгината натрия, Альг-ДЭА-0.3 и Альг-ДЭА-0.1 к крови в концентрациях 0.033 мг/мл и 2.22 мг/мл не приводило к достоверному изменению времени свертывания в тесте времени рекальцификации крови ($162.64 \pm 9.29 - 191.69 \pm 14.87 \text{ с}$) по сравнению с контролем при добавлении буферного раствора ($179.63 \pm 5.75 \text{ с}$) (рис. 7). Инкубация крови с образцами альгината натрия, Альг-ДЭА-0.3 и Альг-ДЭА-0.1 в концентрациях 0.33 мг/мл и 1.665 мг/мл приводила к достоверному, но незначительному (в $1.14 - 1.20$ раза) увеличению времени свертывания крови по сравнению с контролем.

Время свертывания плазмы в тесте АЧТВ с повышением концентрации образцов исходного альгината натрия, Альг-ДЭА-0.3 и Альг-ДЭА-0.1 от 0.00456 до 0.0465 мг/мл достоверно

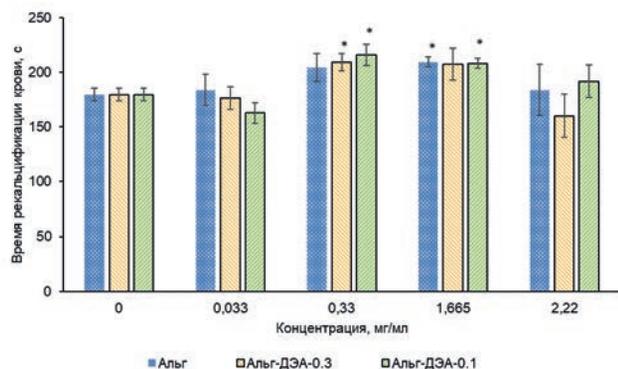


Рис. 7. Время рекальцификации крови при добавлении альгината натрия (1), Альг-ДЭА-0.3 (2) и Альг-ДЭА-0.1 (3). Число независимых измерений $n = 6$. Звездочки – достоверность различий ($p < 0.05$) с показателями в контроле с буфером (концентрация 0 мг/мл).

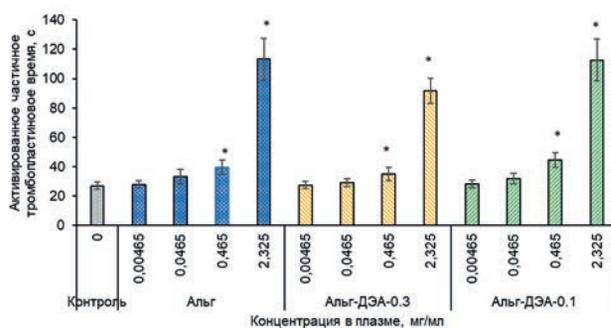


Рис. 8. Активированное частичное тромбопластиновое время при добавлении к плазме альгината натрия (1), Альг-ДЭА-0.3 (2) и Альг-ДЭА-0.1 (3). Число независимых измерений $n = 6$. Звездочки – достоверность различий ($p < 0.05$) с показателями в контроле.

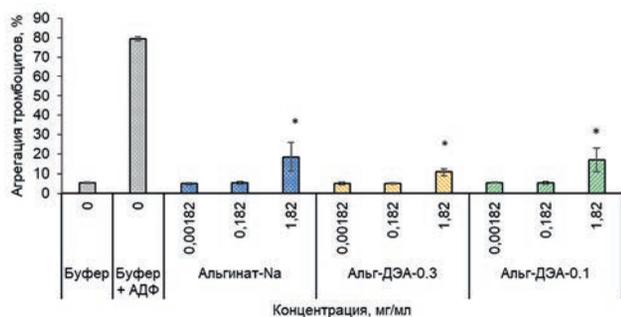


Рис. 9. Самостоятельное влияние альгинатов на агрегацию тромбоцитов. Число независимых измерений $n = 4$. Звездочки – достоверность различий ($p < 0.05$) с показателями в контроле с буфером.

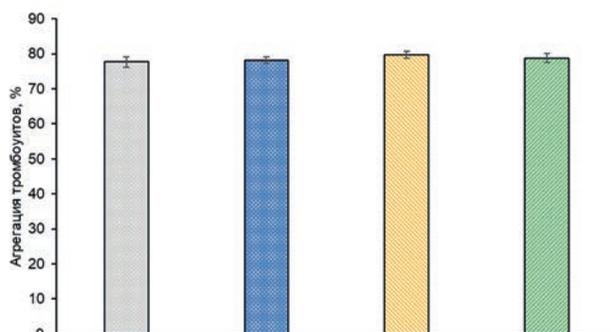


Рис. 10. Влияние альгинатов на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ. Число независимых измерений $n = 4-9$.

не возрастало ($27.46 \pm 2.41 - 33.17 \pm 5.08$ с) по сравнению с контролем (27.03 ± 2.33 с) (рис. 8). Достоверное увеличение времени свертывания в 3.4–4.2 раза по сравнению с контролем наблюдали при инкубации плазмы с образцами в концентрации 2.325 мг/мл. Достоверное, но незначительное по сравнению с контролем увеличение (в 1.3–1.7 раза) происходило при добавлении образцов к плазме в концентрации 0.465 мг/мл. Концентрации образцов альгината натрия, Альг-ДЭА-0.3 и Альг-ДЭА-0.1, при которых время свертывания в тесте АЧТВ увеличивалось в 2 раза (2АЧТВ) по сравнению с контролем, достигали 0.8117 ± 0.1084 , 1.1150 ± 0.0649 и 0.7667 ± 0.0694 мг/мл соответственно, однако антикоагулянтная активность образцов была незначительна (0.1844 ± 0.0223 , 0.1276 ± 0.0129 и 0.1887 ± 0.0179 ЕД/мг соответственно).

Образцы исходного и модифицированного альгинатов в концентрациях 0.00182 и 0.182 мг/мл самостоятельно не провоцировали агрегацию тромбоцитов человека. В концентрации 1.82 мг/мл

образцы альгината натрия, Альг-ДЭА-0.3 и Альг-ДЭА-0.1 достоверно увеличивали агрегацию тромбоцитов в 2–3 раза (18.38 ± 7.34 , 10.63 ± 1.56 и $16.88 \pm 6.07\%$ соответственно) по сравнению с контролем ($5.43 \pm 0.27\%$) (рис. 9). Исследованные образцы (0.182 мг/мл) не влияли на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 10).

В обзорной статье [48] авторы отмечали биосовместимость материалов и систем доставки лекарственных средств на основе альгината.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Альгиновая кислота модифицирована введением в состав полисахарида остатков этилендиамина. В результате получен водорастворимый полимер, анализ структуры которого подтверждает, что присоединение этилендиамина осуществляется с образованием амидной связи и появлением свободных первичных аминогрупп в соотношении 1:1, без процессов сшивания макромолекул

бифункциональным реагентом. Установлено значительное влияние модификации остатками этилендиамина на структурообразование в растворах уже сравнительно низкозамещённых ДЭА-производных альгиновой кислоты. Введение амид/аминных групп в структуру альгиновой кислоты приводит к переходу в область полуразбавленных растворов с зацеплениями при более низких концентрациях, чем у исходного полисахарида. Установлено, что энергия активации вязкого течения в растворах Альг-ДЭА ниже, чем в растворах исходной альгиновой кислоты, что связано с уменьшением количества связей макромолекула-растворитель. В интервале рН 6.5–6.0 для полуразбавленных растворов Альг-ДЭА и альгината натрия наблюдается противоположно направленное изменение размера агрегатов макромолекул, связанное с особенностями их строения и межмолекулярного взаимодействия. Увеличение размеров агрегатов Альг-ДЭА в указанном интервале рН открывает возможность использования данного полимера для создания систем адресного рН-зависимого воздействия на органы-мишени и доставки лекарств. В совокупности с отсутствием влияния *in vitro* на коагуляцию крови и плазмы человека и на агрегацию тромбоцитов человека этот тип производных альгиновой кислоты также

перспективен в качестве платформы для создания специальных материалов, контактирующих с кровью, систем контролируемого высвобождения лекарственных форм, вводимых перорально и внутривенно.

Работа выполнена в рамках Научно-исследовательской работы Института химии Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук” (Госзадание 122040600027-6). Определение гемосовместимости образцов проведено в рамках Научно-исследовательской работы Государственного задания Республики Коми № АААА-А21-121011290079-5.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Химия” Института химии Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук” г. Сыктывкар.

Авторы благодарят к.х.н. Ф.В. Витязева, Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, за определение молекулярной массы полисахаридов методом ГПХ.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1а. Энергия активации вязкого течения водных растворов альгината натрия $\Delta E_a(\eta)$ при разных скоростях сдвига

Концентрация полимера, г/дл	$\Delta E_a(\eta)$, кДж/моль				
	11 с ⁻¹	32 с ⁻¹	52 с ⁻¹	105 с ⁻¹	200 с ⁻¹
0.5	29.8±3.0	16.8±0.5	16.6±0.2	16.7±0.2	16.8±0.1
0.8	26.1±0.8	18.5±0.7	18.1±0.2	18.2±0.2	18.1±0.2
1.2	20.5±1.4	17.9±0.2	19.1±0.2	19.6±0.2	19.5±0.2
1.5	18.0±0.8	19.8±0.5	19.9±0.3	19.9±0.8	20.0±0.3

Таблица П1б. Энергия активации вязкого течения водных растворов Альг-ДЭА-0.14 $\Delta E_a(\eta)$ при разных скоростях сдвига

Концентрация полимера, г/дл	$\Delta E_a(\eta)$, кДж/моль				
	11 с ⁻¹	32 с ⁻¹	52 с ⁻¹	105 с ⁻¹	200 с ⁻¹
0.5	22.3±0.6	15.5±0.2	15.2±0.2	15.1±0.1	15.3±0.2
0.8	21.6±1.1	16.9±0.5	16.2±0.3	16.8±0.2	16.9±0.2
1.2	18.4±1.5	18.2±0.2	18.3±0.2	19.0±0.2	18.9±0.1
1.5	18.1±0.9	18.3±0.2	18.6±0.2	19.6±0.2	19.7±0.2

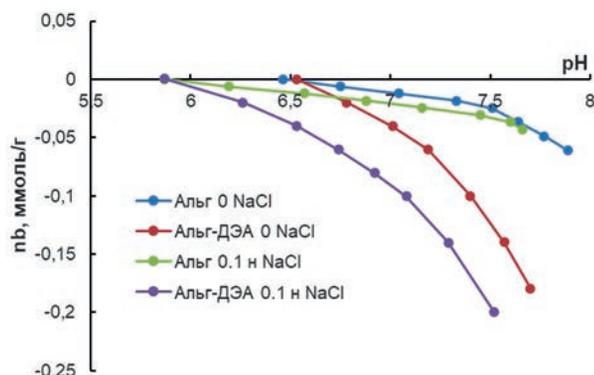


Рис. П1. Адсорбция протонов pb в зависимости от pH для водных растворов альгината натрия (1, 3) и его модифицированного производного Альг-ДЭА-0.14 (2, 4) при титровании щелочью. Концентрация фонового электролита (NaCl) 0 (1, 2) и 0.1 н (3, 4).

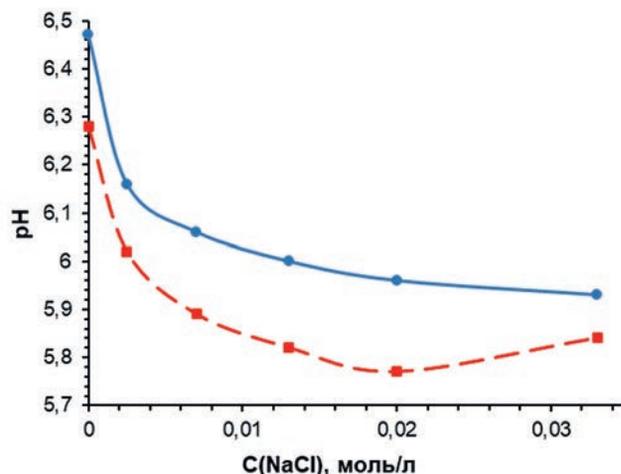


Рис. П2. Зависимость pH от концентрации фонового электролита для исходного альгината натрия (сплошная линия) и Альг-ДЭА (штриховая). C = 0.18 г/дл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Birajdar M.S., Joo H., Koh W.G., Park H. // *Biomater. Res.* 2021. V. 25. № 1. P. 1.
- Biswas M.C., Jony B., Nandy P.K., Chowdhury R.A., Halder S., Kumar D., Imam M.A. // *J. Polym. Environ.* 2022. V. 30. № 1. P. 51.
- Косарева Д.Н., Ананьева Е.П., Иозеп А.А. // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019. Т. 8. № 3. С. 30.
- Raus R.A., Nawawi W.M.F.W., Nasaruddin R.R. // *Asian J. Pharmaceut. Sci.* 2021. V. 16. № 3. P. 280.
- Usov A.I. // *Russ. Chem. Revs.* 1999. V. 68. № 11. P. 957.
- Fernando I.P.S., Kim D., Nah J.W., Jeon Y.J. // *Chem. Eng. J.* 2019. V. 355. P. 33.
- Pawar S.N., Edgar K.J. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 11. P. 3279.
- Park H., Lee H.J., An H., Lee K.Y. // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 162. P. 100.
- Biomaterials in Clinical Practice: Advances in Clinical Research and Medical Devices* / Ed. by F. Zivic, S. Affatato, M. Trajanovic, M. Schnabelrauch, N. Grujovic, K.L. Choy. Cham, Switzerland: Springer, 2018.
- Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine* / Ed. by W.R. Wagner, S.E Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M.J. Yaszemski. London: Elsevier/ Acad. Press, 2020.
- Advances in Biomaterials for Biomedical Applications* / Ed. by A. Tripathi, J.S. Melo. Singapore: Springer, 2017.
- Ryazanov M.A., Dudkin B.N. // *Rus. J. Phys. Chem. A.* 2009. V. 83. № 13. P. 231
- Gulliani G.L., Hyun B.H., Litten M.B. // *Am. J. Clin. Pathol.* 1976. V. 65. № 3. P. 390.
- Stuart R., Michel A. // *Can. Med. Association J.* 1971. V. 104. № 5. P. 385.
- Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М., Дрозд Н.Н., Свистунов А.А., Кучерявенко А.Ф., Малыгина Л.С., Науменко Л.В., Неведрова О.Е., Петрухина Г.Н., Алиев О.И., Плотникова Т.М. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.* Минздравсоцразвития России. М.: Гриф и К, 2012. Т. 1.
- Born G. // *Nature.* 1962. V. 194. № 4. P. 927.
- Larsen B., Salem D.M., Sallam M.A., Mishrikey M.M., Beltagy A.I. // *Carbohydr. Res.* 2003. V. 338. № 22. P. 2325.
- Davis T.A., Llanes F., Volesky B., Diaz-Pulido G., McCook L., Mucci A. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2003. V. 110. № 2. P. 75.
- Belattmania Z., Kaidi S., El Atouani S., Katif C., Bentiss F., Jama C., Reani A., Sabour B., Vasconcelos V. // *Molecules.* 2020. V. 25. № 18. P.4335.
- Papageorgiou S.K., Kouvelos E.P., Favvas E.P., Sapidis A., Romanos G.E., Katsaros F. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. P. 469.
- Leal D., Matsuhira B., Rossi M., Caruso F. // *Carbohydr. Res.* 2008. V. 343. № 2. P. 308.
- Chandía N.P., Matsuhira B., Mejías E., Moenne A. // *J. Appl. Phycol.* 2004. V. 16. P. 127.

23. *Silverstein R.M., Clayton Bassier G., Morrill T.C.* // Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York: Wiley, 1991.
24. *Lapasin R., Prici S.* Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications. New York: Springer, 1995.
25. *Dobrynin A.V., Rubinshtein M., Colby R.H.* // Macromolecules. 1995. V. 28. № 6. P. 1859.
26. *Litmanovich E.A., Orleneva A.P., Korolev B.A., Kasaikin V.A., Kulichikhin V.G.* // Polymer Science A. 2000. V.42. № 6. P. 689.
27. *Rabin Y., Cohen J., Priel Z.* // J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed. 1988. V. 26. №. 9. P. 397.
28. *Dobrynin A. V., Rubinstein M.* // Prog. Polym. Sci. 2005. V. 30. №. 11. C. 1049.
29. *Roger S., Sang Y.Y.C., Bee A., Perzynski R., Di Meglio J. M., Ponton A.* // Eur. Phys. J. E. 2015. V. 38. P. 1.
30. *Colby R.* // Rheol. Acta. 2010. V. 49. P. 425.
31. *Ray J., Manning G.S.* // Macromolecules. 1997. V. 30. № 19. P. 5739.
32. *Rey-Castro C., Herrero R., De Vicente M.E.S.* // J. Electroanal. Chem. 2004. V. 564. P. 223.
33. *Barbosa J.A.C., Abdelsadig M.S.E., Conway B.R., Merchant H.A.* // Int. J. Pharm. X. 2019. V. 1. P. 100024.
34. *Shinde U.A., Nagarsenker M.S.* // Indian J. Pharm. Sci. 2009. V. 71. №. 3. P. 313.
35. *Vleugels L.F.W., Ricois S., Voets I.K., Tuinier R.* // Food Hydrocolloids. 2018. V. 81. P. 273.
36. *Chuang J.J., Huang Y.Y., Lo S.H., Hsu T.F., Huang W.Y., Huang S.L., Lin Y.S.* // Int. J. Polym. Sci. 2017. V. 2017. P. 1.
37. *Schiewer S., Volesky B.* // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. №. 9. P. 2478.
38. *Fukushima M., Tatsumi K., Wada S.* // Anal. Sci. 1999. V. 15. №. 11. P. 1153.
39. *De Vasconcelos C.L., Pereira M.R., Fonseca J.L.C.* // J. Dispersion Sci. Technol. 2005. V. 26. № 1. P. 59.
40. *Haug A.* // Acta Chem. Scand. 1961. V. 15. №. 4. P. 950.
41. *Gåserød O., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.* // Biomaterials. 1998. V. 19. № 20. P. 1815.
42. *dos Santos de Macedo B., de Almeida T., da Costa Cruz R., Netto A.D.P., da Silva L., Berret J.F., Vitorazi L.* // Langmuir. 2020. V. 36. № 10. P. 2510.
43. *Kulig D., Zimoch-Korzycka A., Jarmoluk A., Marycz K.* // Polymers. 2016. V. 8. № 5. P. 167.
44. *Simsek-Ege F.A., Bond G.M., Stringer J.* // J. Appl. Polym. Sci. 2003. V. 88. № 2. P. 346.
45. *Patel D.K., Jung E., Priya S., Won S.Y., Han S.S.* // Carbohydr. Polym. 2023. P. 121408.
46. *Conzatti G., Faucon D., Castel M., Ayadi F., Cavallie S., Tourrette A.* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 172. P. 142.
47. *Baysal K., Aroguz A.Z., Adiguzel Z., Baysal B.M.* // Int. J. Biol. Macromol. 2013. V. 59. P. 342.
48. *Sharma A., Kaur I., Dheer D., Nagpal M., Kumar P., Venkatesh D.N., Puri V., Singh I.* // Carbohydr. Polym. 2023. V. 15. № 308. P. 120448.

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СТРУКТУРУ И СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ПЛЁНОК НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЭТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

© 2024 г. С. А. Вшивков*, Е. В. Русинова, А. Г. Галяс

Уральский федеральный университет 620000 Екатеринбург, пр. Ленина, 51

*e-mail: sergey.vshivkov@urfu.ru

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

После доработки 13.06.2024 г.

Принята к публикации 09.08.2024 г.

Методами поляризованной и сканирующей электронной микроскопии, сорбции паров воды изучена структура и свойства плёночных композиционных наноматериалов на основе гидроксиэтилцеллюлозы и углеродных нанотрубок, полученных в магнитном поле и вне поля. Плёнки являются анизотропными, что обусловлено образованием жидкокристаллической фазы при испарении растворителя из раствора. Наложение магнитного поля приводит к ориентации макромолекул и углеродных нанотрубок в пленках, что способствует уплотнению структуры плёнок и уменьшению их способности сорбировать пары воды. Рассчитаны энергии Гиббса взаимодействия с водой плёнок гидроксиэтилцеллюлоза/углеродные нанотрубки, полученных в магнитном поле и вне поля. Для плёнок, полученных в магнитном поле, обнаружено уменьшение отрицательных значений энергий Гиббса, что свидетельствует об ухудшении их взаимодействия с водой. С введением углеродных нанотрубок в гидроксиэтилцеллюлозу этот эффект проявляется в большей степени.

DOI: 10.31857/S2308112024030052, EDN: LWUIOL

ВВЕДЕНИЕ

Современную эпоху характеризуют как век полимерных композиционных материалов [1–3]. Одной из наиболее значимых областей исследований является изучение наноматериалов на основе полимеров и углеродных нанотрубок и их применение. Полимерные матрицы по сравнению с металлическими имеют ряд преимуществ, таких как невысокая плотность, низкая стоимость, хорошая обрабатываемость, химическая стойкость и низкая электропроводность. Углеродные нанотрубки обладают электро- и теплопроводностью, механической прочностью [4–7], а также способностью ориентироваться в магнитном поле [8, 9]. Перспективной полимерной матрицей для получения композитов с углеродными нанотрубками являются эфиры целлюлозы, которые широко применяются в различных отраслях промышленности [10]. Эфиры целлюлозы могут образовывать лиотропные жидкокристаллические системы вследствие анизодиаметричной формы макромолекул, которые способны ориентироваться в растворах под действием магнитного поля [11–14]. Данные о влиянии наполнителей на структуру и свойства полимерных композитов приводятся в работах [15, 16]. Однако сведения о влиянии

углеродных нанотрубок на структуру и свойства эфиров целлюлозы отсутствуют. Варьирование содержания углеродных нанотрубок в композитах и воздействие магнитного поля может позволить направленно изменять физико-химические свойства получаемых плёнок.

Цель настоящей работы – изучение влияния магнитного поля на структуру и сорбционные свойства плёнок на основе гидроксиэтилцеллюлозы и углеродных нанотрубок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследовали гидроксиэтилцеллюлозу (ГЭЦ) марки Natrosol 250 LR (“Aqualon”, США) с молекулярной массой $M_n = 8.4 \times 10^4$ и степенью замещения 2.5. Наполнителем служили углеродные нанотрубки (УНТ) с диаметром от 7 до 15 нанометров (рис. 1), предоставленные Институтом катализа им. Г. К. Борескова (г. Новосибирск). В качестве растворителей использовали дистиллированную воду и этанол. Чистоту растворителей оценивали по показателям преломления с помощью рефрактометра “Atago NAR-2T LO”. Растворы ГЭЦ готовили в смеси вода : этанол (80:20 мас. ч.) при комнатной температуре

с последующим фильтрованием через стеклянный фильтр ПОР 100 с размерами пор 40–100 мкм. Для стабилизации ГЭЦ использовали бензойную кислоту в соотношении 0.4 мас. ч на 100 мас. ч полимера.

Для приготовления суспензий навески УНТ помещали в раствор ГЭЦ, затем перемешивали и диспергировали при комнатной температуре ультразвуком в течение 1 мин с помощью ультразвукового гомогенизатора “Cole-Parmer CPX 750”. Об устойчивости суспензии свидетельствовал тот факт, что при ее выдерживании в течение 3 ч нанотрубки не выпадали в осадок. Плёнки получали методом полива растворов полимеров на подложку при комнатной температуре и атмосферном давлении в отсутствие магнитного поля и в поле с напряжённостью 3.7 кЭ с последующей сушкой в вакуумном шкафу при остаточном давлении 100–130 мм рт. ст. до постоянной массы. Морфологию плёнок исследовали с помощью поляризационного микроскопа “Olympus VX-51”.

Для исследований методом сканирующей электронной микроскопии плёнки помещали в сосуд с жидким азотом и выдерживали в течение 1–2 мин. После замораживания плёнки раскалывали и крепили на держателе образцов клейкой углеродной лентой. Для минимизации эффекта зарядки поверхности образца проводили напыление проводящего слоя хрома толщиной 10 нм методом магнетронного распыления. Визуализацию морфологии поверхности среза пленки проводили с разрешением 1024×768 точек при ускоряющем напряжении в диапазоне от 3 до 20 кВ и апертуре 30 мкм, что позволяло получить максимальное соотношение сигнал/шум и минимизировать повреждение образца электронным пучком. Изображения получены при детектировании сигнала вторичных электронов.

Изотермическую интервальную равновесную сорбцию паров воды изучали с использованием автоматического анализатора “ASAP 2020” фирмы “Micromeritics”. Изменение удельных химических потенциалов паров воды $\Delta\mu_1$ рассчитывали на основании экспериментально полученных изотерм сорбции по уравнению [17]

$$\Delta\mu_1 = \frac{RT}{M_1} \ln \frac{P}{P_s}, \quad (1)$$

где M_1 – молекулярная масса воды, $\frac{P}{P_s}$ – относительное давление (P_s – упругость насыщенного водяного пара). Изменения удельного химического потенциала полимера $\Delta\mu_2$ определяли по уравнению Гиббса–Дюгема [17]

$$\Delta\mu_2 = - \int_{-\infty}^{\Delta\mu_1} \frac{\omega_1}{\omega_2} \delta\Delta\mu_1, \quad (2)$$

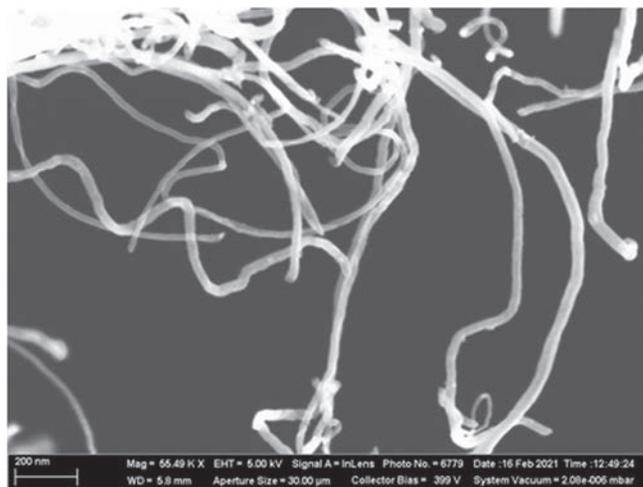


Рис. 1. Микрофотография УНТ, полученная методом просвечивающей электронной микроскопии. Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

в котором ω_1 , ω_2 – массовая доля растворителя и полимера вместе с наполнителем соответственно.

Изменения энергии Гиббса набухания рассчитывали следующим образом:

$$\Delta g^m = \omega_1 \Delta\mu_1 + \omega_2 \Delta\mu_2. \quad (3)$$

Кинетику набухания плёнок в парах воды изучали в изобарно-изотермических условиях в стеклянном цилиндрическом сосуде. Рабочей частью установки является разъёмный цилиндрический сосуд, к головке которого подвешиваются спиральные весы Мак-Бена. В работе использовали предварительно прокаленную металлическую спираль с чувствительностью $\gamma = 0.3572$ мм/мг при температуре 298 ± 0.2 К. На нижний конец спирали помещали точно взвешенный образец плёнки. На дно сосуда помещали 20 мл воды для создания насыщенных паров воды. Изменение длины спирали фиксировали с помощью катетометра КМ-8, позволяющего делать замеры с точностью до 0.01 мм. Набухание плёнок производили в насыщенных парах воды в течение 3 ч. По полученным данным строили кинетические кривые набухания плёнок в координатах $\alpha = f(t)$, где t – время (мин), α – степень набухания, которую рассчитывали по формуле

$$\alpha = \frac{(m - m_0)}{m_0}, \quad (4)$$

(m и m_0 – текущая и исходная масса плёнки соответственно).

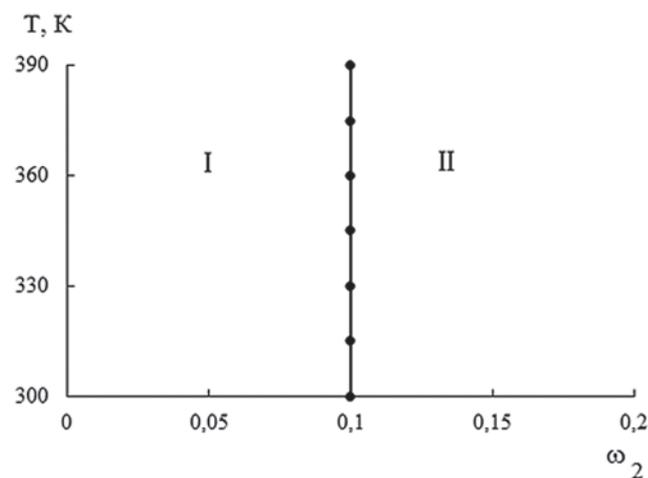


Рис. 2. Фазовая диаграмма системы ГЭЦ–вода/этанол (80/20 мас.ч.) I – область изотропных растворов, II – область анизотропных растворов. ω_2 – массовая доля полимера.

При определении типа фазового перехода в растворах применяли поляризационно-фотоэлектрическую установку [18]. В зазор между скрещенными поляроидами (поляризатором и анализатором) помещали запаянную ампулу с прозрачным раствором полимера. Через поляроиды перпендикулярно ампуле с раствором (толщина слоя раствора ~ 5 мм) пропускали луч света от гелий-неонового лазера. Если раствор был изотропным, интенсивность прошедшего через скрещенные поляроиды света равнялась нулю. Если раствор при повышении концентрации полимера становился анизотропным, наблюдали увеличение интенсивности светопропускания, фиксируемое с помощью фотосопротивления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведена пограничная кривая, разделяющая изотропные анизотропные растворы системы ГЭЦ–вода/этанол (80:20 мас. %). Видно, что в смеси вода/этанол при концентрации ГЭЦ, равной 10%, происходит образование ЖК-фазы.

Во время испарения растворителя из раствора увеличивается концентрация ГЭЦ. При достижении концентрации ГЭЦ, равной 10%, раствор переходит из изотропного состояния в анизотропное. Образованная в растворе жидкокристаллическая фаза сохраняется в плёнке после испарения растворителя, что подтверждается микрофотографиями пленок в поляризованном свете. На рис. 3 представлены микрофотографии плёнок ГЭЦ, полученных в магнитном поле и вне поля. Светлые, окрашенные области указывают на наличие в пленках анизотропных частиц. На микрофотографии плёнки, полученной в магнитном поле, наблюдается направление преимущественной ориентации анизотропных частиц, что свидетельствует о влиянии магнитного поля на структуру пленок.

Микрофотография плёнки ГЭЦ/УНТ, полученной вне магнитного поля приведена на рис. 4а. На микрофотографии имеются тёмные и светлые, окрашенные области. Темные области соответствуют агломератам углеродных трубок (указаны стрелками), а светлые – анизотропным надмолекулярным частицам полимера.

Результаты исследований плёнок ГЭЦ с содержанием УНТ 3% методом сканирующей электронной микроскопии представлены на рис. 4б. На поверхности плёнки белые точки относятся к агрегатам УНТ. Наблюдаются области

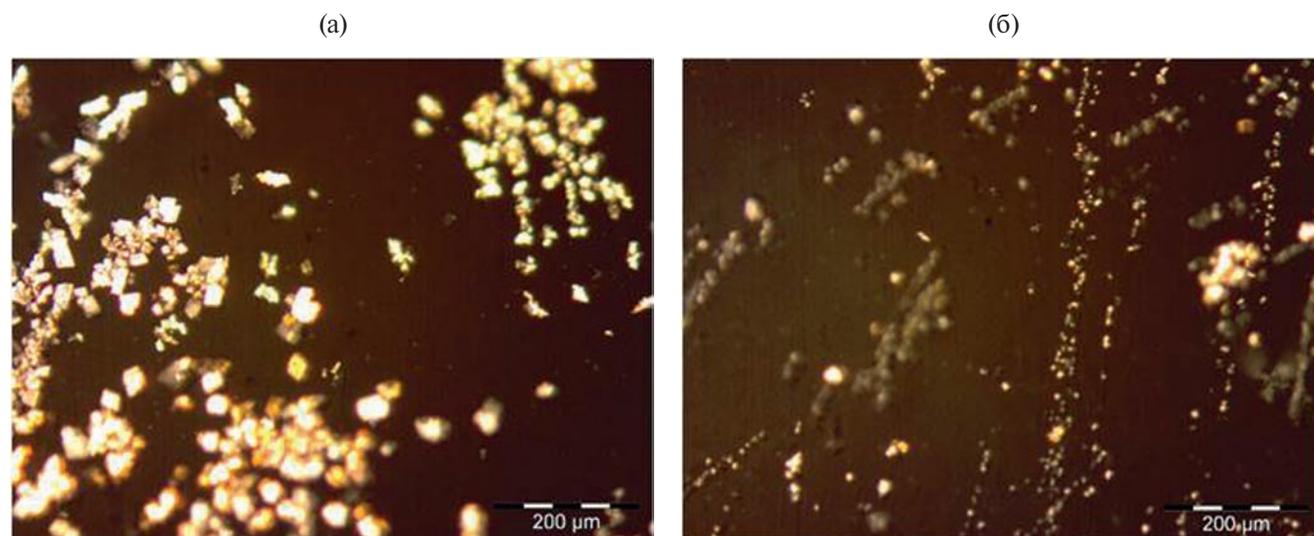


Рис. 3. Микрофотографии плёнок ГЭЦ, полученных вне поля (а) и в поле (б). Поляроиды скрещены.

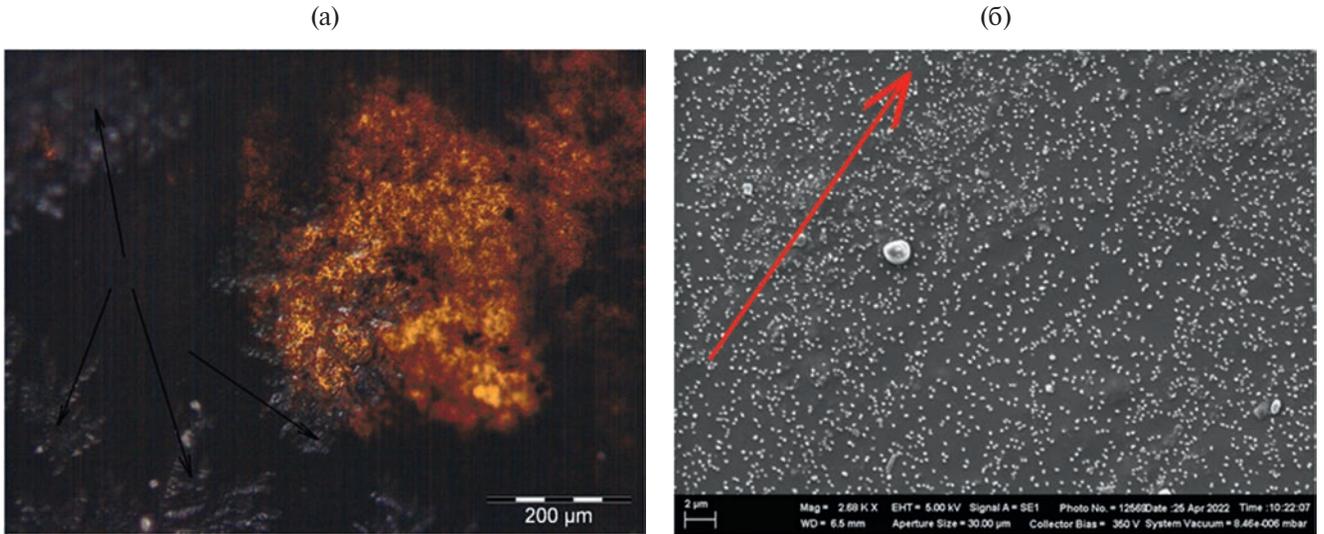


Рис. 4. Микрофотография плёнки ГЭЦ с содержанием УНТ 3 мас. %, полученной вне (а) и в магнитном поле (б). Поляроиды скрещены.

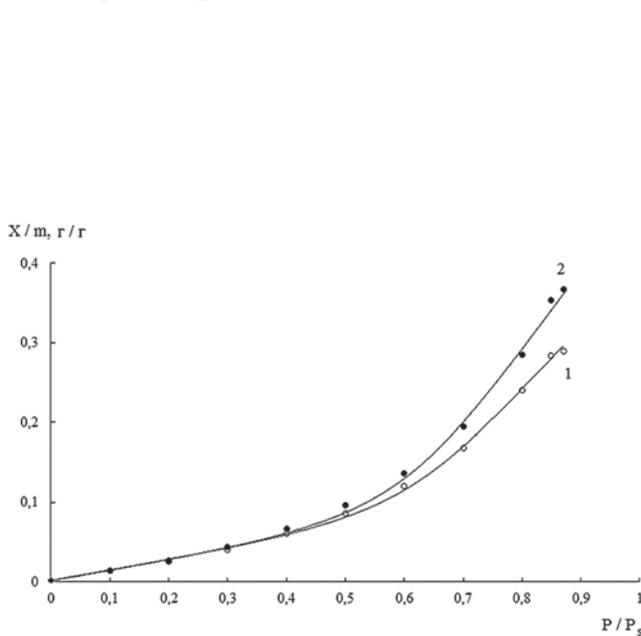


Рис. 5. Изотермы сорбции паров воды плёнками ГЭЦ, полученными в магнитном поле (1) и вне поля (2). X – равновесная масса воды, поглощенной навеской полимера (m).

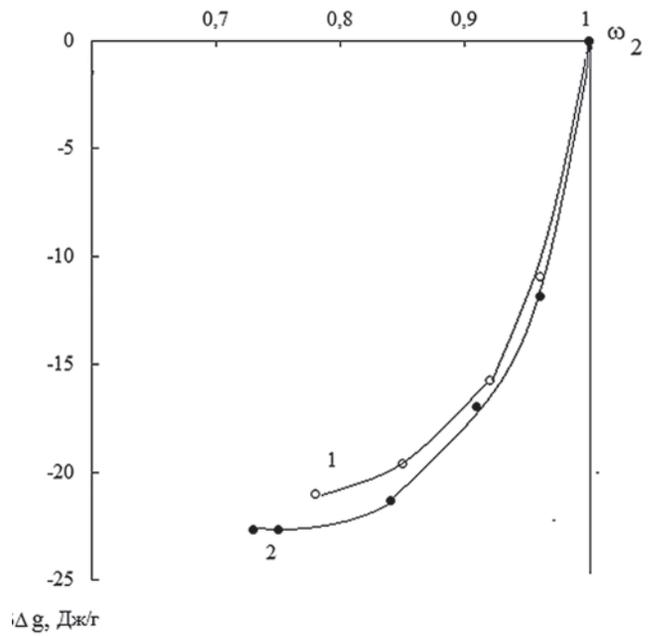


Рис. 6. Концентрационные зависимости энергии Гиббса взаимодействия с водой плёнок ГЭЦ, полученных в поле (1) и вне поля (2).

преимущественной ориентации этих агрегатов (стрелка показывает направление ориентации).

На рис. 5 показаны изотермы сорбции паров воды плёнками ГЭЦ, полученными в магнитном поле и вне поля. Из рисунка следует, что плёнки, полученные в магнитном поле, сорбируют меньше воды, чем плёнки, полученные вне поля. Это обусловлено процессами ориентации макромолекул в поле, приводящей к уплотнению структуры пленок.

Концентрационные зависимости энергии Гиббса взаимодействия с водой плёнок ГЭЦ, полу-

ченных в поле и вне поля приведены на рис. 6. Плёнки, полученные в магнитном поле, хуже взаимодействуют с водой. Это проявляется в уменьшении отрицательных значений Δg и обусловлено ориентацией макромолекул ГЭЦ в магнитном поле, приводящей к усилению межцепного взаимодействия.

На рис. 7 представлены изотермы сорбции паров воды плёнками ГЭЦ/УНТ, полученными вне магнитного поля и в поле. Видно, что плёнки ГЭЦ с УНТ сорбируют меньше воды, чем плёнки

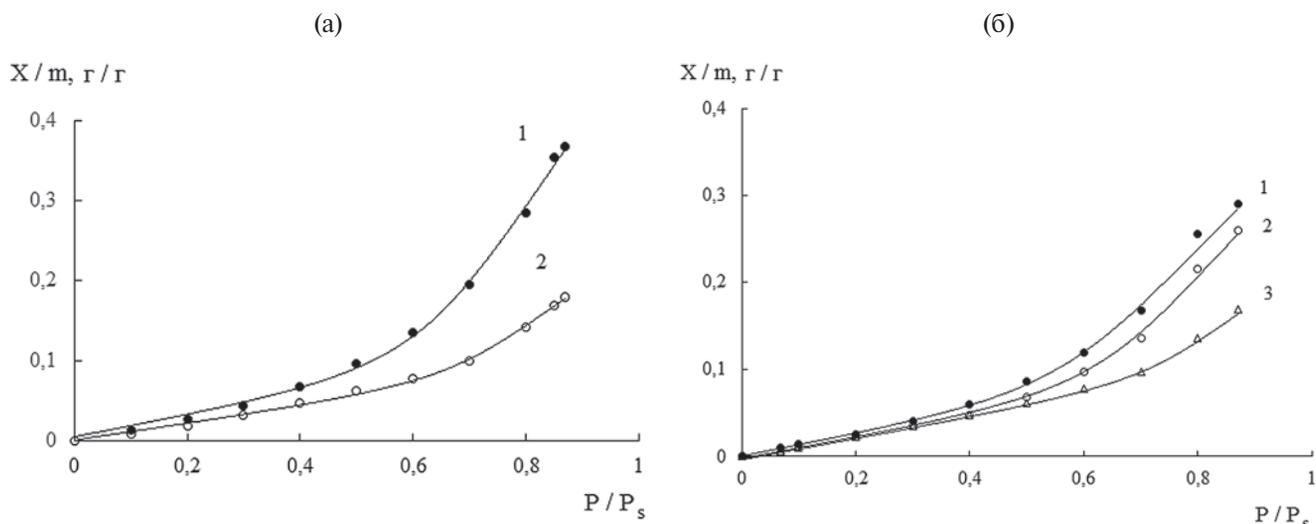


Рис. 7. Изотермы сорбции паров воды плёнками ГЭЦ/УНТ, полученными вне магнитного поля (а) и в поле (б). Содержание УНТ 0 (1), 5% (2) (а) и 0 (1), 3 (2), 5% (3) (б).

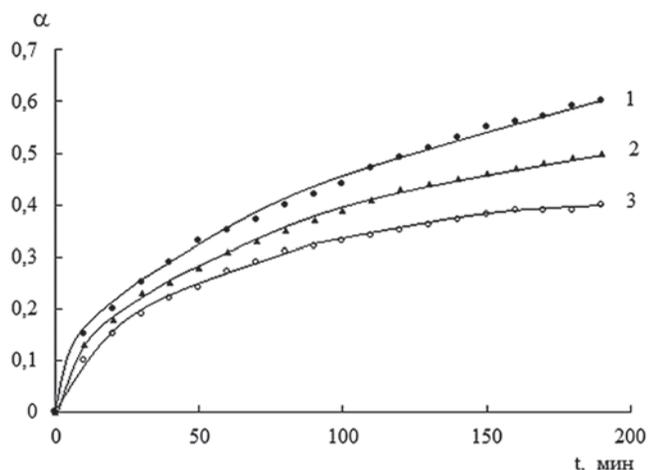


Рис. 8. Кинетические кривые набухания в парах воды пленок ГЭЦ/УНТ, полученных как в магнитном поле, так и вне поля. Содержание УНТ 0 (1) и 5% (2, 3). $H = 0$ (1, 2) и 3.7 кЭ (3).

ГЭЦ без углеродных нанотрубок, поскольку неполярные углеродные нанотрубки плохо взаимодействуют с полярными молекулами воды.

Кинетические кривые набухания в парах воды пленок ГЭЦ/УНТ, полученных как в магнитном поле, так и вне поля приведены на рис. 8. Наблюдается та же зависимость, что и у изотерм сорбции. Чем больше содержание УНТ, тем хуже взаимодействие с водой и меньше степень набухания. Из рис. 8 также следует, что пленки, полученные в магнитном поле, набухают в парах воды в меньшей степени, чем пленка, полученная вне поля. Это обусловлено ориентацией макромолекул ГЭЦ и УНТ в магнитном поле, способствующей уплотнению структуры.

На рис. 9 представлены концентрационные зависимости энергии Гиббса взаимодействия пленок ГЭЦ/УНТ с водой. Видно, что энергия Гиббса взаимодействия пленок ГЭЦ/УНТ с водой отрицательна во всей исследованной области составов, что свидетельствует о самопроизвольности протекания процесса сорбции и совместимости воды с полимерной композицией. Введение углеродных нанотрубок в ГЭЦ приводит к уменьшению отрицательных значений энергий Гиббса, т.е. наблюдается ухудшение взаимодействия паров воды с полимерной композицией. Это обусловлено как уплотнением структуры пленок, так и тем, что УНТ плохо сорбируют пары воды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом поляризационной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии изучено фазовое состояние и структура пленок ГЭЦ/УНТ, полученных в магнитном поле и вне поля. Пленки являются анизотропными, что связано с образованием жидкокристаллической фазы при испарении растворителя из раствора. Наложение магнитного поля приводит к ориентации макромолекул и УНТ в пленках.

Методом статической сорбции изучено набухание пленок ГЭЦ/УНТ, полученных как в магнитном поле, так и вне поля. Рассчитаны средние удельные энергии Гиббса Δg взаимодействия пленок ГЭЦ/УНТ с водой. Пленки, полученные в магнитном поле, хуже взаимодействуют с водой. Это проявляется в уменьшении отрицательных значений Δg и обусловлено ориентацией макромолекул ГЭЦ в магнитном поле, приводящей к уменьшению межцепного взаимодействия.

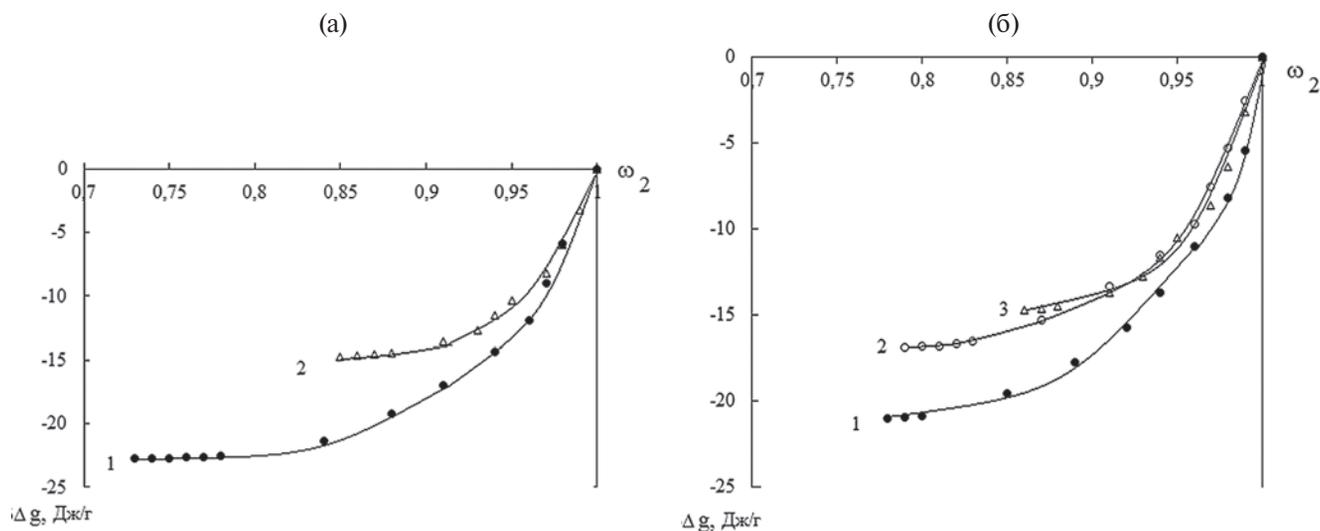


Рис. 9. Концентрационные зависимости энергии Гиббса взаимодействия с водой плёнок ГЭЦ/УНТ, полученных вне магнитного поля (а) и в магнитном поле (б). Содержание УНТ 0 (1), 5% (2) (а) и 0 (1), 3 (2), 5% (3) (б).

Введение УНТ в ГЭЦ приводит к уменьшению отрицательных значений Δg , что свидетельствует об ухудшении взаимодействия воды с полимерной композицией. Такое наблюдение обусловлено уплотнением структуры полимера и с невозможностью УНТ сорбировать пары воды. Аналогичные данные обнаружены и при изучении кинетики набухания пленок ГЭЦ/УНТ в парах воды.

Авторы выражают благодарность Л.В. Адамовой и Н.Е. Щербакову за участие в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vshivkov S.A., Tyukova I.S., Rusinova E.V.* Полимерные композиционные материалы. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2022.
2. Полимерные композиционные материалы. Свойства. Структура. Технологии. / Под ред. А.А. Берлина. СПб.: Профессия, 2009.
3. *Баженов С.Л., Берлин А.А., Кульков А.А., Ошмян В.Г.* Полимерные композиционные материалы. Прочность и технологии. М.: Изд-во Интеллект, 2009.
4. *Li Q., Liu C., Wang X., Fan S.* // *Nanotechnology*. 2009. V. 20. № 14. P.145702.
5. *Berber S., Kwon Y.-K., Tománek D.* // *Phys. Rev. Lett.* 2000. V. 84. № 20. P. 4613.
6. *Елецкий А. В.* // *Успехи физ. наук*. 2007. Т. 177. № 3. С. 233.
7. *A.I. Helal, S.I. Elkalashy, S.A. Vshivkov, T.S. Soliman, M.F. Zaki.* // *Physica Scripta*. 2021. V. 96. № 8. 085804.
8. *Макарова Т.Л.* // *Физика и техника полупроводников*. 2004. Т. 36. № 6. С. 641.
9. *Fujiwara M., Oki E., Hamada M., Tanimoto Y., Shimomura Y.* // *J. Phys. Chem. A*. 2001. V. 105. № 15. P. 3746.
10. *Кряжев В.Н., Широков В.А.* // *Химия растит. сырья*. 2005. № 3. С. 7.
11. *Куличихин В.Г., Голова Л.К.* // *Химия древесины*. 1985. №3. С. 9.
12. *Папков С.П., Куличихин В.Г.* Жидкокристаллическое состояние полимеров. М.: Химия, 1977.
13. *Vshivkov S.A.* Phase Transitions and Structure of Polymer Systems in External Fields. Newcastle. UK: Cambridge Scholars Publ. 2019.
14. *Vshivkov S.A., Rusinova E.V., Galyas A.G.* // *Polymer Science A*. 2012. V. 54. № 11. P. 827.
15. *Лунатов Ю.С.* Физико-химические основы наполнения полимеров. М.: Химия, 1977.
16. *Функциональные наполнители для пластмасс.* / Под ред. Марино Ксантос. М.: Научные основы и технологии, 2010.
17. *Тагер А. А.* Физико- химия полимеров. М.: Научный мир, 2007.
18. *Vshivkov S.A., Rusinova E.V., Kudrevatykh N.V., Galyas A.G., Alekseeva M.S., Kuznetsov D.K.* // *Polymer Science A*. 2006. V. 48. № 10. P. 1115.

ПРИМЕНЕНИЕ ГУАНИДИНСОДЕРЖАЩИХ ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПЛАСТИКАТОВ ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ОТ ФОТО- И БИОДЕСТРУКЦИИ

© 2024 г. В. А. Герасин^{1,*}, М. В. Журина², В. В. Куренков¹, Д. И. Менделеев¹

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский пр., 29

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского 117312 Москва, пр. 60-летия Октября, 7, корп. 2

*e-mail: gerasin@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 10.07.2024 г.

После доработки 13.08.2024 г.

Принята к публикации 30.08.2024 г.

Рассмотрена возможность использования органоминеральных комплексов, получаемых в результате адсорбции высокомолекулярных биоцидов – полигуанидинов – на поверхности монтмориллонита, для защиты композитов на основе пластифицированного поливинилхлорида от фотоокислительной деструкции и биообрастания. По данным УФ-спектроскопии и результатам измерений характеристической вязкости растворов полимера установлено, что введение органоминеральных комплексов в материал способствует уменьшению глубины фотоокислительной деструкции материала в условиях жесткого УФ-облучения. Применение органоминеральных комплексов эффективно подавляет обрастание композитов биопленками микромицета *Yarrowia lipolytica* 367-3. Физико-механические характеристики композитов, содержащих органоминеральные добавки, сохраняются на высоком уровне после термического старения (в соответствии с технической документацией исходного материала). Композиты также отвечают технической документации по показателям потери массы при нагревании, плотности и объемного электрического сопротивления, однако повышение концентрации добавки в композите выше 2 мас.% приводит к увеличению водопоглощения материала выше нормативных значений.

DOI: 10.31857/S2308112024030061, EDN: LWTMVY

Поливинилхлорид (ПВХ) относится к наиболее распространенным в промышленности термопластичным полимерам и применяется (часто в форме пластифицированных композиций) для изготовления самых разнообразных изделий: пластиковых труб, оболочек кабелей, оконных рам, отделочных материалов (линолеума, декоративной плитки), искусственных кож, грампластинок, упаковок лекарственных препаратов. По данным 2017–2019 гг., изделия из ПВХ составляли около 10% от всего рынка промышленных пластиков [1].

Одной из проблем при эксплуатации изделий из ПВХ может быть их ограниченная светостойкость [2], а также (в некоторых случаях) подверженность биообрастанию [3]. Формирование биопленок бактерий и микромицетов на поверхности ПВХ может приводить к увеличению скорости деструкции материала [4] (в связи с воздействием выделяемых микроорганизмами ферментов на полимер, пластификатор и другие

компоненты материала). Кроме того, формирование биопленок в пластиковых трубах уменьшает просвет труб и меняет шероховатость поверхности, что негативно влияет на эксплуатационные свойства изделий; в связи с этим защита ПВХ от биообрастания является актуальной задачей. Фотостарение ПВХ приводит к пожелтению изделий, снижению прочности и эластичности материала, поэтому в большинство композиций на основе ПВХ вводятся фотостабилизаторы. Фотодеградация пластифицированного ПВХ включает в себя как фотоиницированные радикальные процессы, приводящие к дегидрохлорированию с образованием полиеновых цепей (что приводит к изменению окраски полимера), так и физические процессы – в первую очередь десорбцию стабилизатора [5]. Для подавления радикальных процессов используют УФ-поглотители на основе производных бензотриазола или бензофенона [6], а также поглощающие в УФ-диапазоне наполнители, такие как углеродная сажа, диоксид титана, мел и т.д. [7]. Поглотители радикалов на основе

производных триацетонамина (Hindered amine light stabilizers) используются меньше вследствие их взаимодействия с хлороводородом, выделяющимся при деструкции ПВХ [8].

Для защиты полимерных материалов от биодеградации к настоящему времени разработано большое число биоцидных добавок [9], однако многие из них характеризуются достаточно высокой токсичностью для человека и других теплокровных. Для замены токсичных биоцидов (например, на основе соединений металлов переменной валентности [10]) представляют интерес высокомолекулярные соединения гуанидинового ряда, которые характеризуются биоцидной активностью по отношению к широкому спектру микроорганизмов [11] и неопасны для человека (в отличие от низкомолекулярных гуанидинов и олигомеров [12]). Так, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ-ГХ) промышленно выпускается во многих странах и применяется в качестве компонента антисептических растворов для санитарной обработки помещений.

Непосредственное применение высокомолекулярных гуанидиновых соединений в качестве биоцидных добавок для крупнотоннажных термопластов затруднительно в связи с плохой совместимостью этих полимеров и возможностью вымывания добавки из полимерной основы. Применение гуанидиновых полимеров в форме органоминеральных комплексов позволяет разрешить данную проблему: комплексы, формирующиеся при иммобилизации ПГМГ-ГХ на неорганическом носителе, например монтмориллоните (ММТ), удовлетворительно распределяются в объеме матричного полимера при экструзионном смещении компонентов материала, а адсорбция полигуанидинов на поверхности неорганического носителя по ионообменному механизму способствует повышению стабильности материала. Экспериментально подтверждены как биоцидная эффективность таких добавок [13, 14], так и устойчивость органоминерального комплекса в составе композита на основе полиэтилена при воздействии водных сред [15]. Так, после выдержки композита в морской воде в течение 21 месяца не зафиксировано деструкции ПГМГ-ГХ или вымывания ПГМГ-ГХ из композита.

При экспонировании композитов с полиэтиленовой матрицей, содержащих органоминеральные комплексы ММТ + ПГМГ-ГХ, в условиях субтропического климата установлено также снижение скорости фотохимической деструкции полимерной основы композита в присутствии органоминеральной добавки [15], т.е. комплексная добавка на основе ММТ и ПГМГ-ГХ при введении в композиты с полиэтиленовой матрицей проявляет свойства не только биоцида, но и фотостабилизатора.

Биоцидное действие ПГМГ-ГХ связано преимущественно с действием катионных гуанидиновых групп на цитоплазматическую мембрану клеток [16]. Механизм фотостабилизации полимеров органоминеральными комплексами ПГМГ-ГХ до конца не ясен. Можно предположить, что он обусловлен дезактивацией радикалов на подвижных гуанидиновых звеньях с образованием радикала на α -углероде при гуанидиновой группе [17] и последующим обрывом цепи на поверхности ММТ.

Таким образом, создание новых функциональных добавок для защиты материалов на основе ПВХ от биообрастания и фотоокислительного старения представляет большой практический интерес, особенно в связи с ограниченной применимостью производных триацетонамина для фотостабилизации ПВХ и других полимеров с кислотными продуктами деструкции [18]. Использование гуанидинсодержащих органоминеральных добавок для решения данных задач представляется достаточно перспективным; при этом также возможно улучшение механических свойств материалов, поскольку ММТ уже в малых концентрациях может быть упрочняющим наполнителем для многих термопластичных полимеров, включая ПВХ [19].

Цель настоящей работы – исследование эффективности органоминеральных комплексов ММТ + ПГМГ-ГХ как функциональных добавок для повышения фотостабильности и стойкости к биообрастанию полимерных материалов на основе пластифицированного ПВХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полимерной основой при исследовании эффективности добавок служил кабельный пластикат “Элигран” марки ППО 30-35 предназначенный для изготовления защитных оболочек проводов и кабелей, эксплуатирующихся в условиях, требующих повышенной пожаробезопасности (электростанции, метрополитен, высотные здания, химические заводы, складские помещения и т.д.). Для сравнения использовали пластикат без биоцидных добавок и пластикат со стандартным фунгицидом марки “Fungitrol-11” (“Arxada”). Образцы ПВХ-пластикатов представлены для исследований Публичным акционерным обществом “Владимирский химический завод”.

Комплексную биоцидную и фотостабилизирующую добавку (КБФД) получали из промышленного ПГМГ-ГХ производства Общества с ограниченной ответственностью “Альтерхим-ПРО” и натриевого ММТ Вайомингского месторождения марки Cloisite Na⁺ производства компании

“Southern Clay Products, Inc.”, США (емкость катионного обмена 95 ммоль/100 г глины, средний диаметр частиц сухого порошка ММТ 10 мкм).

Методика получения комплексной биоцидной и фотостабилизирующей добавки аналогична представленной в работе [15]. Предварительно была приготовлена 6%-ная суспензия ММТ в дистиллированной воде, к суспензии добавляли рассчитанное количество 10%-ного водного раствора ПГМГ-ГХ, приготовленную смесь перемешивали лопастной мешалкой 12 ч, оставляли на 1 сутки, разделяли на центрифуге “Janetzki T24” и сушили осадок на лиофильной сушилке “LaboGene SCANVAC Coolsafe 55-4” до получения белого пушистого порошка.

Для микробиологических испытаний дополнительно приготавливали КБФД(о), промытую дистиллированной водой для удаления “свободного” ПГМГ-ГХ. Для этого 1 г комплексной биоцидной и фотостабилизирующей добавки диспергировали в 500 мл воды, оставляли на 1 сутки, центрифугировали и сушили осадок.

Образцы кабельного пластиката с комплексной биоцидной и фотостабилизирующей добавкой получали смешением базового пластиката и порошка органоминеральной добавки в лабораторном двухшнековом экструдере “Haake MiniLab II” компании “Thermo Scientific” (температура 105 °С, частота вращения шнеков 100 об/мин); ниже образцы пластикатов обозначены как П-0 (без комплексной биоцидной и фотостабилизирующей добавки), П-2, П-3, П-4, П-5. Для равномерного смешения материал в течение 10 мин проходил в экструдере по замкнутому циклу, затем экструдат измельчали и повторно смешивали при тех же условиях. Образцы кабельного пластиката без биоцидов и со стандартным биоцидом, полученные от производителя, обрабатывали в экструдере аналогичным образом для обеспечения одинаковой термической предыстории всех образцов.

Пластины ПВХ-пластикатов для исследований прессовали между плёнками из фторопласта при температуре 140 °С в течение 5 мин при давлении 2 МПа.

Ускоренные испытания ПВХ-пластикатов на стойкость к фотоокислительному старению проводили в лабораторных условиях при воздействии на образцы пластикатов (пластины диаметром ~4 см) жесткого УФ-излучения в течение 320 ч с помощью облучателя на основе четырех бактерицидных ламп БУВ-15 мощностью 15 Вт каждая (освещённость в диапазоне UVA 0.5 Вт/м², диапазоне UVB 0.8 Вт/м², диапазоне UVC 12 Вт/м², максимальная интенсивность излучения соответствует длине волны 254 нм). После 320 ч облучения образцы пластикатов

сохраняли эластичность и не разрушались. Применение ламп с жестким УФ-излучением позволяет существенно сократить продолжительность испытаний при первичной сравнительной оценке стойкости композитов различного состава к фотостарению; кроме того, такие данные могут быть полезны для оценки перспективности применения исследуемых добавок в изделиях, подвергаемых при эксплуатации периодической УФ-стерилизации [20].

Для оценки влияния УФ-излучения на молекулярную структуру полимерной основы ПВХ-пластикатов полимер отделяли от наполнителей обработкой горячим циклогексаном в установке типа “экстрактор Сокслета” в течение 6 ч с последующей сушкой полученного раствора полимера до постоянной массы.

Для качественной оценки изменения молекулярной массы полимера при УФ-облучении измеряли характеристическую вязкость растворов полимера (полученных после обработки пластиката на экстракторе Сокслета) в циклогексаноне при температуре 25.4 °С. Измерения выполняли на стеклянном капиллярном вискозиметре серии ВПЖ.

ИК-спектральные исследования проводили на спектрометре “Bruker IFS 66 v/s” в режиме НПВО для пластикатов (кристалл ZnSe, 45°, однократное отражение диапазон 4000–400 см⁻¹, разрешение 1 см⁻¹) и в режиме съемки на пропускание для пленок ПВХ без наполнителей. Обработку и анализ спектров выполняли с использованием программного обеспечения OMNIC 9.2 и набора библиотек спектров высокого разрешения HR Aldrich.

Микробиологические исследования роста биопленок на поверхности пластикатов проводили по экспресс-методике, разработанной в Институте микробиологии им. Виноградского РАН [21]. В качестве модельной культуры использовали культуру микромицета *Yarrowia lipolytica* 367-3 из коллекции Федерального исследовательского центра Биотехнологии РАН. Инокулят был приготовлен из суточной культуры *Y. lipolytica* 367-3, выращенной на жидкой среде LB на качалке (100 об/мин, 30 °С) и разбавленной до оптической плотности OD₅₄₀ = 0.2 стерильной среды LB. Стерилизованные образцы ПВХ-пластикатов (пластины 25 × 3 × 0.5 мм, не менее шести пластин для каждого опыта) помещали в пробирки с богатой питательной средой LB (Lennox), в которые вводили по 50 мкл инокулята, культивировали двое суток при 30 °С при перемешивании (120 об/мин). Через 48 ч пластины с выросшими на их поверхности биопленками извлекали из пробирок и помещали в 1 мл водного раствора МТГ (тиазолил синий тетразолий бромид,

Диаэм)¹ на 3.5 ч, в результате чего метаболически активные клетки окрашивались. После окрашивания пластины промывали водой для удаления остатков МТТ и несвязанных планктонных клеток и помещали в 0.5 мл ДМСО для экстрагирования. Оптическая плотность экстракта OD_{590} (измеренная при длине волны 590 нм на спектрофотометре Azure AC3000), является количественной характеристикой роста биопленки на поверхности образца.

Эксплуатационные характеристики ПВХ-пластиков измеряли в соответствии со стандартными методиками. Плотность образцов определена по ISO 11833-1 2019 методом обмера и взвешивания, водопоглощение образцов пластиков – по ISO 62:2008 IEC 60811-402:2012, потери массы пластиков – по Межгосударственному стандарту ГОСТ 5960–72 (выдержка 6 ч при температуре 160 °С, размеры образцов пластиков 60 × 40 × 2 мм). Электропроводность пластиков находили с помощью тераомметра Е6-13А, электроды для измерений объемного электрического сопротивления материала изготавливали в соответствии с IEC 93-80. Физико-механические свойства пластиков охарактеризовывали в условиях одноосного растяжения образцов в виде двусторонних лопаток (не менее пяти лопаток для каждого состава, размеры рабочей части лопаток 3 × 10 мм, скорость растяжения 20 мм/мин) на разрывной машине “TIRAtest 2000”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ПВХ-пластикат и органоминеральный комплекс КБФД охарактеризованы методом термogrавиметрии (рис. 1), для сравнения на рисунке приведены также кривые ТГА для реакторного порошка ненаполненного непластифицированного ПВХ марки С-7059М. Кривые скорости изменения массы (рис. 1б) масштабированы и сдвинуты для удобства чтения графика.

На дериватограммах непластифицированного ПВХ наблюдаются два максимума: потери массы при 270–400 °С соответствуют разложению ПВХ с выделением хлороводорода, а при 400–600 °С – деструкции образовавшейся полиацетиленовой цепи (в инертной атмосфере – до ненулевого коксового остатка). В пластифицированном ПВХ потеря пластификатора происходит в диапазоне 200–300 °С [22]. Разложение карбоната кальция (для наполненных мелом пластиков) происходит при температурах 600–700 °С.

Из представленных на рис. 1 термограмм рассчитано, что в исследуемом пластикате доля ПВХ составляет ~60 мас.%, доля пластификатора ~25 мас.%, остальное – минеральные наполнители, преимущественно карбонат кальция, что также подтверждается ИК-спектрами (см. далее). Низкое значение потери массы пластиката в диапазоне температур деструкции наполнителя (~3%) связано с протеканием реакции между карбонатом кальция и хлороводородом (выделяющимся при термодеструкции ПВХ при температурах 270–400 °С) с образованием термостабильного хлорида кальция.

По данным термогравиметрии определено также содержание ПГМГ-ГХ в полученных образцах органоминеральных комплексов (с учетом потери массы ММТ в диапазоне температур 550–700 °С, составляющей 5.5% и обусловленной дегидроксилированием алюмосиликатных частиц). Содержание органических веществ в образце КБФД составило 25%, в образце КБФД(о) – 14%. Отсюда с учетом молекулярной массы элементарного звена ПГМГ-ГХ без противоиона (140 г/моль) несложно рассчитать, что на поверхности ММТ может быть адсорбировано по ионообменному механизму до 12 мас.% ПГМГ. Следовательно, в КБФД примерно половина полигуанидина адсорбирована без образования ионных связей с поверхностью носителя; большая часть такого “избыточного” ПГМГ-ГХ может быть удалена из образца при воздействии воды. Однако пики скорости термодеструкции органической фазы на дериватограммах подобных органоминеральных комплексов существенно смещены в сторону меньших температур по сравнению с соответствующими пиками порошкового ПГМГ-ГХ [14], т.е. “избыточный” ПГМГ-ГХ тоже взаимодействует с алюмосиликатной поверхностью (вероятно, за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий).

Экструзионным методом смешения в расплаве приготовлены ПВХ-пластикаты, содержащие 0, 2, 3, 4 и 5% КБФД (образцы П-0, П-2, П-3, П-4 и П-5 соответственно), а также пластикат, содержащий 5% промытой водой добавки КБФД(о) (образец П-5-о). Для сравнения использовали пластикат со стандартной биоцидной добавкой Fungitrol-11 (образец П-Ф). Спектры ИК-НПВО образцов пластиков представлены на рис. 2.

При анализе ИК-спектров полученных композитов содержащийся в образцах пластификатор идентифицирован как диоктилтерефталат (полосы 1718, 1270, 1120, 1100, 1020, 730 см^{-1}) [23]. Также на спектрах наблюдаются полосы поглощения ПВХ 600–700 ($\nu_{\text{C-Cl}}$), 1092 и 1204 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1255 (δ_{CH}),

¹ Данное соединение метаболизируется клетками микроорганизмов с образованием окрашенного соединения (формазана), появление соответствующей фиолетовой окраски свидетельствует о наличии в образце метаболически активных бактериальных клеток.

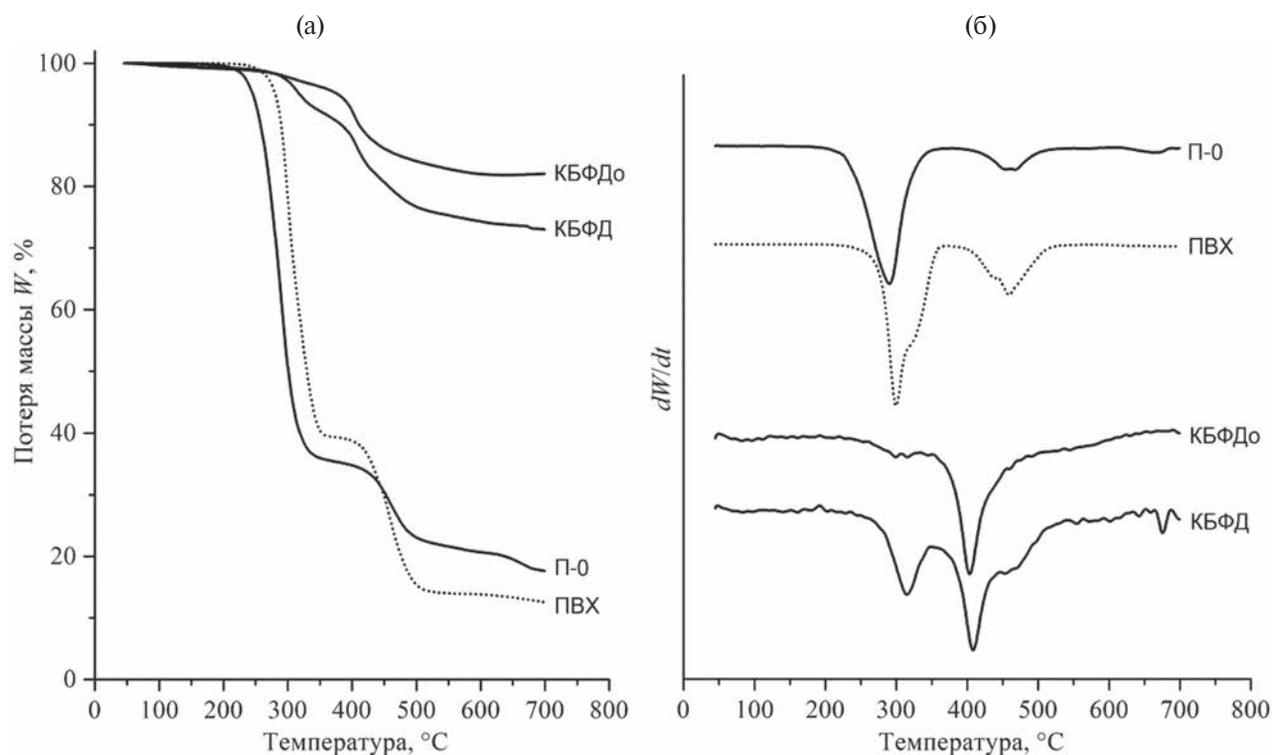


Рис. 1. Термограммы (а) и дифференциальные термограммы (б) компонентов органоминерального комплекса КБФД (1), промытого водой органоминерального комплекса КБФД(о) (2), пластика ПВХ П-0 (3) и реакторного порошка ПВХ (4).

1330 ($\delta_{\text{CH}} + \tau_{\text{CH}_2}$), 1425 (δ_{CH_2} , частично скрыта пластификатором), 2965 и 2910 cm^{-1} (ν_{CH} , ν_{CH_2}) [24]. Полосы поглощения карбонатов (при 875, 713, 1400–1500 cm^{-1}) объясняются наличием в пластиках наполнителя – карбоната кальция. На спектрах образцов с органоминеральной добавкой КБФД также наблюдаются полосы колебаний связей Si–O в диапазоне 1030–1090 cm^{-1} [25] (на рис. 2 показаны стрелкой), интенсивность этих полос закономерно увеличивается при повышении содержания КБФД в образце. Характерные для ПГМГ-ГХ полосы поглощения (например, полосы валентных колебаний C=N-связи 1636 и 1671 cm^{-1}) на графике не видны в связи с низким содержанием полигуанидина в композитах – не более 1.25 мас. %.

Для оценки целесообразности применения исследуемых добавок для защиты ПВХ-пластиката от биообращения и от фотоокислительного старения (при сохранении необходимых эксплуатационных характеристик материала) проведен ряд экспериментальных исследований.

Биообращение образцов ПВХ-пластикатов

Микробиологические испытания образцов ПВХ-пластикатов (в виде пластин $25 \times 3 \times 0.5$ мм)

при биообращении культурой аскомицетовых дрожжевых грибов *Y. lipolytica* 367-3 проведены по методике работы [21]. Для испытаний выбраны пять составов пластика: исходный пластикат без биоцидных добавок (П-0); пластикат со стандартным биоцидом Fungitrol-11 (П-F); пластикаты с КБФД в концентрации 2 и 5 мас. % (П-2, П-5); пластикат с 5 мас. % добавки КБФД(о), промытой избытком дистиллированной воды для удаления избытка ПГМГ-ГХ (П-5-о).

После двух суток культивирования *Y. lipolytica* 367-3 в питательной среде с погруженными в нее образцами ПВХ-пластикатов образцы промывали и выросшие на поверхности пластин биопленки окрашивали метаболизируемым красителем МТТ, после чего проводили экстракцию формазана из биопленок на поверхности пластин ДМСО (Общество с ограниченной ответственностью “Компонент-Реактив”). По увеличению оптической плотности экстрактов OD_{590} можно судить о количестве жизнеспособных (метаболически активных) клеток на поверхности исследуемого образца, т.е. количественно оценить степень биообращения материала.

Результаты МТТ-теста формирования биопленок *Y. lipolytica* 367-3 на поверхности ПВХ-пластикатов приведены ниже. Оптическая плотность экстракта OD_{590} составляет 0.40 ± 0.07 , 0.38 ± 0.10 ,

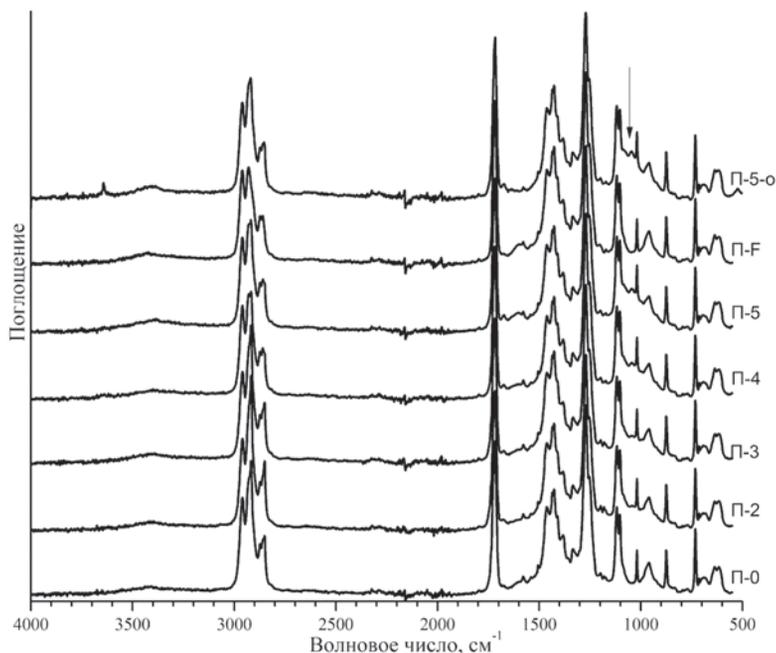


Рис. 2. ИК-НПВО-спектры ПВХ-пластиков П-5-о (1), П-F (2), П-5 (3), П-4 (4), П-3 (5), П-2 (6) и П-0 (7). Пояснения в тексте.

0.05 ± 0.03, 0.05 ± 0.03 и 0.29 ± 0.08 для образцов пластика П-0, П-F, П-2, П-5 и П-5-о соответственно. На образце ПВХ-пластика без биоцида (П-0) наблюдался выраженный рост биопленки *Y. lipolytica* 367-3. Для образцов, содержащих КБФД в количестве 2 и 5 мас.% (образцы П-2 и П-5) роста биопленки не зафиксировано – значения OD₅₉₀ близки к нулю. Следует отметить, что по визуальным наблюдениям в присутствии этих образцов также подавляется и рост планктонной культуры *Y. lipolytica* 367-3 – по-видимому, ПГМГ-ГХ частично высвобождается в объем жидкой питательной среды при культивировании микроорганизмов в присутствии образцов пластиков. Эффективность биоцидного действия у добавки КБФД(о), промытой для удаления избыточного ПГМГ-ГХ, значительно ниже, чем у исходной добавки (рост биопленки на композите П-5-о с добавкой КБФД(о) значительно выше, чем на композите П-5 с добавкой КБФД в аналогичной концентрации), поэтому в дальнейших экспериментах пластикат с добавкой КБФД(о) не использовали. Биообрастание образцов ПВХ-пластика со стандартным биоцидом (образец П-F) близко к биообрастанию исходного пластика без биоцидных добавок, т.е. эффективность данного продукта в условиях проведенного эксперимента ниже, чем эффективность исследуемой органоминеральной добавки КБФД (здесь следует отметить, что условия испытаний при культивировании аскомицетов в богатой питательной водной среде являются значительно более благоприятными для роста культур микроорганизмов по сравнению

с условиями эксплуатации большинства пластиковых изделий). Выбранный пластикат предназначен для оболочек кабелей, прокладываемых внутри помещений, и штатно эксплуатируется без контакта с водными средами, поэтому частичный переход биоцида в водную среду можно считать допустимым. Однако для оценки применимости добавок КБФД для изделий из ПВХ, эксплуатируемых в условиях постоянного или периодического контакта с водной средой (например, оконных рам), необходимы дополнительные исследования. При непродолжительном воздействии водных сред вымывание ПГМГ-ГХ из композитов незначительно: так, после статического воздействия 10 мл воды на 0.2 г пластика П-5 в течение 2 суток при 20 °С концентрация экстрагированного ПГМГ-ГХ в воде была менее 10 мг/л.

Фотоокислительное старение полимерной основы ПВХ-пластиков

Для оценки влияния УФ-облучения на полимерную основу пластика была проведена обработка облученных образцов пластиков в среде циклогексанона с помощью экстрактора Сокслета, что позволило отделить минеральную составляющую композитов. После экстрагирования были приготовлены тонкие пленки полимерной основы ПВХ-пластиков, которые исследовали спектроскопическими методами.

При фотостарении (во время эксплуатации или при ускоренных лабораторных испытаниях)

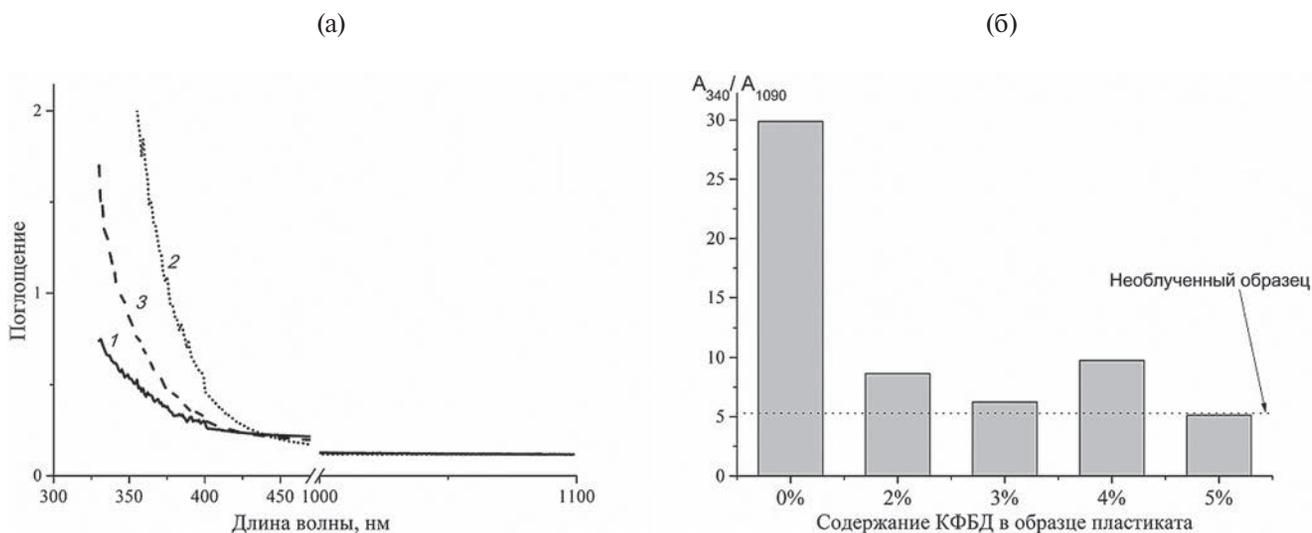


Рис. 3. Типичные УФ-спектры пленок ПВХ до облучения (1), после облучения (2) и пленок ПВХ + 4% КБФД после облучения (3) (а), а также соотношение интенсивностей поглощения A_{340}/A_{1090} для облученных пленок с разным содержанием КБФД (гистограмма) и необлученного образца (б).

ПВХ желтеет вследствие накопления хромофорных продуктов окисления, что выражается в увеличении поглощения в коротковолновой области спектра и смещении границы пропускания [26]. В связи с этим для оценки степени фотоокисления полимерной матрицы при УФ-облучении образцов были получены спектры пропускания пленок ПВХ (без минеральных наполнителей) в УФ- и видимой областях спектра, типичные зависимости представлены на рис. 3а.

Из рис. 3 следует, что в результате УФ-облучения пластикулов значительно увеличивается поглощение полимера в диапазоне длины волн до 450 нм, причем поглощение для образцов, содержащих КБФД, значительно ниже. Для количественной оценки влияния добавок на фотостарение образцов (рис. 3б) рассчитано отношение A_{340}/A_{1090} поглощения при 340 нм (соответствующего образующимся при старении ПВХ хромофорным группам, например полиненасыщенным системам двойных сопряженных связей) к поглощению при 1090 нм (где образцы практически прозрачны). На гистограммах видно, что после УФ-облучения образцов ПВХ без КБФД отношение A_{340}/A_{1090} увеличивается примерно в 6 раз, а для образцов с КБФД — не более чем в 2 раза. Таким образом, КБФД защищает ПВХ от фотостарения при УФ-облучении в лабораторных условиях.

Для исследования фотостарения ПВХ применяется также метод ИК-спектроскопии. Согласно стандарту ISO 10640–2011, старение ПВХ оценивается по появлению в спектрах полос продуктов фотоокисления: бета-хлорокарбонových кислот (полоса поглощения 1718 см^{-1}) и хлорангидридов (полоса поглощения 1785 см^{-1}). Однако на ИК-спектрах исследуемых образцов (рис. 4)

данные полосы перекрываются полосой поглощения пластификатора — диоктилтерефталата. По аналогичной причине (наложение полос полимера, пластификатора и наполнителей) оказались малоинформативными спектры ИК-НПВО поверхности облученных ПВХ-пластикатов.

На всех спектрах пленок полимерной основы УФ-облученных образцов (рис. 4) наблюдается рост поглощения в области полос ассоциированной воды ($\sim 3500 \text{ см}^{-1}$), что можно объяснить увеличением гидрофильности ПВХ вследствие окисления; интенсивность этой полосы максимальна для образцов без КБФД, однако различия между спектрами всех облученных образцов близки к погрешности эксперимента. Также после УФ-облучения образцов отмечено снижение интенсивности полос 1270, 1120, 1020, 730 см^{-1} , относящихся к диоктилтерефталату, что может свидетельствовать о его деструкции или миграции из образца в процессе испытаний [5].

Кроме накопления хромофорных групп следствием фотостарения полимерных материалов может быть разрыв макромолекул с уменьшением молекулярной массы полимера. Для оценки снижения молекулярной массы при фотоокислении полимерной основы ПВХ-пластикатов проведены измерения характеристической вязкости образцов ПВХ (после удаления твердой фазы). Количественный расчет изменения молекулярной массы исследуемых образцов связан со значительными сложностями калибровки, так как различия в степени разветвленности полимерной цепи ПВХ разных коммерческих марок приводят к большим отклонениям от базовой модели Марка–Хаувинка [27]. Тем не менее, снижение характеристической вязкости ПВХ после УФ-облучения можно

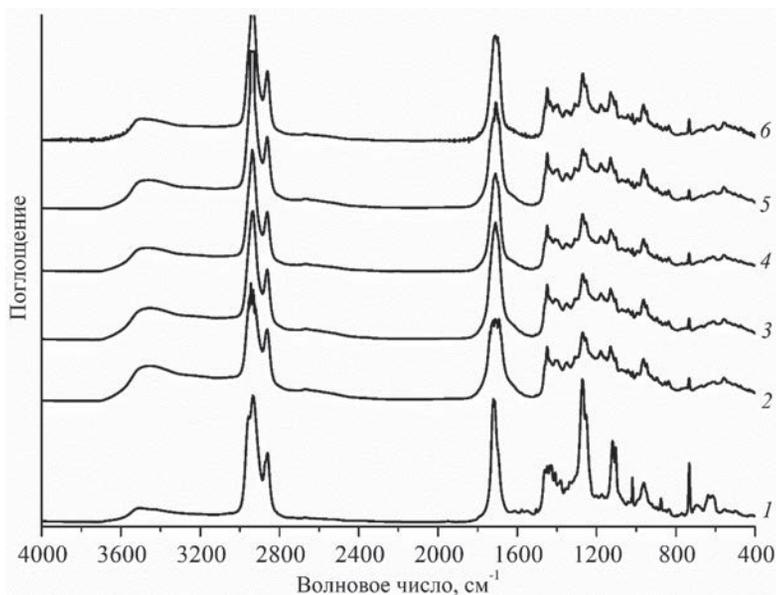


Рис. 4. ИК-спектры пропускания полимерной основы ПВХ-пластиков до УФ-облучения (1) и после УФ-облучения при содержании КБФД в пластике 0 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5) и 5% (6).

использовать как качественную характеристику степени изменения молекулярной массы полимера при фотоокислительном старении.

В результате измерений установлено, что приведенная вязкость раствора полимерной основы исходного композита составляет 5.35 дл/г. Для облученного образца без КБФД приведенная вязкость раствора равна 2.75 дл/г (в 2 раза меньше, чем для исходного образца), что может указывать на существенное снижение молекулярной массы. Для облученного образца пластика с 3 мас.% КБФД характеристическая вязкость составляет 4.24 дл/г, что сопоставимо со значением для контрольного образца.

Таким образом, данные УФ-спектроскопии и вискозиметрии подтверждают фотостабилизирующее действие КБФД на полимерную основу ПВХ-пластика. Для облученных образцов, содержащих КБФД, установлено меньшее накопление хромофорных групп, а также меньшее снижение характеристической вязкости раствора (и, следовательно, молекулярной массы) по сравнению с контрольными образцами облученных пластиков без КБФД.

Эксплуатационные характеристики ПВХ-пластиков

Результаты механических испытаний образцов пластика (сразу после изготовления образцов и после термического старения согласно нормативной документации) сведены в табл. 1.

Таблица 1. Физико-механические характеристики ПВХ-пластиков

Образец	Модуль упругости, МПа	Прочность, МПа	Удлинение при разрыве, %
П-0	33 ± 5	25.6 ± 1.1	327±15
П-2	31 ± 4	24.7 ± 0.9	302±23
П-3	38 ± 3	24.8±1.1	289±11
П-4	51 ± 4	23.3±1.9	228±28
П-5	53 ± 3	22.5±3.5	188±52
П-Ф	52 ± 3	27.8±0.7	287±20
Норматив	Не нормируется	Не менее 11	Не менее 250
После термостарения при 100 °С в течение 7 суток			
П-0	47±7	27.5±0.2	328±15
П-2	55±5	26.5±1.2	297±23
П-3	60±6	26.5±0.8	294±23
П-4	57±3	25.7±1.7	257±22
П-5	52±4	24.6±2.1	254±18
П-Ф	44±3	25.5±2.7	289±42
Норматив	Не нормируется	80 % от исходного	80 % от исходного

Модуль упругости композитов, не подвергнутых термостарению, возрастает с повышением содержания КБФД. При концентрации биоцидной добавки 5 мас.% модуль упругости материала

Таблица 2. Эксплуатационные характеристики ПВХ-пластиков

Образец	Потеря массы, * %	Водопоглощение, мас. %			Плотность, г/см ³	Объемное электрическое сопротивление $\rho \times 10^{-13}$, Ом·см	
		24 ч	48 ч	96 ч		до облучения	после облучения
П-0	0.07	0.08	0.14	0.20	1.33	69	35
П-2	0.12	0.30	0.57	0.84	1.24	63	83
П-3	0.13	0.53	0.90	1.03	1.20	101	128
П-4	0.14	0.48	0.83	1.08	1.18	52	112
П-5	0.14	0.66	1.02	1.31	1.18	69	102
П-F	0.11	0.30	0.37	0.46	1.28	37	52
Норматив	≤ 2	≤ 0.4	≤ 0.4	≤ 0.4	≤ 1.61	≥ 0.05	≥ 0.05

* При 160 ± 2 °С в течение 24 ч.

практически равен модулю упругости пластика с Fungitrol-11. При термостарении модуль упругости пластиков увеличивается, что может быть связано с деструкцией пластификатора или его миграцией на поверхность образца (рис. 4).

Разрывная прочность ПВХ-пластика снижается при введении КБФД в рецептуру материала, однако для образцов П-2 и П-3 снижение прочности близко к погрешности измерения. При термостарении пластиков с КБФД их разрывная прочность незначительно повышается, причем состаренные образцы с КБФД не уступают по прочности состаренным образцам с Fungitrol-11. Следует отметить, что все образцы (и с КБФД, и с Fungitrol-11) с большим запасом соответствуют нормативам по прочности, указанным в документации материала.

Удлинение при разрыве для пластиков, содержащих КБФД, снижается при увеличении концентрации органоминеральной добавки. Однако образцы П-2 и П-3, содержащие соответственно 2 и 3 мас. % КБФД, не уступают по этому показателю образцам пластика с Fungitrol-11 и удовлетворяют требованиям нормативной документации (как до, так и после термостарения).

В табл. 2 представлены результаты испытаний ряда эксплуатационных свойств ПВХ-пластиков с различными добавками в соответствии с нормативными требованиями на кабельный пластикат марки ППО 30-35. Из представленных данных следует, что все полученные материалы удовлетворяют требованиям технической документации по показателям потери массы (при выдержке при температуре 160 °С в течение 24 ч), плотности и удельного объемного электрического сопротивления. Необходимо учитывать, что введение КБФД приводит к увеличению водопоглощения материалов (тем больше, чем выше

концентрация добавки). С учетом снижения плотности образцов при введении КБФД можно предположить, что рост водопоглощения связан в том числе с увеличением объемной доли микропор в образце; эта проблема может быть разрешена варьированием условий переработки пластика (экструзионного смешения компонентов и последующего формования изделий). При испытаниях в течение 24 ч (один из вариантов, предусмотренных стандартом ИСО 62:2008) водопоглощение образца пластика П-2 с содержанием КБФД 2 мас. % хотя и выше, чем у исходного пластика без добавок, но укладывается в требования технических условий на данный материал и равно водопоглощению образца пластика П-F со стандартным фунгицидом. При этом введение КБФД в концентрации 2 мас. % достаточно для подавления биообрастания пластика культурой *Y. lipolytica* 367-3 и для защиты полимерной основы ПВХ-пластика от фотоокисления при воздействии излучения UVC-диапазона.

Таким образом, результаты настоящей работы подтверждают перспективность применения органоминеральных комплексов, полученных иммобилизацией ПГМГ-ГХ на поверхности слоистого носителя (монтмориллонита), в качестве многофункциональных добавок для защиты полимерных материалов на основе поливинилхлорида от биообрастания и фотоокислительной деструкции при воздействии УФ-излучения UVC-диапазона (применяемого, в частности, при дезинфекции полимерных изделий медицинского назначения).

При введении в кабельный пластикат органоминеральной добавки в количестве 2 мас. % обеспечивается защита материала от биообрастания микромолетом *Y. lipolytica* и снижается степень деструкции полимерной основы пластика при УФ-облучении. При этом сохраняются требуемые

эксплуатационные характеристики материала по прочности, эластичности, термостойкости, водопоглощению и объемному электрическому сопротивлению. Повышение содержания органоминеральной добавки в материале от 2 до 5 мас.% на основании полученных данных представляется нецелесообразным, так как не обеспечивает повышения эффективности фотостабилизации, но приводит к снижению физико-механических характеристик материала и увеличению водопоглощения свыше нормативных значений.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института нефтехимического синтеза Российской академии наук, а также в рамках Государственного задания Федерального исследовательского центра Биотехнологии Российской академии наук (122040800164-6).

Исследования проведены на приборах Центра коллективного пользования Института нефтехимического синтеза Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang C., Liu Y., Chen W.Q., Zhu B., Qu S., Xu M. // J. Industr. Ecology. 2021. V. 25. №5. P. 1300.
2. Zhang M., Han W. Hu X., Li D., Ma X., Liu H., Liu L., Lu W., Liu S. // Polym. Degrad. Stab. 2020. V. 181. P.109340.
3. Zacheus O.M., Iivanainen E.K., Nissinen T.K., Lehtola M.J., Martikainen P.J. // Water Res. 2000. V. 34. №1. P. 63.
4. Webb J.S., Nixon M., Eastwood I.M., Greenhalgh M., Robson G.D., Handley P.S. // Appl. Environment. Microbiol. 2000. V. 66. №8. P. 3194.
5. Gumargaliev K.Z., Ivanov V.B., Zaikov G.E., Moiseev J.V., Pokholok T.V. // Polym. Degrad. Stab. 1996. V. 52. №1. P. 73.
6. Yin X., Zhang J., Zhang Z., Xu G. // Polym. Adv. Technol. 2017. V. 28. P. 1831.
7. Yousif E., Hasan A. // J. Taibah Univ. for Science. 2015. V. 9. Iss. 4. P. 421.
8. Wegmann A., Oertli A.G., Voigt W. // Conf. "Compounding Polyvinyl Chloride in the 21st century". Brookfield. 2002. Ses. 3. Paper 1. P.295.
9. Marturano V., Cerruti P., Ambrogi V. // Phys. Sci. Revs. 2017. V. 2. №6. 20160130.
10. Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A. // Arch. Toxicol. 2013. V. 87. №7. P. 1181.
11. Oule M.K., Azinwi R., Bernier A.M., Kablan T., Maupertuis A.M., Mauler S., Nevry R.K., Dembélé K., Forbes L., Diop L. // J. Med. Microbiol. 2008. V. 57. №12. P. 1523.
12. Park D.U., Park J., Yang K.W., Park J.H., Kwon J.H., Oh H.B. // Molecules. 2020. V. 25. №14. P. 3301.
13. Zhurina M.V., Bogdanov K.I., Mendeleev D.I., Tikhomirov V.A., Pleshko E.M., Gannesen A.V., Kurenkov V.V., Gerasin V.A., Plakunov V.K. // Coatings. 2023. V. 13. №6. P.987.
14. Gerasin V.A., Zhurina M.V., Kurenkov V.V., Mendeleev D.I., Ochenkov D.E., Myat K.H. // Polymer Science B. 2023. V. 65. №5. P. 681.
15. Mendeleev D.I., Legkov S.A., Tikhomirov V.A., Kurenkov V.V., Belous'ko M.A., Hoang Q.C., Gerasin V.A. // Polymer Science A. 2023. V. 65. №1. P. 111.
16. Zhou Z.X., Wei D.F., Guan Y., Zheng A.N., Zhong J.J. // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 108. №3. P. 898.
17. Kamenieva T., Tarasyuk O., Derevianko K., Aksenovska O., Shybyryn O., Metelytsia L., Rogalsky S. // Catal. Petrochem. 2020. V. 30. P. 73.
18. Gijsman P., Hennekens J., Tummers D. // Polym. Degrad. Stab. 1993. V. 39. №2. P. 225.
19. Madaleno L., Schjødt-Thomsen J., Pinto J.C. // Compos. Sci. Technol. 2010. V. 70. №5. P. 804.
20. Hankett J.M., Collin W.R., Chen Z. // J. Phys. Chem. B. 2013, V. 117. №50. P. 16336.
21. Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. // Microbiology. 2016. V. 85. P. 509.
22. Apchain E., Royaux A., Fichet O., Cantin S. // J. Cultural Heritage. 2022. V. 57. P. 79.
23. Rijavec T., Ribar D., Markelj J., Strlic M., Cigic I.K. // Scientific Rep. 2022. V. 12. 5017.
24. Del Fanti N.A. Infrared Spectroscopy of Polymers. Madison: Thermo Fisher Scientific, 2008. P.230.
25. Xue W., He H., Zhu J., Yuan P. Spectrochim. Acta A. 2007. V. 67. №3-4. P. 1030.
26. Kuznetsov S.M., Sagitova E.A., Prokhorov K.A., Nikolaeva G.Yu., Mendeleev D.I., Donfack P., Materny A. // Spectrochim. Acta A. 2021. V. 252. P. 119494.
27. Pepperl G. // J. Vinyl Additive Technol. 2000. V. 6. №2. P. 88.

УДАР УПРУГОЙ КАПЛИ ПО ТОНКОМУ ЦИЛИНДРУ

© 2024 г. А. О. Руденко, А. Н. Рожков*

Институт проблем механики им. А. Ю. Ишлинского Российской академии наук

119526 Москва, пр. Вернадского, 101

**e-mail: rozhkov@ipmnet.ru*

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 26.06.2024 г.

Принята в печать 10.07.2024 г.

Изучено столкновение капель упругих жидкостей и воды с тонким цилиндром (нитью). Упругими (неньютоновскими) жидкостями служили водные растворы полимеров, моделировавшие реологическое поведение ротовой жидкости — основного переносчика инфекций воздушно-капельным путем. Вода в качестве ньютоновской жидкости была исследована с целью выделения эффектов упругости при сравнении столкновения ньютоновских и неньютоновских жидкостей — воды и полимерных растворов. Траектория полета капель и ось цилиндра взаимно перпендикулярны. В экспериментах диаметр капли составлял 3 мм, а горизонтальных цилиндров из нержавеющей стали 0.4 и 0.8 мм. Формирование капель происходило путем медленного истечения жидкости из вертикального капилляра из нержавеющей стали с внешним диаметром 0.8 мм, от которого капли периодически отрывались под действием силы тяжести. Скорость капли перед столкновением определялась расстоянием между срезом капилляра и мишенью-цилиндром (в экспериментах это расстояние составляло 5, 10 и 20 мм). Скорость падения капель перед ударом оценивалась в диапазоне 0.2–0.5 м/с. Процесс столкновения зарегистрирован методом скоростной видеозаписи с частотой кадров 240 и 960 Гц. В испытаниях задействованы вода и водные растворы полиакриламида с молекулярной массой 11 млн и концентрацией 100 и 1000 млн⁻¹. Показано, что в зависимости от высоты падения капли и концентрации полимера возможны различные сценарии столкновения: кратковременный отскок капли от препятствия, торможение и остановка капли на препятствии, обтекание капель цилиндрического препятствия с сохранением сплошности и продолжением свободного полета, а также распад капли на две вторичные капли, каждая из которых со своей историей последующего полета.

DOI: 10.31857/S2308112024030079, EDN: LWTEPJ

ВВЕДЕНИЕ

Защита от инфекций, передающихся воздушно-капельным путем, осуществляется за счет использования медицинских масок и фильтров, которые либо препятствуют, либо замедляют движение капель, возможных переносчиков инфекций. Патогенные капли образуются во время дыхания, разговора, кашля и чихания больного, попадая в организм здорового человека при вдыхании воздуха с содержанием таких капель [1–3]. Кроме того, крупные капли при столкновении с препятствиями [4–6], в том числе и с медицинскими масками, могут разрушаться на более мелкие, которые проще преодолевают средства защиты. Они также легче переносятся конвективными воздушными потоками, загрязняя территорию и пространство. В связи с чем, необходимо понимать механизмы столкновения капель упругой жидкости с материалом масок и фильтров. Поэтому экспериментально моделируется

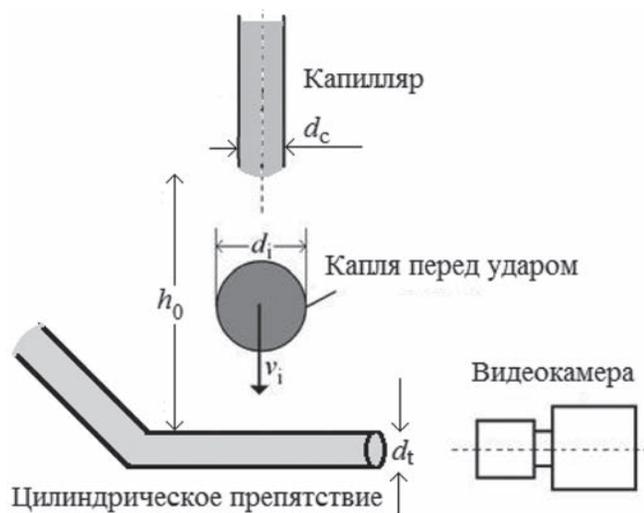
элементарный акт такого взаимодействия — падение капли на тонкий цилиндр, имитирующий волоконный компонент маски [7–10].

Результаты численного моделирования продемонстрировали наличие различных режимов обтекания тонкой нити каплей воды, которые хорошо согласуются с экспериментальными данными [11, 12]. При скорости падения менее 1 м/с капли воды диаметром $d_i = 0.5$ мм, нить диаметром $d_t = 0.1$ мм способна задержать ее проникновение, т.е. капля удерживается вблизи нити за счет сил поверхностного натяжения.

В отличие от предыдущих экспериментов [7–12], в настоящей работе наряду с каплями ньютоновских жидкостей (для сравнения) в столкновениях участвуют капли неньютоновских вязкоупругих жидкостей, реология которых соответствует реальным ротовым и бронхиальным жидкостям [13–16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Испытаниям подвергали водные растворы полиакриламида молекулярной массой 11 млн с массовой долей 0, 100 и 1000 млн⁻¹ (ПАА-100, ПАА-1к). Растворы ПАА-100 и ПАА-1к применяли в качестве модельных жидкостей, имитирующих реальную ротовую жидкость. Действительно, данные растворы обладают реологическими параметрами (модулем упругости G и временем релаксации θ), которые максимально близки к соответствующим реологическим параметрам реальной ротовой жидкости $G = 0.11$ Па, $\theta = 0.33$ с (рис. 1, штриховые линии). Реологические параметры определяли методом утончающейся нити [13–16] в рамках реологических моделей “Oldroyd-B” и “Upper-Convected Maxwell” (UCM) [17, 18]. Как показано в работе [19], обе модели эквивалентны для



Первоначально капля жидкости образовывалась на конце капилляра, функцию которого выполняла инъекционная игла с внешним диаметром $d_c = 0.8$ мм. Жидкость медленно формировала каплю с помощью инфузионного насоса “SINO SN-50C6”. При достижении определенной массы капля отрывалась от капилляра [20]. Далее капля сталкивалась с поперечно расположенным цилиндрическим препятствием, которым служила другая инъекционная игла диаметром $d_c = 0.4$ или 0.8 мм. Для повышения контрастности и удаления из поля съемки посторонних объектов иглу согнули примерно под прямым углом так, чтобы на видеокдрах были видны только капля и торец иглы (см. схему и фото). В опытах расстояние от среза верхней иглы до боковой поверхности нижней иглы составляло $h_0 \sim 5, 10$ и 20 мм. Процесс столкновения регистрировали при помощи видеозаписи с частотой кадров $f = 240$ и 960 Гц. Смартфоны “iPhone 6” (240 Гц) и “Honor 30S (CDY-NX9A)” (960 Гц) применяли для видеозаписи.

случаев больших упругих деформаций, характерных для исследуемых здесь течений. Результаты реологических испытаний модельных и реальных жидкостей и их сопоставление представлены на рис. 1. Оказалось, что наилучшее приближение обеспечивают растворы ПАА из диапазона концентрации $c \sim 252\text{--}2102$ млн⁻¹ (а также растворы полиэтиленоксида концентрации $c \sim 12449\text{--}19320$ млн⁻¹). Используемые в настоящем исследовании рабочие жидкости ПАА-100 и ПАА-1к характеризовались реологическими параметрами $G = 89.5 \pm 2.7$ мПа, $\theta = 27.3 \pm 6.0$ мс и $G = 139.1 \pm 4.3$ мПа, $\theta = 198.5 \pm 46.5$ мс соответственно [15]. Добавки ПАА не меняют заметно поверхностное натяжение растворов, которое остается примерно таким же, как и воды $\gamma = 72.6$ мН/м [15].

Ниже представлена схема ударного эксперимента и фото экспериментальной установки:



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе обработки видеокдраов был установлен диаметр капли перед ударом $d_i \sim 3$ мм и оценена ее масса $m_0 = (\pi/6)gd_i^3 = 14$ мкг (ρ – плотность жидкости). Скорость капли в момент соприкосновения с препятствием определена как $v_i \sim 0.2011, 0.2736$ и 0.4931 м/с для высот падения $h_0 \sim 5, 10$ и 20 мм соответственно (рис. 2).

Произведенные видеозаписи позволяют также проследить все фазы столкновения (рис. 3–5). Наблюдаемые процессы и особенности столкновения капли с препятствием сведены в табл. 1. Прослеживается несколько возможных сценариев столкновения, детали которых указаны в табл. 1. В частности, в случае воды при малых высотах падения $h_0 \sim 5$ мм видны отскоки капели от цилиндрического препятствия при их соприкосновении и последующие отрывы капели от препятствия (рис. 3а, 3б). Ранее отскоки капели происходили при ударе капели о плоскую

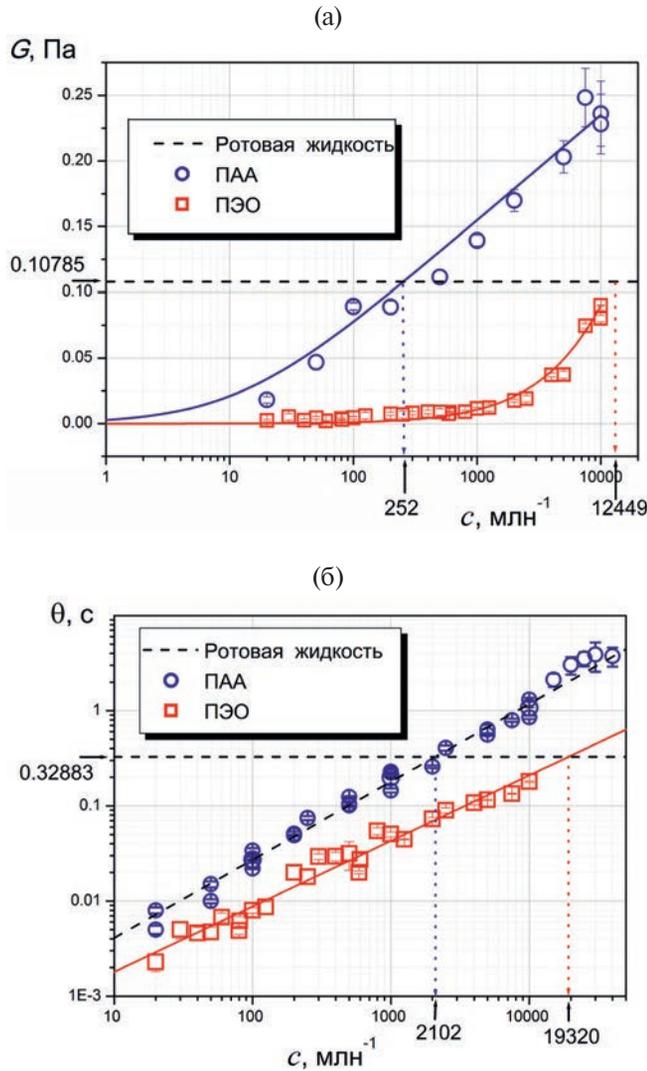


Рис. 1. Выбор концентрации модельных растворов ПАА и ПЭО, имитирующих реологическое поведение реальной ротовой жидкости, путем сопоставления результатов тестов модельных (кружки, квадраты) [15] и реальной ротовой жидкости (штриховые линии) [16]. Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

поверхность, например, как в работе [21]. При больших высотах падения $h_0 \sim 10$ и 20 мм отскок не столь явно заметен (рис. 3в–3е), зато при столкновении с наиболее толстым препятствием $d_t = 0.8$ мм при $h_0 \sim 10$ мм происходит распад падающей капли на две капли, одна из которых отрывается, а другая остается на препятствии, но позже может быть оторвана от препятствия ударом третьей капли (рис. 3г), а при $h_0 \sim 20$ мм разделение падающей капли на две завершается их коалесценцией и последующим отрывом (рис. 3е).

В случае слабоконцентрированных растворов ПАА-100 видны отскоки, захваты и отрывы капель при высоте падения $h_0 \sim 5$ –20 мм (рис. 4). Столкновение без захвата и частичный захват наблюдались

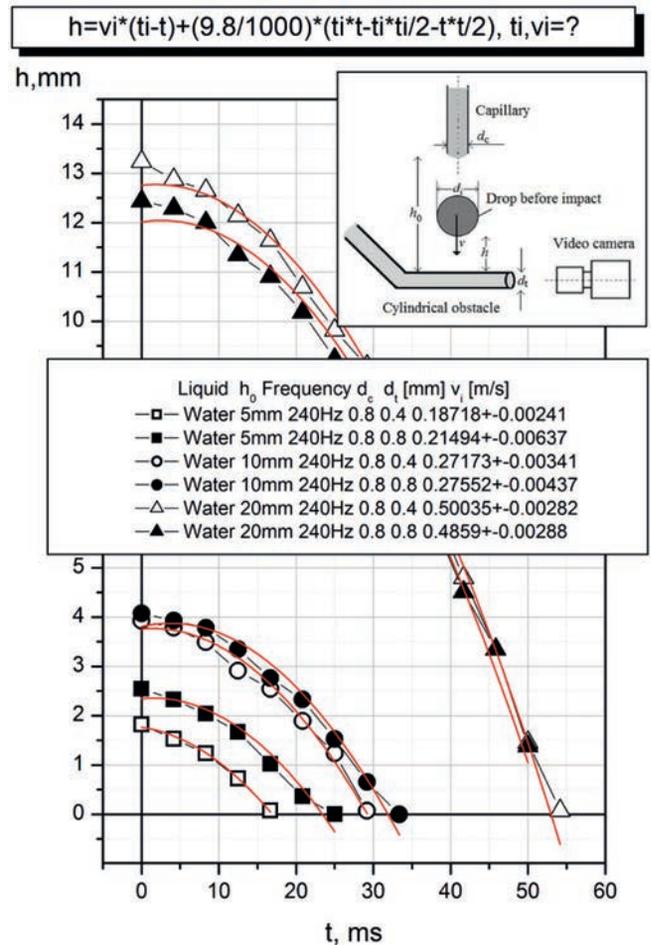


Рис. 2. Зависимость изменения расстояния от капли воды до препятствия h во времени t для разных расстояний между иглами h_0 . Точкам соответствуют приведенные значения высоты падения капли и диаметра игл d_c, d_t . Зависимость аппроксимировалась уравнением свободного падения, из которого вытекает расчетная формула, показанная на графике. В рамках пакета “Origin 6.1” находились значения t_i – время падения капли и $v_i \pm \Delta v_i$ – скорость удара и точность ее определения. Столкновения происходили при скорости 0.2–0.5 м/с.

только в случаях $h_0 \sim 5$ мм при $d_t = 0.4$ мм (рис. 4а) и $h_0 \sim 20$ мм при $d_t = 0.4$ мм (рис. 4д). В остальных случаях отрыв захваченной капли обеспечивается ударом следующей капли.

Во всех случаях концентрированных растворов ПАА-1к прослеживается захват, и отрыв захваченной капли возможен лишь ударом следующей капли или капель (рис. 5).

На рис. 6 показана карта столкновений. Видно, что в случае воды большинство столкновений заканчивается отрывом капель от препятствия, за исключением одного случая из шести, когда капля разделилась на две, и одна часть не смогла оторваться от препятствия (рис. 3г). Для полимерного раствора ПАА-100, наоборот,



Рис. 3. (начало) Столкновение капли воды с препятствием ($d_c = 0.8$ мм, $d_i = 2.84$ мм, $f = 240$ Гц) при разных значениях d_i и h_0 : а, б — отскок и отрыв капли воды от препятствия при $d_i = 0.4$ и 0.8 мм соответственно, $h_0 \sim 5$ мм; в — отрыв капли воды от препятствия при $d_i = 0.4$ мм и $h_0 \sim 10$ мм; г — распад капли воды на две части, захват препятствием одной и отрыв другой, последующий отрыв оставшейся капли под действием удара следующей каплей при $d_i = 0.8$ мм и $h_0 \sim 10$ мм. Здесь и на рис. 4, 5 цифры под кадрами — номер видеозаписи и порядок кадров в ней.

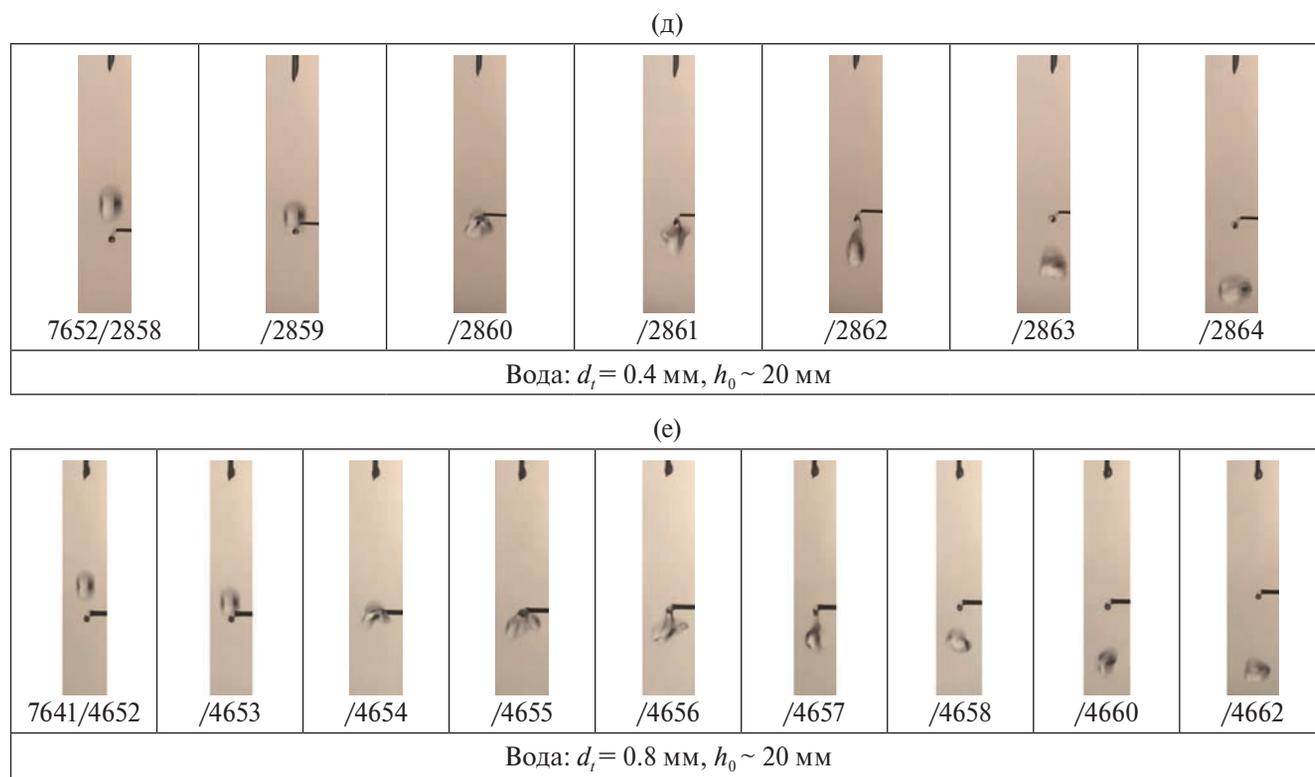


Рис. 3. (окончание) Столкновение капли воды с препятствием ($d_i = 0.8$ мм, $d_i = 2.84$ мм, $f = 240$ Гц) при разных значениях d_i и h_0 : д – отрыв капли воды от препятствия при $d_i = 0.4$ мм и $h_0 \sim 20$ мм; е – разрыв капли воды на две части, их коалесценция и последующий отрыв объединенной капли от препятствия при $d_i = 0.8$ мм и $h_0 \sim 20$ мм. Здесь и на рис. 4, 5 цифры под кадрами – номер видеозаписи и порядок кадров в ней.

в большинстве случаев наблюдается захват каплей препятствием, и лишь иногда, в двух случаях из шести (рис. 4а и 4д), столкновение протекает с частичным отрывом жидкости от препятствия. Все столкновения капель концентрированных растворов ПАА-1к завершаются захватом каплей препятствием.

В целом, для всех жидкостей существенного влияния диаметра цилиндрической мишени не обнаружено, так же как и влияния скорости удара.

При столкновении капли с препятствием доминирующими факторами являются силы инерции, капиллярности, упругости и гравитации. Соотношения этих сил описываются безразмерными числами Вебера – $We_i = \rho v_i^2 d_i / \gamma$, Фруда – $Fr_i = v_i / (gd_i)^{1/2}$ и параметром упругости $B = \pi d_i G \theta^2 / (4m_0)$, где g – ускорение свободного падения. Соответствующие значения представлены в табл. 1. Задержится капля на препятствии (захват) или оторвется от него (отрыв) зависит от соотношения этих сил. В работе [22] теоретически и экспериментально изучен процесс метания микрокапли упругой жидкости из сопла печатающей головки струйного принтера. Процесс во многом аналогичен явлению, исследуемому здесь. В обоих случаях движение капли

происходит по инерции, накопленной каплей в момент отрыва от сопла или препятствия, а далее движение тормозится силами упругости и капиллярности и может ускориться гравитацией. Как показано в работе [22] и в настоящей работе, при малых значениях концентрации добавок полимера капля легко отрывается, а при доминировании упругости над всеми прочими факторами капля захватывается препятствием, останавливает свой полет и(или) возвращается к печатающей головке, если рассматривается течение струи из сопла.

Критерием остановки (захвата) капли считается условие [22]

$$B = \pi d_i G \theta^2 / (4m_0) \geq 1.45, \quad (1)$$

так как в противном случае капля отрывается от препятствия (сопла).

На рис. 6 можно видеть, как режим метания (столкновения) зависит от упругости жидкости (параметр B) и высоты падения капли h_0 (скорости метания). Прослеживается явная тенденция перехода к упругому режиму с захватом капли при росте параметра упругости B , как показывает нам формула (1). Вместе с тем, высота падения



Рис. 4. (начало) Столкновение капли ПАА-100 с препятствием ($d_c = 0.8$ мм, $d_t = 2.84$ мм, $f = 240$ Гц) при разных значениях d_t и h_0 : а – отскок и отрыв капли ПАА-100 от препятствия при $d_t = 0.4$ мм и $h_0 \sim 5$ мм; б – захват первой капли ПАА-100 препятствием и последующий отрыв от него ударом следующей капли при $d_t = 0.8$ мм и $h_0 \sim 5$ мм; в, г – отскок и захват капли ПАА-100 препятствием и ее отрыв ударом следующей капли при $d_t = 0.4$ и 0.8 мм соответственно, $h_0 \sim 10$ мм.

Здесь и на рис. 5 линейки на кадрах показывают масштаб изображения.

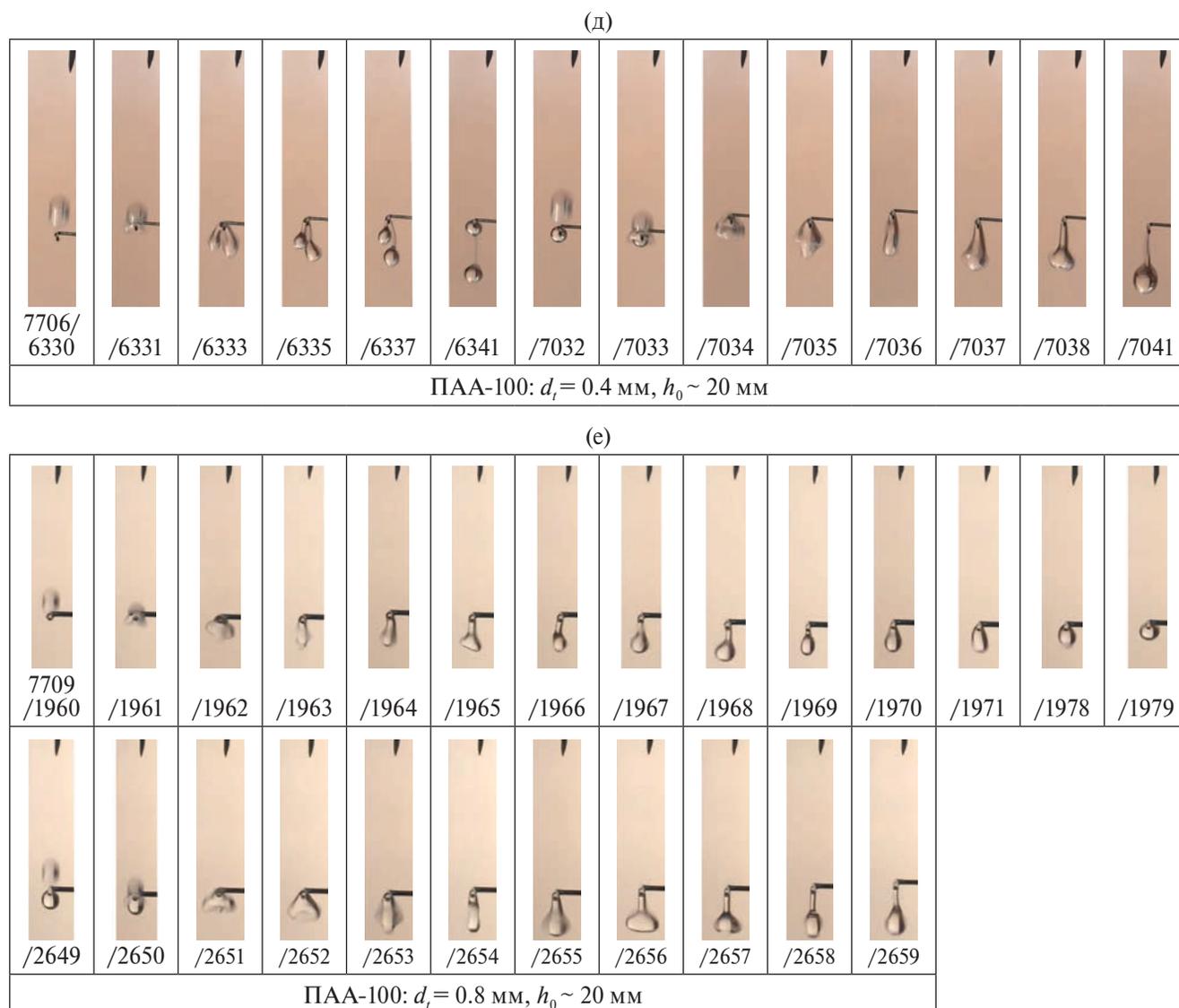


Рис. 4. Столкновение капли ПАА-100 с препятствием ($d_c = 0.8$ мм, $d_t = 2.84$ мм, $f = 240$ Гц) при разных значениях d_t и h_0 : а – отскок и отрыв капли ПАА-100 от препятствия при $d_t = 0.4$ мм и $h_0 \sim 5$ мм; б – захват первой капли ПАА-100 препятствием и последующий отрыв от него ударом следующей капли при $d_t = 0.8$ мм и $h_0 \sim 5$ мм; в, г – отскок и захват капли ПАА-100 препятствием и ее отрыв ударом следующей капли при $d_t = 0.4$ и 0.8 мм соответственно, $h_0 \sim 10$ мм; д – распад капли ПАА-100 на две части (одна отрывается, а другая – остается) и последующий отрыв от препятствия захваченной капли ударом следующей капли при $d_t = 0.4$ мм и $h_0 \sim 20$ мм; е – провисание, захват капли ПАА-100 препятствием, последующий отрыв захваченной капли ударом следующей капли при $d_t = 0.8$ мм и $h_0 \sim 20$ мм. Здесь и на рис. 5 линейки на кадрах показывают масштаб изображения.

h_0 (т.е. скорость удара) практически не влияет на режим столкновения. Это наблюдение согласуется с предсказанием формулы (1), в которой отсутствует скорость удара v_t .

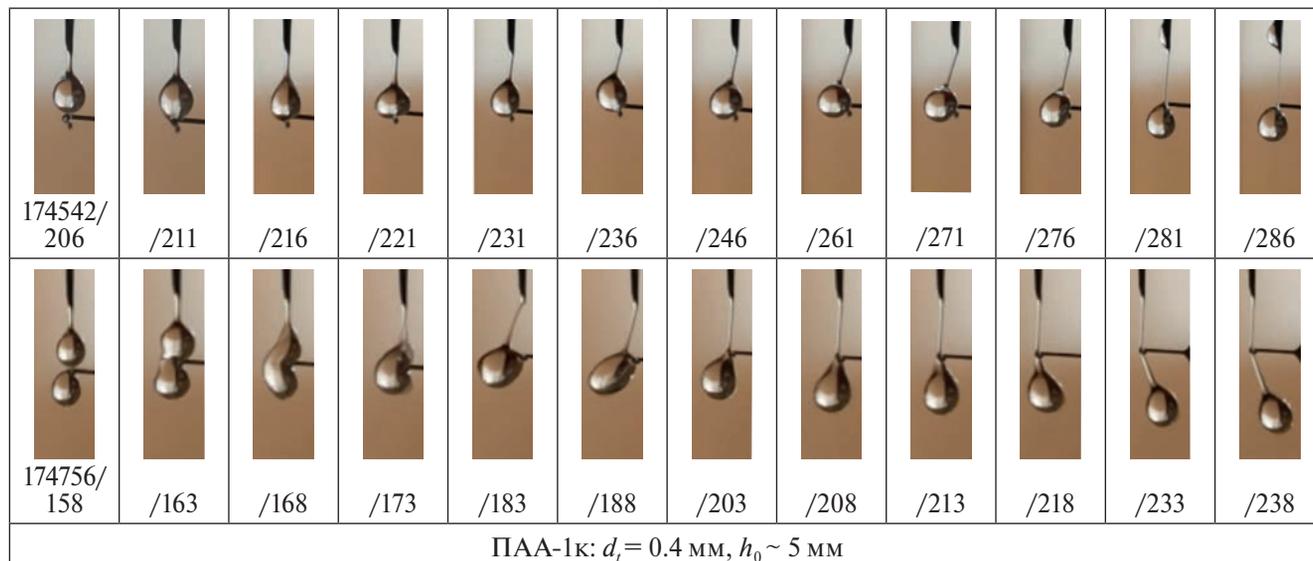
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение ударов капель воды и полимерных жидкостей показало, что возможны различные сценарии взаимодействия падающей капли с тонким цилиндром, которые зависят от кинематики удара и реологических свойств жидкости. Установлено, что упругость жидкости,

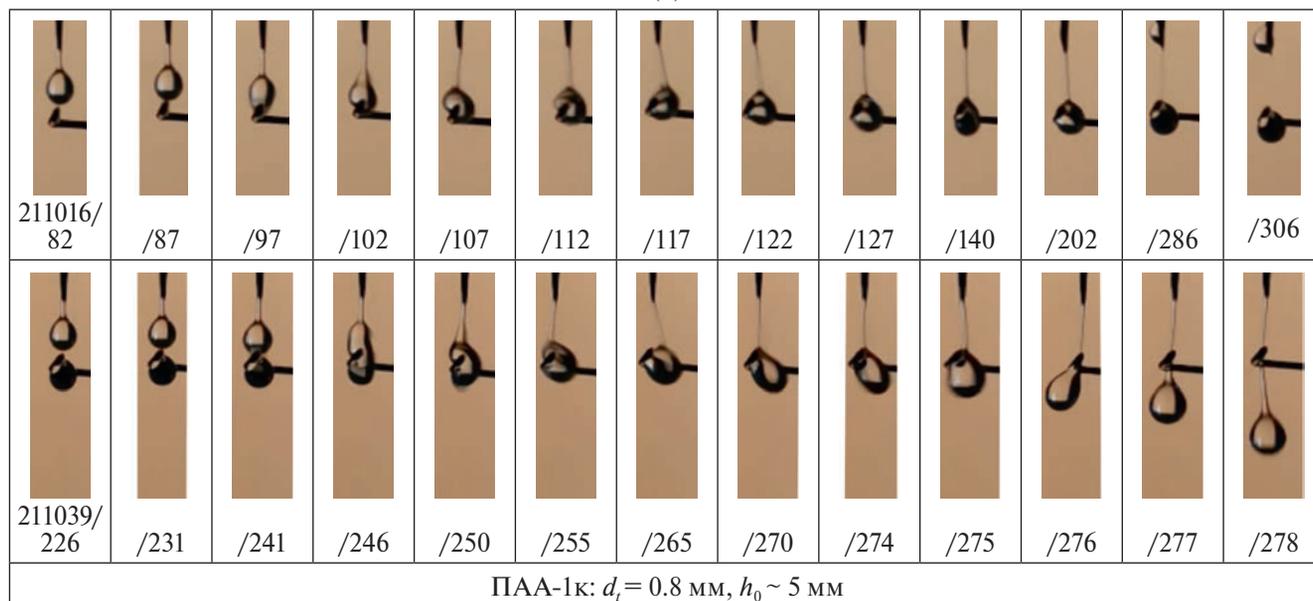
увеличивающаяся с концентрацией полимера, способствует захвату каплей тонким цилиндром. Отрыв капли в этом случае обеспечивается дополнительными ударами следующих капель. Эксперименты также выявили ситуацию отскока каплей от тонкого цилиндра, причем наблюдается она как для воды, так и для полимерных жидкостей. Кроме того, в экспериментах было обнаружено, что при определенных обстоятельствах происходит распад капли на две, причем дальнейшая судьба этих капель может быть разной.

В целом, работа показала, что именно упругость ротовой жидкости затрудняет передачу

(a)



(б)



(в)

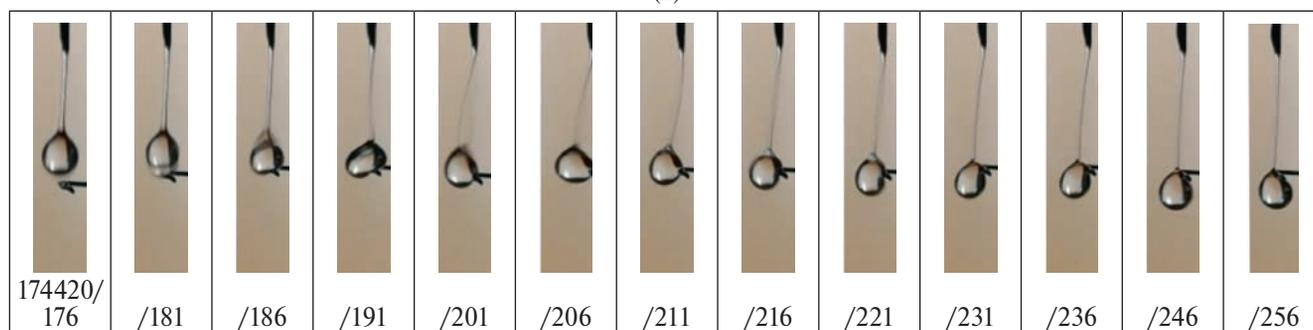
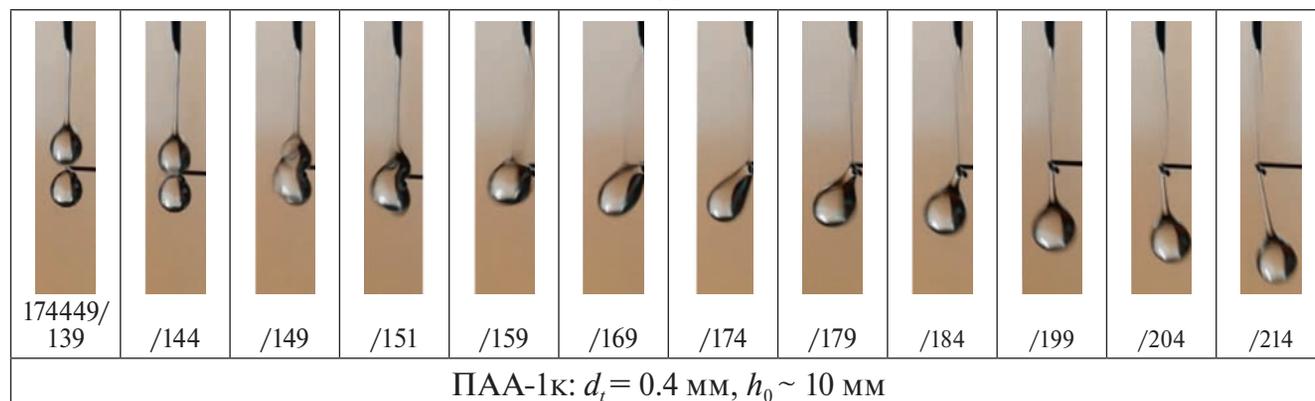
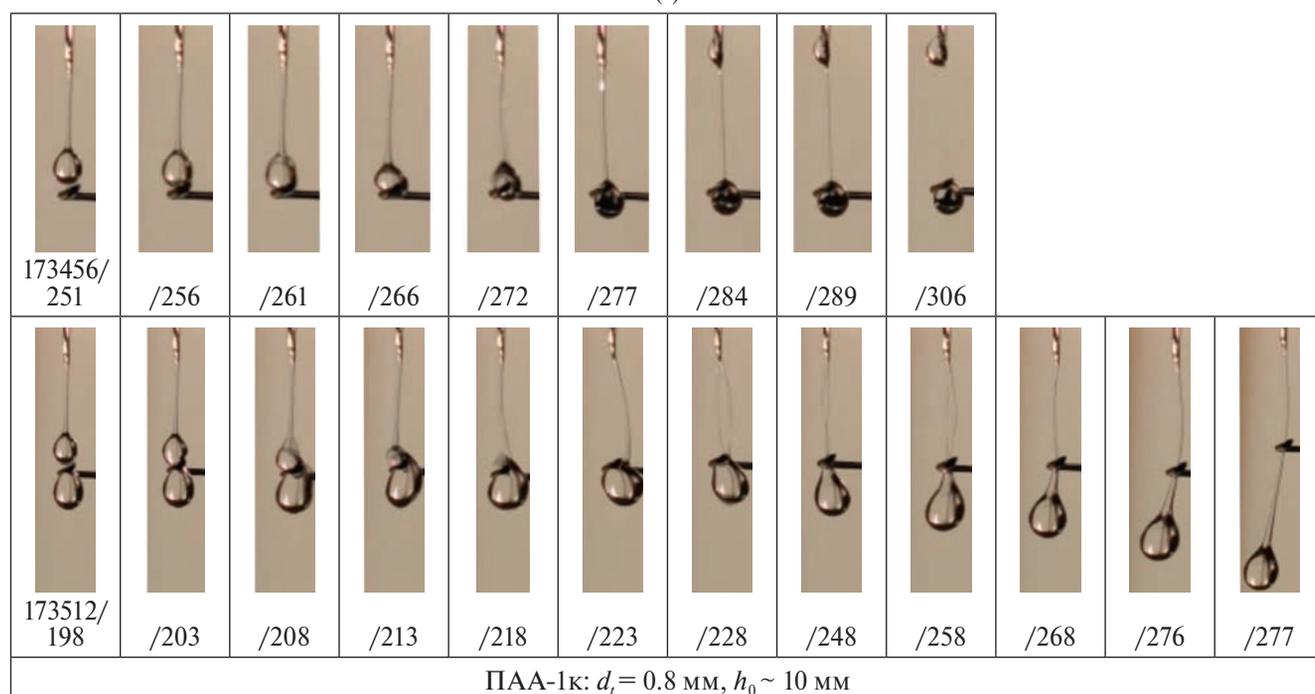


Рис. 5. (начало) Столкновение капли ПАА-1к с препятствием ($d_c = 0.8$ мм, $d_i = 2.86$ мм, $f = 960$ Гц) при разных значениях d_i и h_0 : а, б – захват капли ПАА-1к препятствием и ее отрыв ударом следующей капли с провисанием при $d_i = 0.4$ и 0.8 мм соответственно, $h_0 \sim 5$ мм; в – захват капли ПАА-1к препятствием и ее отрыв ударом следующей капли с провисанием при $d_i = 0.4$ и 0.8 мм соответственно, $h_0 \sim 10$ мм.

(в)



(г)



(д)

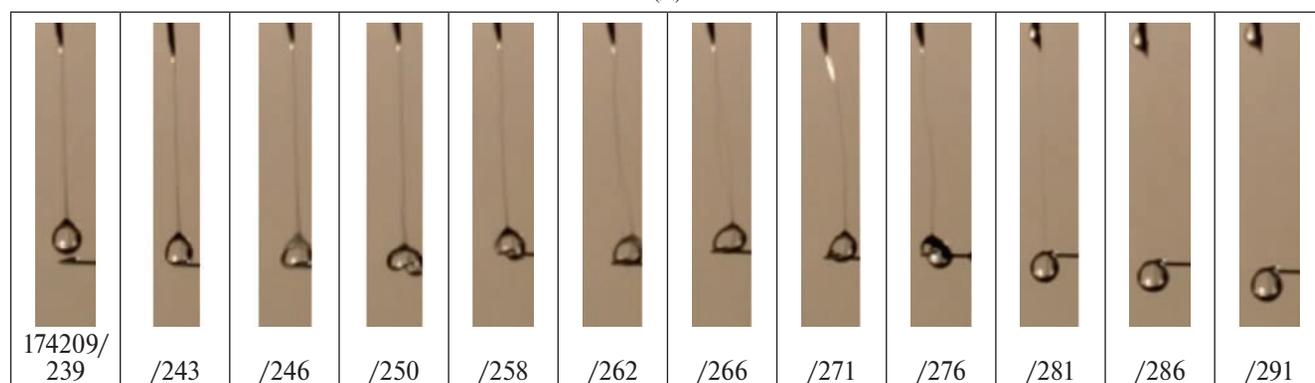
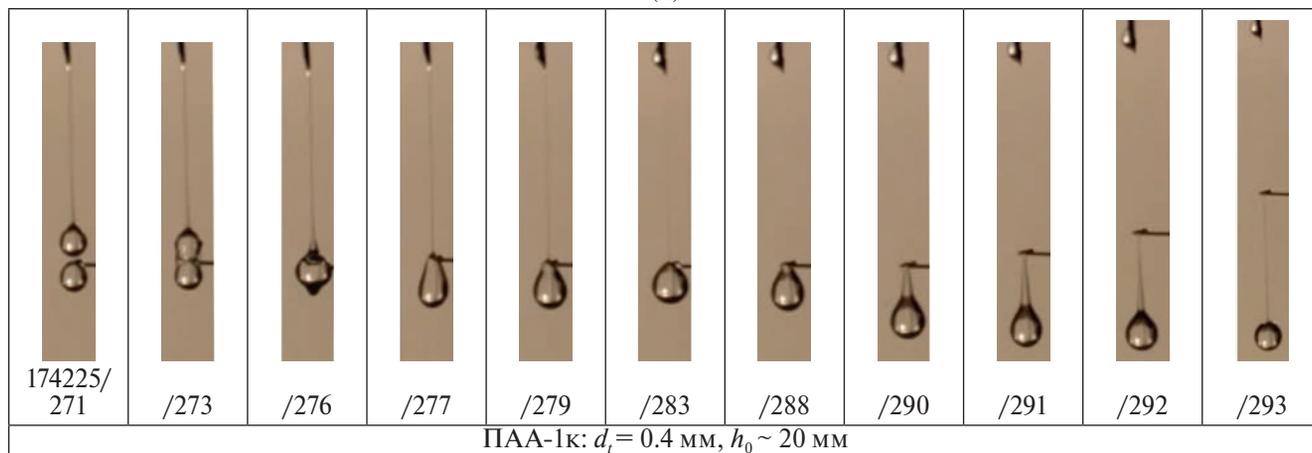


Рис. 5. (продолжение) Столкновение капли ПАА-1к с препятствием ($d_c = 0.8$ мм, $d_t = 2.86$ мм, $f = 960$ Гц) при разных значениях d_t и h_0 : в, г – захват капли ПАА-1к препятствием и ее отрыв ударом следующей капли с провисанием при $d_t = 0.4$ и 0.8 мм соответственно, $h_0 \sim 10$ мм; д – захват капли ПАА-1к препятствием, отскок и ее отрыв ударом следующей капли при $d_t = 0.4$ мм и $h_0 \sim 20$ мм.

(д)



(е)

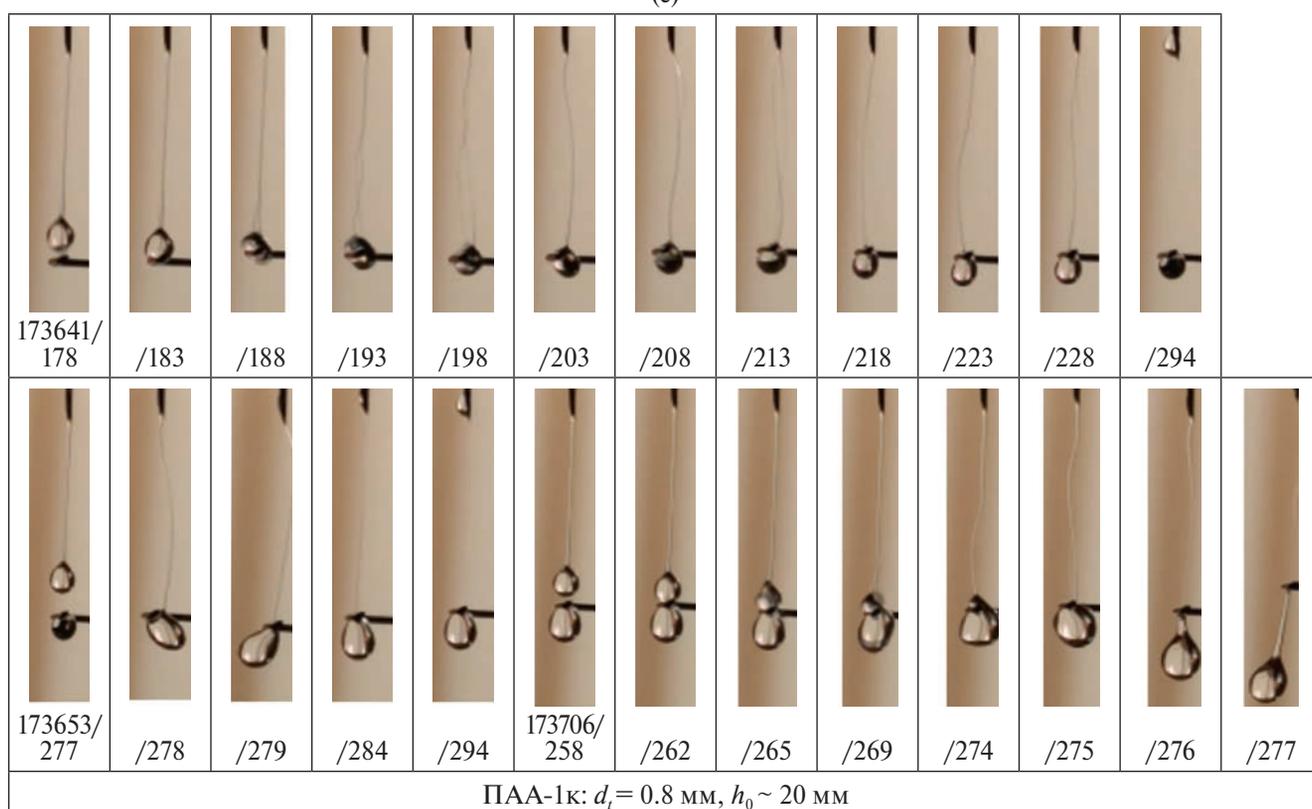


Рис. 5. (окончание) Столкновение капли ПАА-1к с препятствием ($d_c = 0.8$ мм, $d_i = 2.86$ мм, $f = 960$ Гц) при разных значениях d_i и h_0 : д – захват капли ПАА-1к препятствием, отскок и ее отрыв ударом следующей капли при $d_i = 0.4$ мм и $h_0 \sim 20$ мм; е – захват первой и второй капель ПАА-1к препятствием (капля увеличивается в размере) и ее отрыв от препятствия ударом третьей капли с провисанием при $d_i = 0.8$ мм и $h_0 \sim 20$ мм.

инфекции при использовании медицинских масок и защищает нас от заболеваний, передаваемых воздушно-капельным путем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №23-19-00451).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dbouk T., Drikakis D.* // Phys. Fluids. 2020. V. 32. P. 053310.
2. *Bourouiba L., Dehandschoewercker E., Bush J.W.M.* // J. Fluid Mech. 2014. V. 745. P. 537.
3. *Bourouiba L.* // Ann. Rev. Biomed. Eng. 2021. V. 23. P. 547.

Таблица 1. Процессы и особенности столкновения капли воды, ПАА-100 и ПАА-1к с препятствием при заданных параметрах

Образец	$h_0 \sim 5$ мм, $d_c = 0.8$ мм ($Fr_i = 1.1726$, $We_i = 1.6711$)		$h_0 \sim 10$ мм, $d_c = 0.8$ мм ($Fr_i = 1.5958$, $We_i = 3.0933$)		$h_0 \sim 20$ мм, $d_c = 0.8$ мм ($Fr_i = 2.8760$, $We_i = 10.047$)	
	$d_t = 0.4$ мм	$d_t = 0.8$ мм	$d_t = 0.4$ мм	$d_t = 0.8$ мм	$d_t = 0.4$ мм	$d_t = 0.8$ мм
Вода ($B = 0$)	Отскок и отрыв капли	Отскок и отрыв капли	Отрыв капли	Распад капли на две части, захват одной и отрыв другой части, а также отрыв оставшейся капли следующей каплей	Отрыв капли	Разрыв капли на две части, коалесценция и отрыв
ПАА-100 ($G = 89.5 \pm \pm 2.7$ мПа, $\theta = 27.3 \pm \pm 6.0$ мс, $B = 0.0112$)	Отскок и отрыв капли	Захват и отрыв ударом следующей каплей	Отскок, захват и отрыв следующей каплей	Отскок, захват и отрыв следующей каплей	Распад капли на две части, захват одной и отрыв другой, и последующий отрыв ударом следующей каплей	Провисание капли, захват и отрыв следующей каплей
ПАА-1к ($G = 139.1 \pm \pm 4.3$ мПа, $\theta = 198.5 \pm \pm 46.5$ мс, $B = 0.9224$)	Захват, отрыв следующей каплей с провисанием	Захват, отрыв следующей каплей с провисанием	Захват, отрыв следующей каплей с провисанием	Захват, отрыв следующей каплей с провисанием	Отскок, захват, отрыв следующей каплей с провисанием	Захват, отрыв третьей каплей с провисанием

Примечание. Показатели таблицы согласуются с данными рис. 3–5 соответственно.

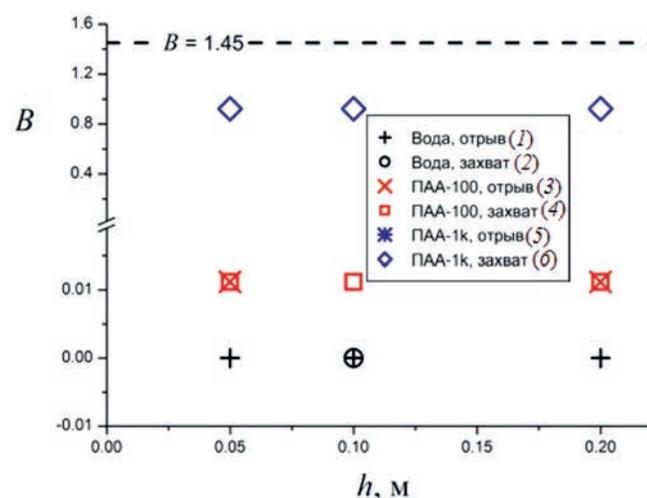


Рис. 6. Режимы столкновения отрыв (1, 3, 5) и захват (2, 4, 6) как функция высоты падения капли h и параметра упругости B : 1, 2 – вода; 3, 4 – ПАА-100; 5, 6 – ПАА-1к. Уровень $B = 1.45$ показывает приближительную теоретическую границу перехода к разрушению капли при столкновении с цилиндрическим препятствием.

- Lorenceanu É., Quéré D. // J. Coll. Int. Sci. 2003. V. 263. P. 244.
- Villermaux E., Bossa B. // J. Fluid Mech. 2011. V. 668. P. 412.
- Rozhkov A., Prunet-Foch B., Fedyushkin A., Vignes-Adler M. // Atomiz. Sprays. 2023. V. 33. № 10. P. 1.
- Lorenceanu E., Clanet C., Quere D. // J. Coll. Int. Sci. 2004. V. 279. P. 192.
- Dressaire E., Sauret A., Boulogne F., Stone H.A. // Soft Matter. 2016. V. 12. № 1. P. 200.
- Kim S., Kim W. // Phys. Fluids. 2016. V. 28. P. 042001.
- Bazilevsky A.V. Rozhkov A.N. // Fluid Dynamics. 2023. V. 58. № 5. P. 934.
- Fedyushkin A.I., Rozhkov A.N., Rudenko A.O. // J. Phys.: Conference Series. 2021. V. 2057. P. 012034.
- Федюшкин А.И., Гневушев А.А., Захаров А.С., Рожков А.Н. // Матер. XXIII Международной конференции по вычислительной механике и современным прикладным программным системам

- (ВМСППС'2023), 4–10 сентября 2023 г., Дивно-морское, Краснодарский край. С. 440.
13. *Bazilevsky A.V., Entov V.M., Rozhkov A.N.* // Fluid Dynamics. 2011. V. 46. № 4. P. 613.
 14. *Subbotin A.V., Malkin A.Y., Kulichikhin V.G.* // Adv. Coll. Int. Sci. 2011. V. 162. № 1–2. P. 29.
 15. *Rozhkov A., Prunet-Foch B., Vignes-Adler M.* // J. Non-Newtonian Fluid Mechanics. 2015. V. 226. P. 46.
 16. *Rozhkov A.N.* // Russ. J. Biomech. 2021. V. 25. № 4. P. 338.
 17. *Bird R.B., Armstrong R.C., Hassager O.* Dynamics of Polymeric Liquids. New York: Wiley, 1987.
 18. *Astarita G., Marrucci G.* Principles of Non-Newtonian Fluid Mechanics. London: McGraw Hill, 1974.
 19. *Bazilevskii A.V., Rozhkov A.N.* // Polymer Science A. 2018. V. 60. № 3. P. 391.
 20. *Adamson A.W.* Physical Chemistry of Surfaces. New York: Wiley, 1976.
 21. *Antonini C., Villa F., Bernagozzi I., Amirfazli A., Marengo M.* // Langmuir. 2013. V. 29. № 52. P. 16045.
 22. *Bazilevskii A.V., Meyer J.D., Rozhkov A.N.* // Fluid Dynamics. 2005. V. 40. № 3. P. 376.

О РАЗДЕЛЕНИИ ПЕПТИДОВ С ИНВЕРТИРОВАННЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ

© 2024 г. А. В. Горшков^{1, *}, И. Г. Роздина¹, М. Л. Придатченко²

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук
119991 Москва, ул. Косыгина, 4

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Федеральный исследовательский центр
химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук 119334 Москва, Ленинский пр., 38

*e-mail: alex.gorshkov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 13.08.2024 г.

Принята к публикации 16.09.2024 г.

Экспериментально и теоретически исследовано разделение пептидов с инвертированными от N-конца к C-концу последовательностями. Хотя такие последовательности состоят из одинаковых аминокислотных остатков, их адсорбционные свойства различаются. Теоретический расчет в рамках модели разделения пептидов *BioLCCC* показал, что разница в адсорбционных свойствах таких последовательностей обусловлена различием в пространственной корреляции связанных в цепь аминокислотных остатков и концевых групп при их взаимодействии с поверхностью.

DOI: 10.31857/S2308112024030089, EDN: LWKPPM

ВВЕДЕНИЕ

Важным свойством биомакромолекул (пептидов, белков, РНК и ДНК) является зависимость их свойств от порядка чередования мономеров разного химического строения в цепи, называемого иначе первичной структурой или текстом последовательности. От текста последовательности зависит как возможность сворачивания биомакромолекулы в те или иные плотные, глобулярные структуры, определяющие биологические функции белков, так и их взаимодействие друг с другом с образованием сложных трехмерных комплексов. Иногда даже перестановка или модификация нескольких звеньев в длинном тексте последовательности цепи приводит к невозможности правильного сворачивания макромолекулы и, следовательно, к потере ее биологической активности. По этой причине установление первичной структуры биомакромолекулы, ее модификации остается одной из задач современной науки, решаемой разнообразными химическими и физическими методами.

Одним из проявлений зависимости свойств биомакромолекул от текста последовательности является их адсорбционное взаимодействие с поверхностью. Такое свойство пептидов и белков используется в хроматографии для их

разделения и поиска изменений в последовательности, вызванных теми или иными точечными мутациями. Разделение пептидов, получаемых методами ферментативного гидролиза сложной смеси белков, выделенных из организма, дополненное методами масс-спектрометрического детектирования, играет важную роль в протеомике для идентификации белков и их модификаций. Дополнение данных масс-спектрометрии временем удерживания пептида дает возможность повысить достоверность идентификации белков, содержащих данный пептид, и заметно сократить время анализа. При таком подходе можно ограничиться точным измерением масс пептидов и исключить их фрагментацию [1]. Для этого необходимо иметь в арсенале исследователя модель разделения, дающую возможность рассчитать адсорбционное взаимодействие пептида с известной последовательностью и тем самым предсказать его время выхода или объем удерживания.

Зависимость адсорбционного взаимодействия пептида от текста последовательности в настоящее время можно предсказать на основе нескольких моделей. Аддитивная модель, типичная в практике хроматографии, предполагает, что время удерживания определяется суммой коэффициентов удерживания, которые

различаются для разных остатков [2–5]. Она имеет понятные физические обоснования для низкомолекулярных соединений или коротких пептидов, которые взаимодействуют с поверхностью целиком, всеми входящими в их состав аминокислотными остатками. В простой аддитивной модели отсутствует зависимость адсорбционных свойств пептида от перестановки букв в тексте последовательности, тем не менее она отражает его аминокислотный состав. Учитывая то, что пептиды, получаемые в результате ферментативного гидролиза белков, как правило, отличаются и по длине, и по аминокислотному составу, эта модель может с успехом применяться как начальная точка для предсказания времени выхода таких пептидов в дополнение к данным по массе пептида и массам его фрагментов.

Развитие аддитивной модели привело к пониманию того, что даже относительно короткие пептиды, в которых чередуются гидрофобные и гидрофильные звенья, могут при взаимодействии с поверхностью образовывать хвосты. В частности, заряженный положительно N-конец пептида, отталкивающийся от гидрофобной поверхности, с необходимостью удаляет от неё близкие к N-концу аминокислотные остатки, тем самым уменьшая их эффективную энергию взаимодействия с поверхностью. Если в аддитивную модель внести дополнительные связанные с этим явлением поправки, то ее предсказания становятся заметно точнее [6–8]. Далее можно внести поправки на длину цепи пептида, на спиральные участки или на какие-то другие особенности строения цепи. Однако такой подход порождает огромное количество дополнительных эмпирических коэффициентов, которые, хотя и описывают уже какие-то особенности вариации текста последовательности, имеют отдаленный физический смысл и затрудняют перенос модели, например, на другие системы разделения. В целом же модифицированная аддитивная модель представляет собой попытку описания взаимодействия пептида с поверхностью со стороны низкомолекулярного соединения.

Другим вариантом является использование нейронной сети для предсказания времени выхода разных последовательностей пептидов. Правильно сконструированная и обученная на широком тестовом наборе последовательностей нейронная сеть дает наиболее точные предсказания времени удерживания пептидов [9–12]. Нет сомнения, что при дальнейшем «обучении» такой сети в нее будут включены практически все пептиды белков, существенные для их идентификации: количество таких пептидов, конечно, гигантское, но все же ограниченное. Однако физическая причина,

по которой вариации последовательностей имеют разные адсорбционные взаимодействия, в нейронной сети не очень прозрачна.

Наконец, вариант модели разделения, развиваемый авторами, ориентирован на подход к пептидам со стороны макромолекул. Пептиды, хотя и относительно короткие, имеют цепочечную, макромолекулярную структуру. Если их длина порядка 20 звеньев, то и в адсорбционном взаимодействии проявляются свойства макромолекул. Для последних характерен резкий переход в адсорбированное состояние в узком диапазоне состава растворителя и температуры. Адсорбционные свойства макромолекул и их связь с хроматографическим разделением хорошо описываются моделью цепи случайных блужданий в щелеобразной поре. Эта модель в разных вариантах – гауссовой цепи или решеточной цепи, предсказывает существование критической точки адсорбции. Для гомополимеров в критической точке исчезает молекулярно-массовое распределение как следствие масштабной инвариантности, в том числе и для относительно коротких цепочек олигомеров, что открывает широкие возможности для исследования других типов неоднородности цепи [13–15]. Естественное обобщение для гетерополимеров с разным характером взаимодействия звеньев с поверхностью реализовано в модели *BioLCCC* [16–21]. В ней зависимость адсорбционного взаимодействия от текста последовательности автоматически возникает как следствие энтропийного вклада петель и хвостов, существующих в конфигурации адсорбированной цепи вблизи критической точки. Перестановка звеньев с различной энергией адсорбции меняет размер петель и их энтропийный вклад в адсорбционное взаимодействие, следовательно, зависимость от последовательности имеет в основном энтропийную природу. Поскольку изменение адсорбционных свойств макромолекулы происходит в узком диапазоне внешних параметров, в модель можно включить зависимость энергии адсорбции звена от состава растворителя с помощью корреляционной теории, что дает возможность описать разделение в градиентах, на разных адсорбентах и в разных системах разделения. В настоящей работе рассматривается простая вариация текста последовательности – его переворот от N- к C-концу (будем называть такие последовательности инвертированными) и выясняется физическая причина, по которой такой переворот приводит к изменению адсорбционных свойств макромолекулы.

МАТЕРИАЛЫ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Последовательности изученных пептидов приведены в табл. 1. Как можно заметить, в образцах

Таблица 1. Исследованные в работе пептиды с инвертированными последовательностями

Пептид, №	Последовательность	Пептид, №	Инвертированная последовательность
1	<i>ALQQQQQQQQQK</i>	1'	<i>QQQQQQQQQLAK</i>
2	<i>NPQNSSQSADGLR</i>	2'	<i>LGDASQSSNQPNR</i>
3	<i>ILELDQFKGQQGQKR</i>	3'	<i>RKQGQQGKFQDLELI</i>
4	<i>KQQNQELQEQLR</i>	4'	<i>RLQEQLEQNQQK</i>
5	<i>FLITHNPTNATLNK</i>	5'	<i>KNLTANTPNHTILF</i>

1 и 2 последовательность инвертирована без аминокислотного остатка на С-конце, тогда как в образцах 3, 4 и 5 последовательность инвертирована полностью. Этих пептиды исследовали в разное время на нанохроматографе “Dionex UltiMate 3000”, соединенном с масс-спектрометром “Amazon SL” в разных системах.

Система I: колонка Acclime perMap 100 Å, размер колонки 150 × 0.075 мм, фаза C₁₈, размер частиц адсорбента 3 мкм, T = 40 °C, растворитель А – вода + 0.1% муравьиной кислоты (МК), растворитель В – ацетонитрил (АЦН) 80% + вода 20% + 0.1% МК, рН 2.0, скорость подачи растворителя 300 нл/мин, объем вводимой пробы 1 мкл.

Система II: колонка YMC 300 Å, размер колонки 150 × 0.075 мм, фаза C₁₈, размер частиц адсорбента 5 мкм, T = 45 °C, растворитель А – вода + 0.1% МК + 0.01% трифторуксусной кислоты (ТФУ), растворитель В – АЦН + 0.1% МК + 0.01% ТФУ, рН 2.0, скорость подачи растворителя 300 нл/мин, объем вводимой пробы 1 мкл.

Система III: колонка Peaky 120 Å, размер колонки 5 см × 0.075 мм, фаза C₁₈, размер частиц адсорбента 1.9 мкм, T = 65 °C, растворитель А – вода + 0.1% МК, растворитель В 80% АЦН + 20% вода + 0.1% МК, рН 2.0, скорость подачи растворителя 1500 нл/мин, объем вводимой пробы 1 мкл.

Система IV: колонка Acclime perMap 100 Å, размер колонки 15 см × 0.075 мм, размер частиц адсорбента 3 мкм, T = 40 °C, растворитель А – вода + 100 мМоль бикарбоната аммония (БА), растворитель В – 80% АЦН + 20% вода + 100 мМоль БА, рН 8.0, скорость подачи растворителя 300 нл/мин, объем вводимой пробы 1 мкл.

Градиенты, использованные для разделения пептидов в разных системах, приведены на рис. 1.

Эксперименты проводили в разное время, и для подключения колонок к нанонасосу и масс-спектрометру использовали капилляры разной длины и разного диаметра. Эти экстраколочные объемы для некоторых систем были больше или порядка объема наноклонок, что приводило к задержке градиента до колонки и задержке транспортировки пептида от колонки

к узлу ввода в масс-спектрометр. Данные задержки учитывались нами при теоретических расчетах приблизительно путем добавления к расчетному времени удерживания времени задержки. Детектирование проводили по уникальным массам пептидов, а идентификация прямых и инвертированных последовательностей – по массам фрагментов. Показанные на рис.1 градиентные профили было бы правильнее отображать не во временной шкале, а в шкале объема растворителя, прокачиваемого через колонку. При такой нормировке градиент в системе III представляется очень пологим, что оправдано для короткой колонки, учитывая резкий переход пептида из адсорбированного состояния в раствор. Однако мы оставили традиционное представление градиентов во временной шкале.

Модель хроматографического разделения

Прежде чем перейти к обсуждению модели разделения, сделаем несколько замечаний. Элементарную вариацию текста последовательности аминокислотных остатков в цепи пептида дает перестановка двух букв – X и Y:



Если перестановка происходит в цепи гомополимера, что обычно имеет место для олигомеров, содержащих небольшое число реакционноспособных групп либо на концах, либо в самой цепи, то переставляемые звенья в разных местах находятся в окружении одинаковых мономеров



и их энергия взаимодействия с поверхностью за счет соседей не меняется. Строго говоря, это не совсем так, поскольку локальная плотность мономеров M зависит от места переставляемой группы в цепи и различна в середине и на конце цепи. Если учесть объемные взаимодействия между звеньями, которые имеют отталкивательный

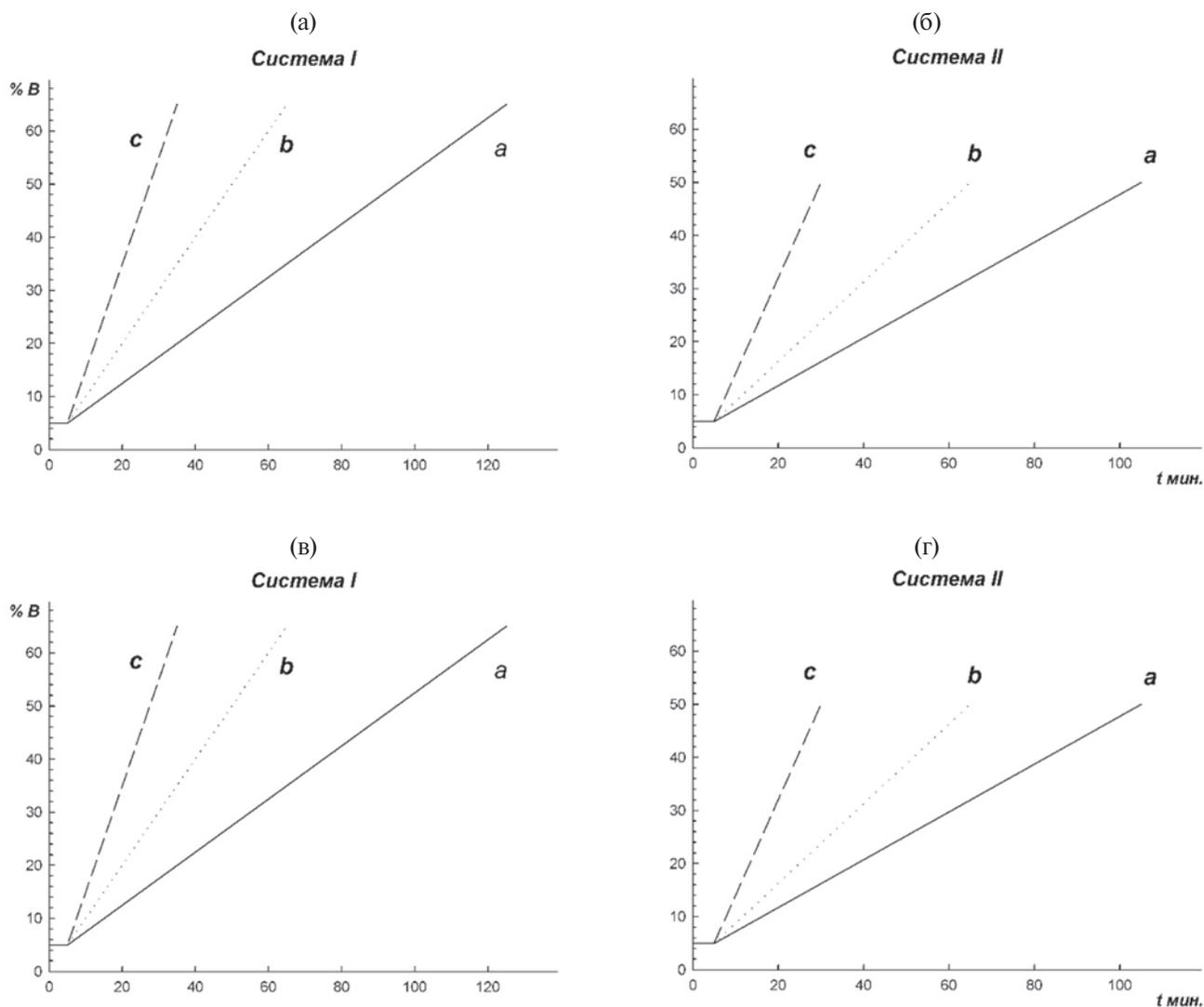


Рис. 1. Профили градиентных программ для систем I–IV. Система I – (время t , мин : B, %): (0 : 5, 5 : 5, 125 : 65) **a**, (0 : 5, 5 : 5, 65 : 65) **b**, (0 : 5, 5 : 5, 35 : 65) **c**; система II – (0 : 5, 5 : 5, 105 : 50) **a**, (0 : 5, 5 : 5, 65 : 50) **b**, (0 : 5, 5 : 5, 30 : 50) **c**; система III – (0 : 5, 5 : 5, 65 : 65) **a**; система IV – (0 : 5, 5 : 5, 65 : 65) **a**, (0 : 5, 5 : 5, 35 : 65) **b**.

характер в хорошем растворителе, то это может сказаться на адсорбционном взаимодействии переставленных звеньев. Однако точность хроматографического эксперимента вряд ли достаточна для обнаружения такого различия.

В гетерополимере для переставленных X и Y соседями справа и слева оказываются разные звенья. В результате из-за химического эффекта соседа энергия адсорбции звеньев X и Y в новых местах может оказаться различной. Соответственно после такой перестановки средняя энергия адсорбции звеньев цепи изменяется, и перестановка может быть учтена в приближении *среднего гомополимера* такой же длины с некоторой *средней энергией адсорбции звена*. Разделение пептидов в этом случае можно трактовать как разделение смеси гомополимеров с разной энергией адсорбции звеньев. Такая составляющая

влияния последовательности, которую мы называем химической, не универсальна и зависит от конкретной реализации текста последовательности.

Вместе с тем существует другая, универсальная составляющая влияния последовательности, которую мы называем физической: даже если энергия адсорбции переставляемых групп в цепи не меняется в зависимости от соседей и никак не проявляется в приближении среднего гомополимера, взаимодействие всей гетерополимерной цепи с поверхностью при перестановке оказывается различным. Для цепи случайных блужданий, лежащей в основе модели *BioLCCC*, математическим выражением этой зависимости является некоммутативность произведения переходных матриц, описывающего статистическую сумму гетерополимера вблизи поверхности.

Именно такая физическая составляющая влияния перестановки на адсорбционные свойства будет рассматриваться ниже. Какой фактор — химический или физический — доминирует, в общем случае зависит от последовательности конкретного пептида.

Для понимания дальнейшего кратко изложим содержание модели *BioLCCC* [16, 17]. Макромолекула представляется в виде цепи случайных блужданий на кубической решетке, задаваемой переходной матрицей $W(\varepsilon_i)$, зависящей от энергии адсорбции соответствующего аминокислотного остатка:

$$W(\varepsilon_i) = \begin{bmatrix} \frac{2}{3}e^{\varepsilon_i} & \frac{1}{6}e^{\varepsilon_i} & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \frac{1}{6} & \frac{2}{3} & \frac{1}{6} & \dots & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{6} & \frac{2}{3} & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & \frac{2}{3} & \frac{1}{6} \\ 0 & 0 & 0 & \dots & \frac{1}{6}e^{\varepsilon_i} & \frac{2}{3}e^{\varepsilon_i} \end{bmatrix}$$

Размер ячеек решетки равен размеру звена макромолекулы a , все другие величины размерности длины, например размер пор D , выражаются в единицах размера звена D/a и соответствует размерности переходной матрицы. Величины размерности энергии далее выражаются в единицах kT , при этом положительная энергия ε_i соответствует притяжению, а отрицательная — отталкиванию звена от поверхности. Статистическая сумма цепи в щелеобразной поре, моделирующей адсорбент, записывается в виде

$$Z = U^T \times W(0) \times \left[\prod_i W(\varepsilon_i) \right] \times U, \quad (1)$$

где U — единичный вектор начала цепи, матрица $W(0)$ с нулевой энергией соответствует концу цепи, вектор U^T суммирует все возможные конфигурации цепи в поре. Произведение берется по всем звеньям цепи пептида, включая N - ($i = 1$) и C - ($i = n$) концы. В такой модели предполагается, что с поверхностью взаимодействуют стыки звеньев, играющие роль аминокислотных остатков. Для дальнейшего заметим, что вектор U' ,

$$U' = U^T \times W(0) = [5/6 \ 1 \ 1 \ \dots \ 5/6],$$

является левым собственным вектором переходной матрицы в критической точке адсорбции.

Статсумма, отнесенная к единице объема, представляет собой коэффициент распределения макромолекул между подвижной и неподвижной фазами $K_d = Z/D$, задающий объем удерживания пептида V_R через объем пор V_p и объем межчастичного пространства в колонке V_o :

$$V_R = V_o + V_p \cdot K_d.$$

В свою очередь энергия звеньев ε_i зависит от состава бинарного растворителя; в приближении Лэнгмюра эта зависимость имеет вид

$$\varepsilon_i = \varepsilon_i^o - \varepsilon_{ab}(N_b) = \varepsilon_i^o - \ln(N_b e^{\varepsilon_b} + 1 - N_b), \quad (2)$$

где N_b — мольная доля растворителя b (ацетонитрила в нашем случае). Мольная доля естественным образом связана с изменяющейся в соответствии с градиентом объемной долей V_b компонента b через плотность и молекулярную массу. Величину ε_i^o можно понимать как энергию адсорбции аминокислотного остатка в чистом растворителе a (в нашем случае в воде). Данные энергии, а также энергия адсорбции ацетонитрила $\varepsilon_b = 2.49$ найдены нами ранее по модельным пептидам [16] и приведены в табл. 2.

Приближение Лэнгмюра для учета влияния растворителя на адсорбционные свойства звеньев не является оптимальным для гидрофобных взаимодействий звеньев на обращенной фазе типа S_{18} , которая обычно используется для разделения пептидов. Однако для длинных, наиболее информативных в плане идентификации белков, последовательностей $n \sim 20$ переход из адсорбированного состояния в раствор осуществляется в узком диапазоне составов растворителя. Зависимость энергии адсорбции от состава растворителя в узком диапазоне, по сути, линейна, так что применение любого корреляционного подхода, в том числе и приближения Лэнгмюра, оправдано. Зависимость энергии звеньев от состава V_b дает возможность описать разделение макромолекул в градиенте любого профиля, вводя при этом в модель единственный дополнительный параметр — энергию адсорбции компонента b . Заметим, что по форме зависимость энергии адсорбции звена от состава растворителя совпадает с корреляционной теорией Снайдера [22], развитой для низкомолекулярных соединений. Энергии адсорбции в табл. 2 представляют собой не что иное, как изменение свободной энергии в системе макромолекула—поверхность—растворитель при замене контакта растворитель—поверхность на контакт звено цепи—поверхность.

Введем понятие *среднего гомополимера* и определим среднюю энергию его звена $\bar{\varepsilon}$ следующим образом:

$$e^{\bar{\varepsilon}} = \frac{\sum e^{\varepsilon_i}}{n}, \quad (3)$$

(n – длина последовательности). Такое среднее соответствует приближению макромолекулы системой разорванных звеньев, локализованных в размере клубка R .

Используя средний гомополимер, представим, следуя работе [23], переходную матрицу в виде

$$W(\varepsilon_i) = \begin{bmatrix} \frac{2}{3}(e^{\varepsilon_i} + e^{\bar{\varepsilon}} - e^{\bar{\varepsilon}}) & \dots & 0 \\ \frac{1}{6} & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots \\ 0 & \dots & \frac{2}{3}(e^{\varepsilon_i} + e^{\bar{\varepsilon}} - e^{\bar{\varepsilon}}) \end{bmatrix} =$$

$$= W(\bar{\varepsilon}) + (e^{\varepsilon_i - \bar{\varepsilon}} - 1) \cdot \Delta W(\bar{\varepsilon}) = W(\bar{\varepsilon}) + \beta_i \cdot \Delta W(\bar{\varepsilon}),$$

где ΔW – поправочная матрица, в которой все элементы равны нулю, за исключением первой и последней строк, описывающих попадание звеньев на поверхность.

$$\Delta W(\bar{\varepsilon}) = \begin{bmatrix} \frac{2}{3}e^{\bar{\varepsilon}} & \frac{1}{6}e^{\bar{\varepsilon}} & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & 0 & \dots \\ 0 & 0 & \dots & \frac{1}{6}e^{\bar{\varepsilon}} & \frac{2}{3}e^{\bar{\varepsilon}} \end{bmatrix}$$

Параметр $\beta_i = (e^{\varepsilon_i - \bar{\varepsilon}} - 1)$ учитывает отличие энергии адсорбции i -го звена от средней величины.

Раскрывая произведение (1), записанное через матрицы среднего гомополимера $W = W(\bar{\varepsilon})$ и ΔW , для статистической суммы получим выражение

$$Z = Z(\bar{\varepsilon}) + \sum_i \beta_i U' W^{i-1} \Delta W W^{n-i} U +$$

$$+ \sum_{i < k} \beta_i \beta_k U' W^{i-1} \Delta W W^{n-k-1} \Delta W W^{n-k} U + \dots$$

Таблица 2. Эффективные энергии аминокислотных остатков в модели *BioLCCC*, определенные экспериментально по последовательностям *G(XX)LLLKK* [2] с разными концевыми группами Ac-, NH₂-, -OH, -amide

Аминокислота	ε^o	Аминокислота	ε^o
К	0.266	С	1.296
Н	0.386	У	1.686
Р	0.516	В	1.751
Н	0.614	М	1.822
Г	0.656	И	2.156
С	0.698	Л	2.298
Q	0.746	F	2.319
D	0.781	W	2.436
T	0.893	NH ₂	-1.69
E	0.984	OH	-0.03
A	1.143	Ac	0
P	1.143	amide	0

Представляя ΔW в виде

$$\Delta W = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \frac{2}{3}e^{\bar{\varepsilon}} & \frac{1}{6}e^{\bar{\varepsilon}} & \dots & 0 & 0 \end{bmatrix} +$$

$$+ \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 0 & \dots & \frac{1}{6}e^{\bar{\varepsilon}} & \frac{2}{3}e^{\bar{\varepsilon}} \end{bmatrix},$$

легко заметить, что статсумма гетерополимера записывается как статсумма среднего гомополимера $Z(\bar{\varepsilon})$, «исправленная» вкладами точечных одно-, двух- ... n -частичных взаимодействий разных звеньев с поверхностью. При этом статсуммы хвостов T и петель L , соединяющих звенья n -частичной конфигурации взаимодействия цепи с поверхностью, выражаются через таковые для среднего гомополимера. Статсуммы левого T' и правого T хвостов, начинающихся на поверхности и заканчивающихся внутри поры, имеют вид

$$T_i' = [5/6 \ 1 \ 1 \ \dots \ 5/6] \times W^{i-1} \times \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

и

$$T_{n-i} = e^{\bar{\varepsilon}} \times [2/3 \ 1/6 \ 0 \ \dots \ 0] \times W^{n-i} \times \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix},$$

соответственно. Что касается петель, то для них возможен вариант, когда они связывают звенья i и k , взаимодействующие с одной поверхностью, петли L , или звенья, взаимодействующие с противоположными поверхностями, петли L' . Статсуммы таких петель записываются как

$$L_{k-i} = e^{\bar{\varepsilon}} \times [2/3 \ 1/6 \ 0 \ \dots \ 0] \times W^{k-i-1} \times \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ \dots \\ 0 \end{bmatrix}$$

и

$$L'_{k-i} = e^{\bar{\varepsilon}} \times [2/3 \ 1/6 \ 0 \ \dots \ 0] \times W^{k-i-1} \times \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ \dots \\ 1 \end{bmatrix}.$$

Реальная практика протеомных исследований такова, что пептиды с длиной $n \sim 30$ звеньев имеют размер R , меньший размера пор $D \sim 100 \dots 300 \text{ \AA}$, так что петлями L' , связывающими звенья на противоположных поверхностях, можно пренебречь. Пептиды, исследованные в настоящей работе, соответствуют указанному условию. В результате получим выражение, учитывающее независимое взаимодействие цепи одновременно только с одной из двух поверхностей щелеобразной поры:

$$Z = Z(\bar{\varepsilon}) + 2 \times \sum_i T_i' \beta_i T_{n-i} + 2 \times \sum_{i < k} \beta_i \beta_k T_i' L_{k-i} T_{n-k} + \dots$$

Заметим, что если мы имеем дело с набором пептидов, различающихся по аминокислотному

составу и, следовательно, по средней энергии звена, то приближение среднего гомополимера может оказаться вполне достаточным для предсказания их порядка выхода.

Выбор средней энергии звена в разложении статсуммы гетерополимера может быть произвольным. Однако средняя энергия звена в приближении системы разорванных звеньев (3) точнее коррелирует с критической точкой гетерополимера, чем, например, средняя арифметическая энергия звеньев.

Чтобы показать это, рассмотрим регулярный гетерополимер типа $[AB]_n$, который на больших масштабах при достаточной степени полимеризации n представляет собой не что иное, как гомополимер со средней энергией адсорбции звена. Для него, очевидно, существует критическая точка, определяемая нами как состав растворителя, в котором исчезает зависимость адсорбции от размера макромолекулы (или длины последовательности при $n \gg 1$). Критическая энергия звена такого регулярного гетерополимера не является средним арифметическим энергий звеньев А и В. Одна и та же среднеарифметическая энергия звена, например $\varepsilon = 1.3$, может быть реализована различным заданием энергий звеньев А и В: $\varepsilon(A, B) = (1.3, 1.3), (1.8, 0.8), (2.0, 0.6), (2.3, 0.3)$. При этом рассчитанный по формулам (1)–(2) состав растворителя, соответствующий критической точке и исчезновению зависимости статсуммы от степени полимеризации, для разных реализаций такого гетерополимера будет различным.

Определенная по формуле (3) средняя экспоненциальная энергия звена, хотя также не соответствует критическим точкам регулярного гетерополимера, тем не менее, хорошо коррелирует в диапазоне энергий, типичных для аминокислотных остатков (табл. 2), с расчетным критическим составом растворителя для разных реализаций энергии звеньев А и В регулярного гетерополимера (рис. 2а).

Наконец, отметим, что в стандартном градиенте рассчитанный по формулам (1)–(2) объем удерживания последовательностей $[AB]_n$ определяется их критическими точками (рис. 2б). Следовательно, при вариации последовательности можно рассмотреть различия в адсорбционном взаимодействии и соответствующее изменение порядка выхода пептидов в приближении среднего гомополимера, находящегося в критической точке. Аналогичный вывод справедлив и для другого предельного случая – моделирования пептида жестким стержнем [20]. Для полноты картины заметим, что любое отличие последовательности $[AB]_n$ от регулярной, например, случайное распределение звеньев А и В по цепи, приводит к увеличению адсорбционного взаимодействия.

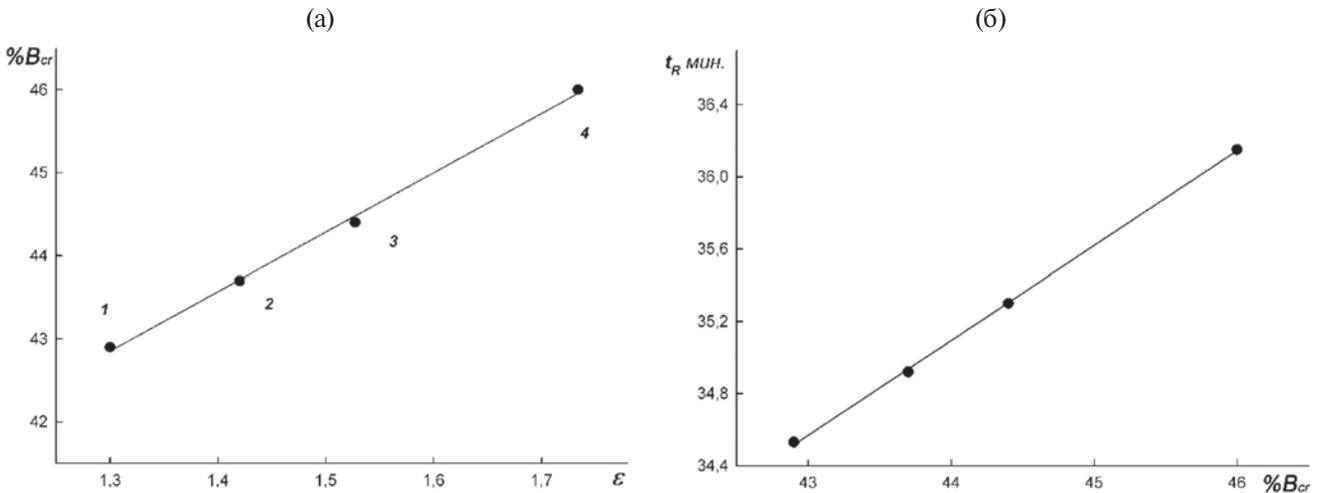


Рис. 2. Корреляция между расчетным критическим составом растворителя B_{cr} и средней энергии звена ϵ по уравнению (3) для регулярного гетерополимера с разной энергией звеньев (а); корреляция между расчетным временем выхода t_R и составом B_{cr} , соответствующим критической точке бинарного гетерополимера в стандартном градиенте ($t, \text{ мин} : B, \%$): (0:0, 100:100) на колонке 4×250 мм (б). Пояснения в тексте.

Включение влияния растворителя в энергию звена среднего гомополимера и выбор состава так, чтобы энергия звена была равна критической для цепи блужданий на кубической решетке

$$\bar{\epsilon} = \epsilon_c = \ln \frac{6}{5},$$

заметно упрощает выражение для Z , и K_d гетерополимера приобретает вид

$$K_d \approx 1 + \frac{2}{D} \frac{5}{6} \cdot \sum_i \beta_i + \frac{2}{D} \frac{5}{6} \cdot \sum_{i < k} \beta_i \beta_k L_{k-i} + \frac{2}{D} \frac{5}{6} \cdot \sum_{i < k < m} \beta_i \beta_k \beta_m L_{k-i} L_{m-k} \dots \quad (4)$$

Статсуммы хвостов T' и T в критической точке равны $5/6$ и единице соответственно, независимо от их длины. Статсумма петли, связывающей звенья k и i на поверхности, определяется как

$$L_{k-i} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ \dots \\ 0 \end{bmatrix} \times W(\epsilon_c)^{k-i-1} \times \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ \dots \\ 0 \end{bmatrix} \quad (5)$$

Выбор средней энергии в виде (3) приводит к тому, что линейный по b член в выражении (4) тождественно равен нулю, и различие в объемах удерживания при вариации последовательности обусловлено различием в двухчастичных (будем

называть их далее для краткости бинарными) взаимодействиях звеньев с поверхностью. Выражение (4) можно рассматривать как разложение статсуммы макромолекулы вблизи критической точки адсорбции по параметру $\beta = (e^{\epsilon - \bar{\epsilon}} - 1)$. Параметр b не зависит от состава растворителя и полностью определяется последовательностью. Он может быть не мал для конкретной реализации последовательности, так что необходимо учитывать все члены ряда (это автоматически учитывается произведением переходных матриц). Заметим, что взаимодействия с поверхностью более высоких порядков для цепи блужданий выражаются через бинарные. Ниже для оценок при выяснении физической причины в различии адсорбционных свойств инвертированных последовательностей мы ограничимся бинарными взаимодействиями.

Разложение статсуммы вблизи критической точки не ограничивает общность рассмотрения: как следует из рис. 2б в градиенте объем удерживания гетерополимера однозначно определяется критической точкой. Можно сказать, что в градиенте в длинной колонке гомополимеры в смеси распределяется по составам растворителя, близким к их критическим точкам, после чего они движутся с одинаковой скоростью, близкой к скорости движения градиента. Таким образом, рассмотрение взаимодействия в критической точке для определенного выше среднего гомополимера справедливо, по крайней мере качественно, и для окрестности критической точки, т.е. для состава растворителя, в котором макромолекула выходит из колонки.

Статсумма (5) петли, связывающей звенья i и k на поверхности, важная для дальнейшего рассмотрения, в критической точке при увеличении

длины цепи быстро становится близкой к таковой для гауссовой цепи, в чем можно убедиться прямым вычислением:

$$L_{k-i} \approx \frac{C}{\sqrt{|k-i|}}$$

где C – константа порядка единицы, а $|k-i|$ – расстояние по цепи между звеньями. Конфигурация гауссовой цепи в критической точке соответствует конфигурации цепи в неограниченном объеме, и статсумма петли, начинающейся и заканчивающейся на поверхности, равна [24]

$$L_{k-i} = \sqrt{\frac{6}{\pi|k-i|}}$$

Для оценки влияния вариации последовательности можно использовать гауссово приближение и тем самым получить аналитические выражения для разницы времен удерживания.

Возвращаясь к элементарной вариации – перестановке групп X и Y , для разницы в объемах удерживания ΔV_R в приближении бинарных взаимодействий получаем выражение

$$\Delta V_R \sim \Delta Z \sim (\beta(X) - \beta(Y)) \cdot \sum_i \left[\beta(i) \left(\frac{1}{\sqrt{|i-i_X|}} - \frac{1}{\sqrt{|i-i_Y|}} \right) \right] \quad (6)$$

В формуле (6) опущены численные коэффициенты. Ниже нас будет в основном интересовать знак различия при перевороте последовательности, так как абсолютное изменение объема удерживания при такой вариации, как правило, незначительно. Изменение объема удерживания пропорционально изменению времени удерживания, будем считать эти переменные эквивалентными.

Структуру уравнения (6) проще всего понять, если воспользоваться диаграммным представлением бинарных взаимодействий (рис. 3). Большинство диаграмм в разнице объемов удерживания (6) взаимно сокращаются, остаются лишь те, которые связывают переставляемые группы X и Y со звеном i в цепи; различие между ними связано с разной длиной петель. Если энергии переставляемых групп отличаются мало, то множитель перед суммой в выражении (6) мал и ΔV_R незначительно. Также различие мало, если профиль энергии вдоль цепи $b(i)$ имеет определенную симметрию относительно переставляемых групп. Например, если переставляются разные концевые группы, а профиль энергии симметричен относительно центра цепи, то различие в объемах удерживания близко к нулю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом сказанного выше рассмотрим разделение инвертированных последовательностей. Времена удерживания пептидов из табл. 1 на разных системах приведены в табл. 3. Заметим, что в инвертированных последовательностях соседи звеньев не меняются, так что упомянутый выше химический фактор влияния, в отличие от перестановок, минимален. На исследованных системах I–III, в которых pH 2.0, наблюдается разделение инвертированных последовательностей, причем знак различия времен удерживания Dt_R для всех систем одинаков.

Рассмотрим далее вопрос о согласованности времен удерживания одних и тех же пептидов в разных градиентах (рис. 4). Такое сравнение важно: в протеомных исследованиях научные коллаборации используют разные протоколы разделения пептидов, и для приведения в базах данных времен удерживания к единой временной шкале часто используется линейное преобразование. Кроме того, в разных градиентах, даже на одной и той же системе, порядок выхода некоторых пептидов может меняться. На рис. 4а приведено сравнение экспериментального времени удерживания t_R исследованных пептидов в градиентах b , c и t_R тех же пептидов в градиенте a на системе I.

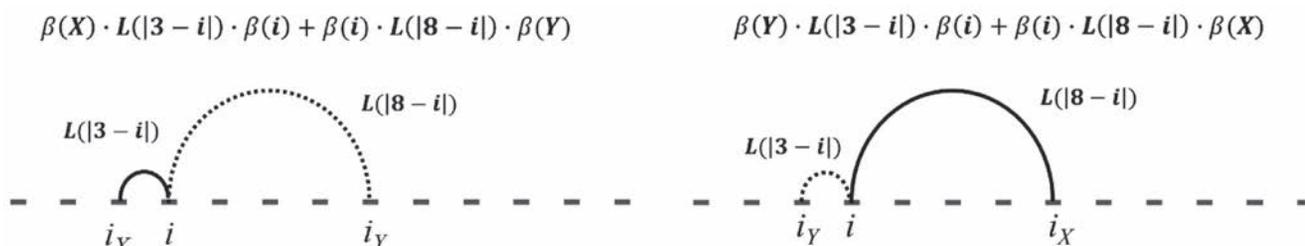


Рис. 3. Диаграммное представление несократимых бинарных взаимодействий для исходной последовательности и последовательности с переставленными звеньями X и Y . L – петли, связывающие переставляемые звенья X ($i = 3$) и Y ($i = 8$) со звеном i . Для получения уравнения (5) необходимо просуммировать разность по всем звеньям цепи i .

Как видно, на этой системе наблюдается линейное соответствие времен удерживания в разных градиентах, и для определения коэффициентов линейного преобразования достаточно небольшого набора пептидов с известными последовательностями. Линейная зависимость имеет место и для градиентов системы IV (рис. 4б).

Однако аналогичное сравнение t_R пептидов в градиентах **b**, **c** и их t_R в градиенте **a**, для системы II демонстрирует нелинейность на одной и той же колонке (рис. 4в). Нелинейность наблюдается и при сравнении t_R для одинаковых во временной шкале градиента **b** в системе I и градиента **a** в системе III (рис. 4г). Таким образом, даже для рассматриваемой нами небольшой выборки пептидов связь времен удерживания в разных градиентах на одной колонке может быть нелинейной. Такая нелинейность, на наш взгляд, затрудняет выравнивание времен удерживания в единой шкале, поскольку для ее корректного учета необходимо гораздо больший набор пептидов с известными последовательностями. По этой причине при выравнивании времен удерживания, полученных в разных протоколах разделения, необходимо убедиться в их линейности. Теоретический расчет времен удерживания в модели *BioLCCC* по уравнениям (1)–(2) предсказывает такую нелинейную зависимость для разных градиентов системы II, и для проверки линейности в разных протоколах разделения при планировании эксперимента можно воспользоваться предварительным теоретическим расчетом.

Сравним далее экспериментальные времена удерживания с рассчитанными по модели *BioLCCC* (рис. 5). Как видно, несмотря на простоту модели, результаты расчета хорошо коррелируют с экспериментом и, что на наш взгляд важнее, правильно предсказывают знак различия времен удерживания инвертированных последовательностей (табл. 3).

Чтобы разобраться в физической причине различий в объемах удерживания инвертированных последовательностей, рассмотрим более детально профиль энергии взаимодействия (рис. 6). Следует отметить, что при рассмотрении взаимодействия биомакромолекул с поверхностью необходимо проводить анализ текста последовательности не в пространстве букв, а в пространстве энергий взаимодействия звеньев. При этом может оказаться, что в пространстве букв никакой периодичности не наблюдается, но профиль энергии взаимодействия демонстрирует определенную периодичность или заметную асимметрию от N- к C-концу. На рис. 6 величина $\Delta\epsilon_i$ представляет собой разницу между энергией взаимодействия звена ϵ_i и средней энергией $\bar{\epsilon}$ вдоль последовательности от N- к C-концу (отрицательная

Таблица 3. Экспериментальные времена удерживания инвертированных пептидов в разных системах разделения и разных pH в сравнении с расчетными

Пептид, №	t_R эксп / t_R теор, мин						t_R эксп, мин			t_R расчет, мин			
	Система I (pH 2.0)			Система II (pH 2.0)			Система III (pH 2.0)		Система IV (pH 8.0)		Skyline SSRCalc [25]	Deep-LC(1)	Deep-LC(2)
	a	b	c	a	b	c	a	b	a	b			
1	8.20/11.57	8.20/10.65	8.20/9.61	16.71/16.80	16.60/16.10	16.49/16.80	2.80/0.70	19.80	13.60	4.09	47.08	12.90	
1'	11.40/14.16	11.30/12.50	11.50/10.80	17.73/17.98	17.85/16.84	17.84/17.97	2.90/0.90	32.10	21.87	5.54	55.29	15.49	
2	15.90/16.57	14.30/13.98	13.00/11.67	20.00/19.32	18.12/17.52	20.08/19.11	3.30/1.20	15.50	12.90	9.73	44.01	15.38	
2'	12.10/12.91	11.90/11.52	11.60/10.12	17.40/17.40	17.10/16.40	17.28/17.40	3.00/0.80	15.20	13.20	6.39	83.61	12.82	
3	35.40/42.56	24.40/28.18	18.30/19.28	38.70/39.59	24.51/28.99	27.20/26.81	17.60/11.50	33.70	22.85	14.60	162.74	34.03	
3'	41.20/54.13	27.50/34.77	20.10/23.04	43.72/48.16	28.96/34.57	28.31/29.64	20.00/15.60	27.43	19.33	10.60	179.63	34.48	
4	21.30/26.24	17.20/19.89	14.60/15.13	29.13/25.34	21.29/21.10	24.74/22.43	6.00/2.70	17.25	14.25	22.99	71.67	21.22	
4'	17.50/22.48	15.10/17.60	13.40/13.78	25.14/22.93	20.21/19.61	23.39/21.27	3.90/2.00	19.85	15.67	26.66	67.88	17.85	
5	37.20/48.39	25.20//30.03	18.50/20.16	38.49/43.12	25.74/31.05	27.11/27.71	19.00/13.70	38.65	25.00	25.50	143.07	31.58	
5'	44.10/55.50	29.00/35.26	20.60/23.20	42.99/49.94	29.50/35.48	28.44/29.93	21.50/17.00	32.50	21.90	29.96	162.18	35.49	

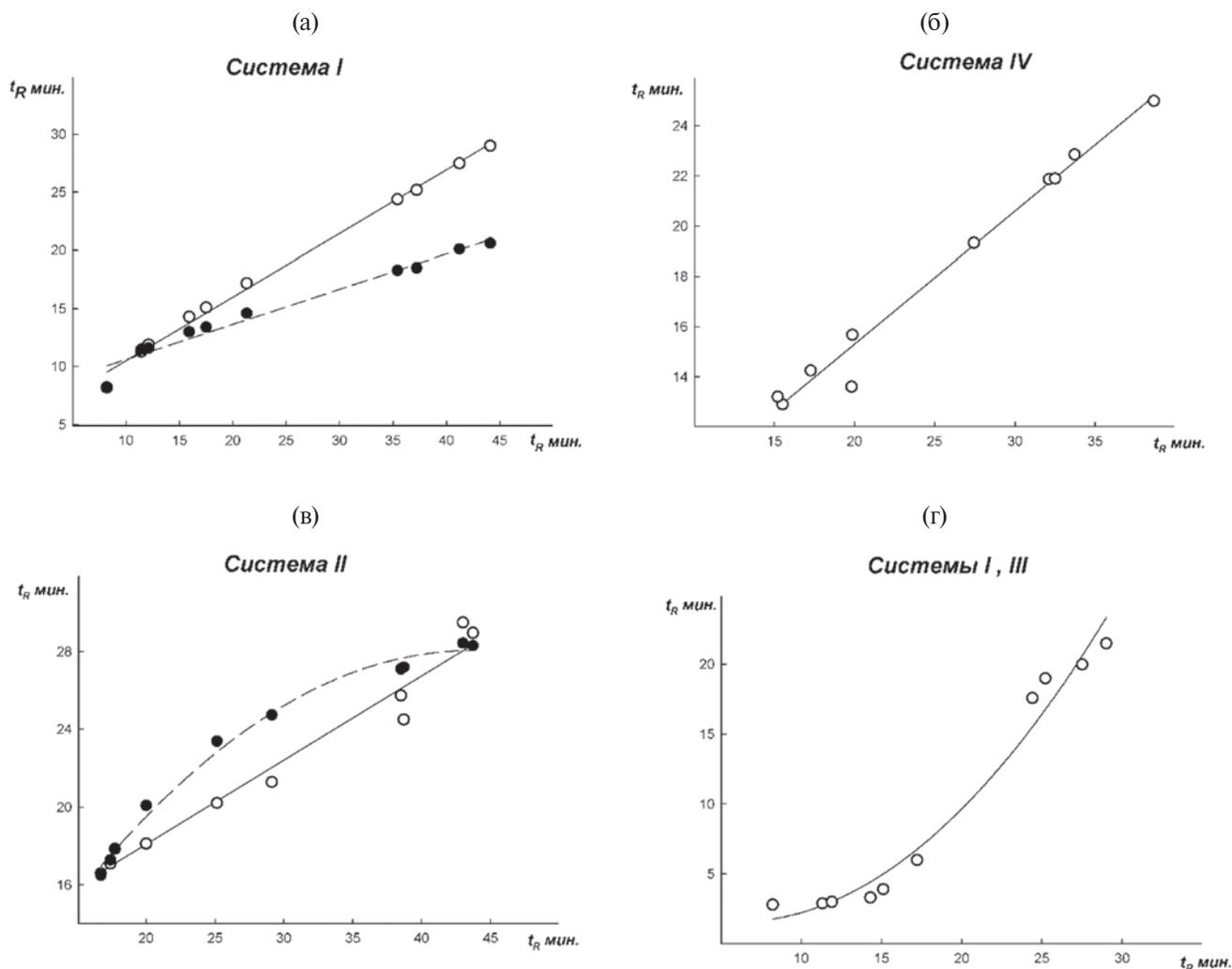


Рис. 4. Сравнение экспериментальных времен удерживания t_R пептидов в разных градиентах на разных системах: а – система I, градиент *b* (светлые точки) и градиент *c* (темные), абсцисса, относительно градиента *a*, ордината; б – система IV, градиент *b* относительно градиента *a*; в – система II, градиент *b* (светлые точки) и градиент *c* (темные) относительно градиента *a*; г – градиент *a* система III относительно градиента *b* система I.

величина соответствует отталкиванию звена от поверхности, положительная – притяжению).

Вид профиля энергии на рис. 6 позволяет качественно понять знак различия во взаимодействии при инверсии последовательности. Действительно, в условиях разделения при pH 2.0 N-конец оказывается положительно заряженным, NH_3^+ . Заряженность звена вне зависимости от знака означает его сильное отталкивание от гидрофобной поверхности в водном растворе. Причина этого в том, что «изображение» заряда в границе вода–гидрофобная поверхность оказывается того же знака (см. подробнее в работе [25] для аналогичного вопроса о взаимодействии заряженных аминокислот с гидрофобным ядром глобулярных белков). Такое отталкивание приводит к тому, что N-конец оказывается удаленным от поверхности, как и близкие связанные с ним звенья. Это

уменьшает вероятность взаимодействия близких к N-концу звеньев с поверхностью. Следовательно, если адсорбирующиеся (гидрофобные) звенья располагаются в цепи вблизи N-конца, то при перевороте последовательности они окажутся вблизи гораздо слабее отталкивающегося C-конца, вероятность их взаимодействия с поверхностью возрастет и адсорбционное взаимодействие всей цепи увеличится. Знак различия во временах удерживания инвертированных последовательностей и профили энергии на рис. 6 полностью соответствуют этим качественным рассуждениям.

Рассмотрим данный вопрос количественно, для чего найдем во втором порядке разложения разницу в объемах удерживания инвертированных последовательностей в соответствии с выражением (6). Инверсию последовательности можно интерпретировать как перестановку конечных

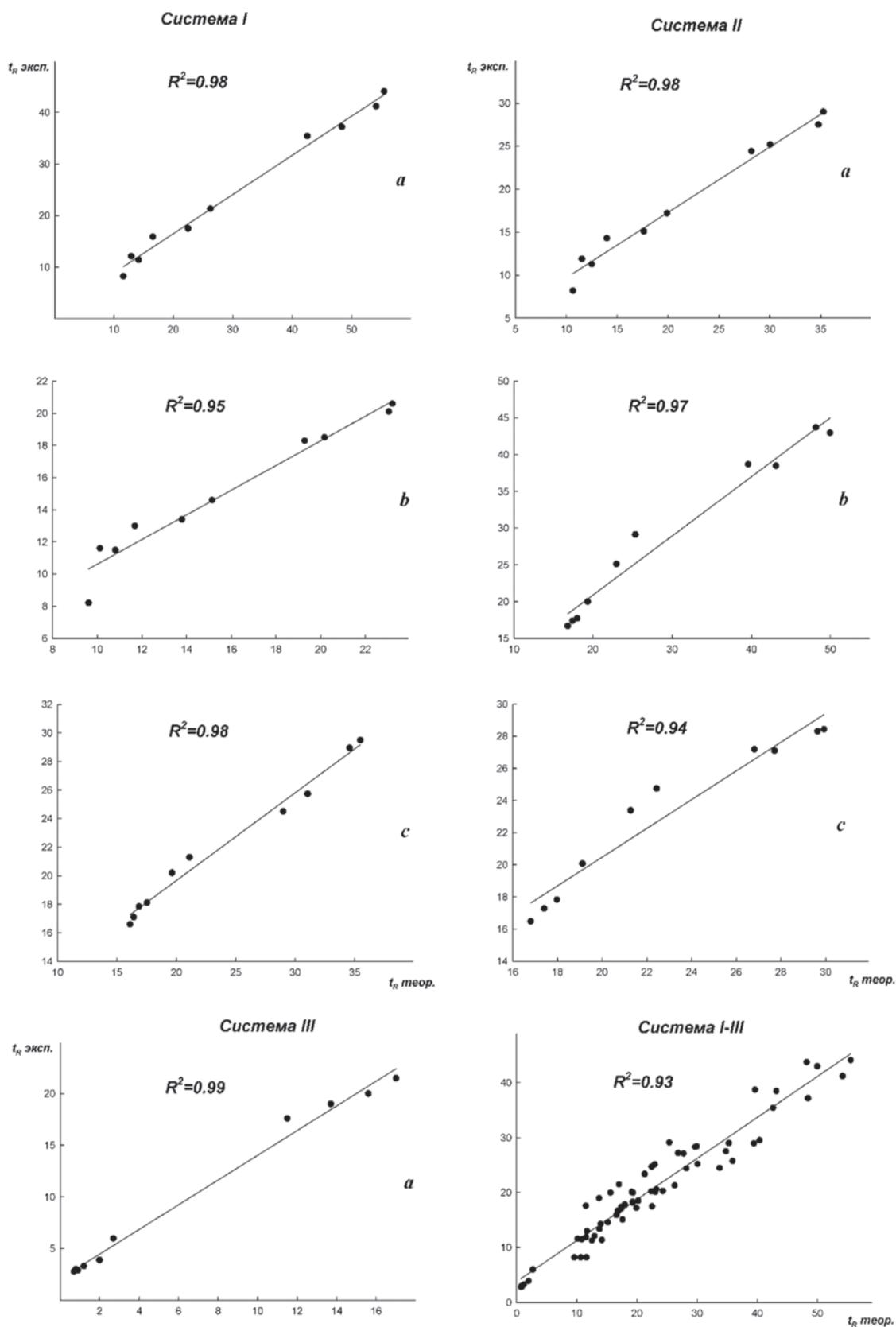


Рис. 5. Сравнение расчетных $t_{R\text{теор}}$ и экспериментальных $t_{R\text{эксп}}$ времен удерживания (табл. 3) для разных градиентов для системы I (a, b, c), II (a, b, c) и III (a), а также общая корреляция для систем I – III, pH 2.0.

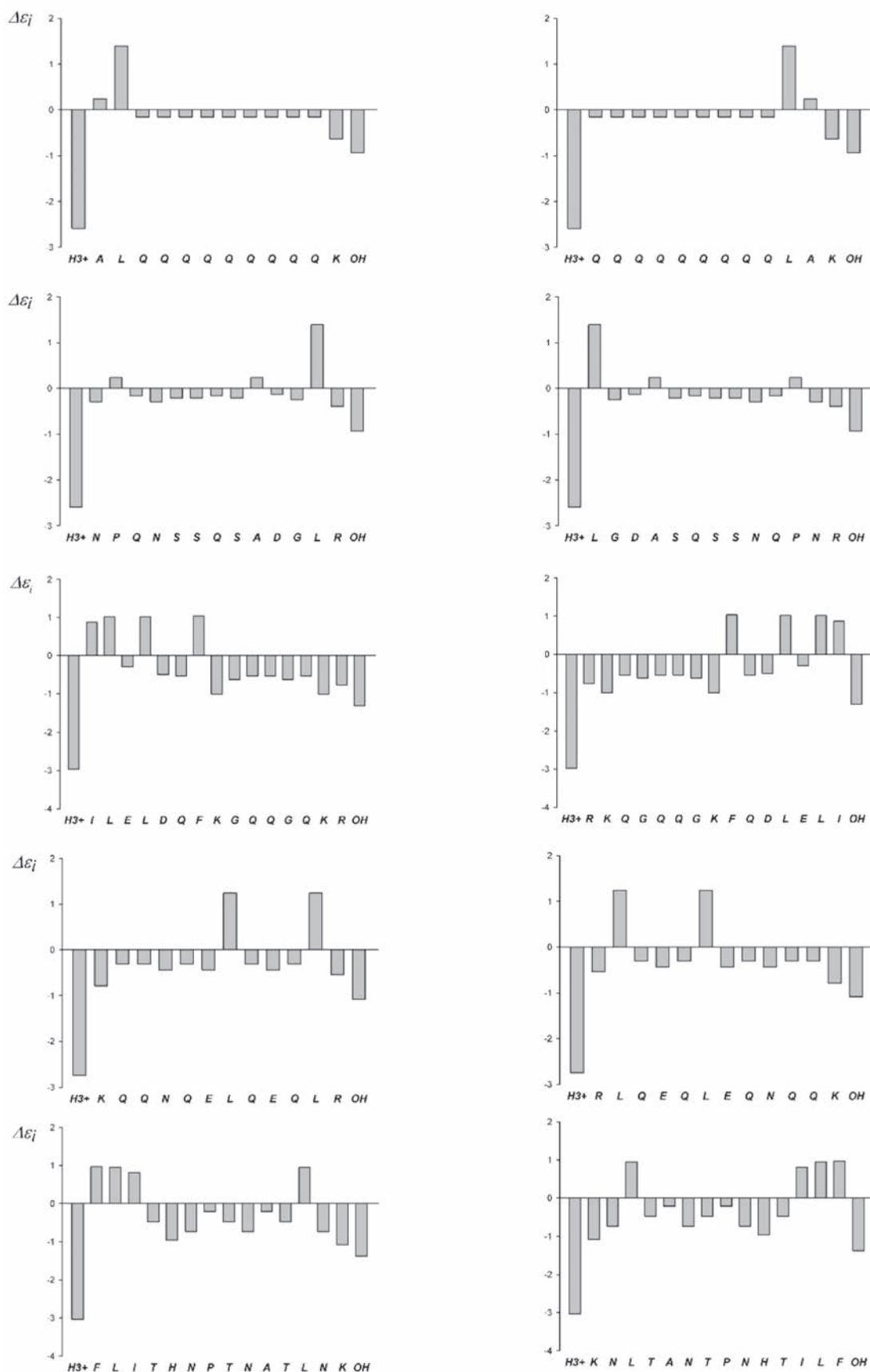


Рис. 6. Профиль энергии взаимодействия звеньев от N- к С-концу для последовательностей в табл. 1.

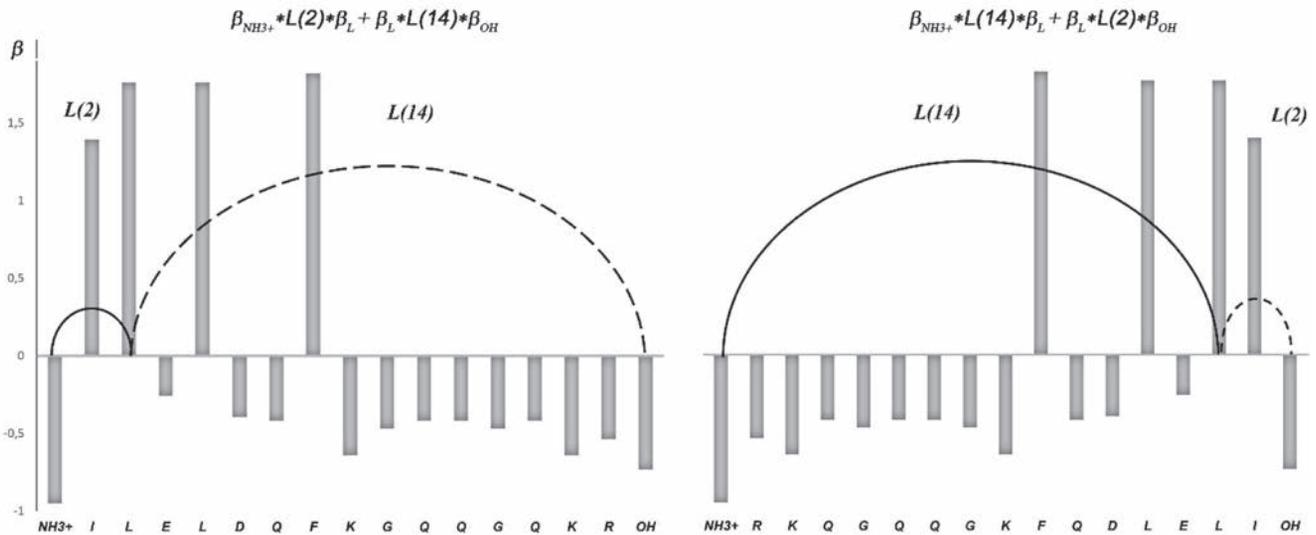


Рис. 7. Диаграммное представление бинарных взаимодействий при инвертировании последовательности 3 из табл. 1. Для примера показаны несократимые диаграммы, связывающие аминокислотный остаток *L* с концевыми группами; для получения разницы необходимо просуммировать по всем остальным остаткам между концами цепи.

групп. Несократимые диаграммы, которые связывают концевые группы с остатком *i* в цепи, приведены на рис. 7 для одной из последовательностей табл.1. Суммирование по всем звеньям между N-и C-концами приводит к выражению

$$\Delta t_R \sim \Delta V_R \sim (\beta(NH_3) - \beta(OH)) \cdot \sum_i \left[\beta(i) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{|i-1|}} - \frac{1}{\sqrt{|i-n|}} \right) \right]. \quad (7)$$

Как видно, различие объемов удерживания при инвертировании последовательности связано с различием в длине петель, связывающих звено *i* с концевыми группами.

Расчет DV_R по уравнению (7) в приближении бинарных взаимодействий дает правильный знак изменения адсорбционного взаимодействия для пептидов 3, 4 и 5 и их порядка выхода, соответствующего табл. 3. Для последовательностей 1 и 2 после инвертирования последовательности необходимо переместить звенья *K* и *R* к C-концу, например, для последовательности *I'* путем серии перестановок $2K \ll 11Q, 11K \ll 12L, 12K \ll 13A$. Учесть влияние таких перестановок на изменение объема удерживания можно с помощью диаграмм, аналогичных рис. 3, и уравнения (6), в котором задействованы петли, связывающие звенья цепи с переставляемыми. В результате для пептидов 1 и 2 в приближении бинарных взаимодействий также получается правильный знак изменения объема удерживания DV_R .

Рассмотрим качественно разделение инвертированных последовательностей в системе *IV* при pH 8.0. В этих условиях N-конец нейтрализуется, и его отталкивание от гидрофобной поверхности резко уменьшается, а C-конец заряжается отрицательно и начинает отталкиваться от поверхности, уменьшая вероятность взаимодействия с поверхностью связанных с ним звеньев. Таким образом, можно предположить, что при pH 8.0 знак разности времен удерживания при инверсии последовательности должен измениться. Теперь, если гидрофобные адсорбирующиеся звенья находятся вблизи C-конца, то вероятность их взаимодействия с поверхностью должна уменьшиться. В целом данная тенденция в изменении знака различия при pH 8.0 наблюдается для пептидов 3, 4, 5 (табл. 3). Однако для пептидов 1, 2 такая перемена знака DV_R не наблюдается. Для выяснения этого вопроса необходимо переопределить энергии взаимодействия аминокислотных остатков при pH 8.0 по стандартным последовательностям, так как изменение pH влияет на адсорбционное взаимодействие не только концевых групп. Мы предполагаем, что при pH 8.0 степень заряженности C-конца не столь высокая, чтобы заметно изменить характер взаимодействия связанных с ним звеньев и, следовательно, порядок выхода пептидов.

Расчет влияния инверсии последовательности в рамках модифицированной аддитивной модели для систем с pH 2.0, выполненный нами в программе Skyline Proteomics [26], в которую встроен калькулятор времен удерживания пептидов SSR-Calcul [6, 7], также дает правильный знак различия объемов удерживания, за исключением последовательностей 3 и 4 (табл. 3). Поправки, вводимые

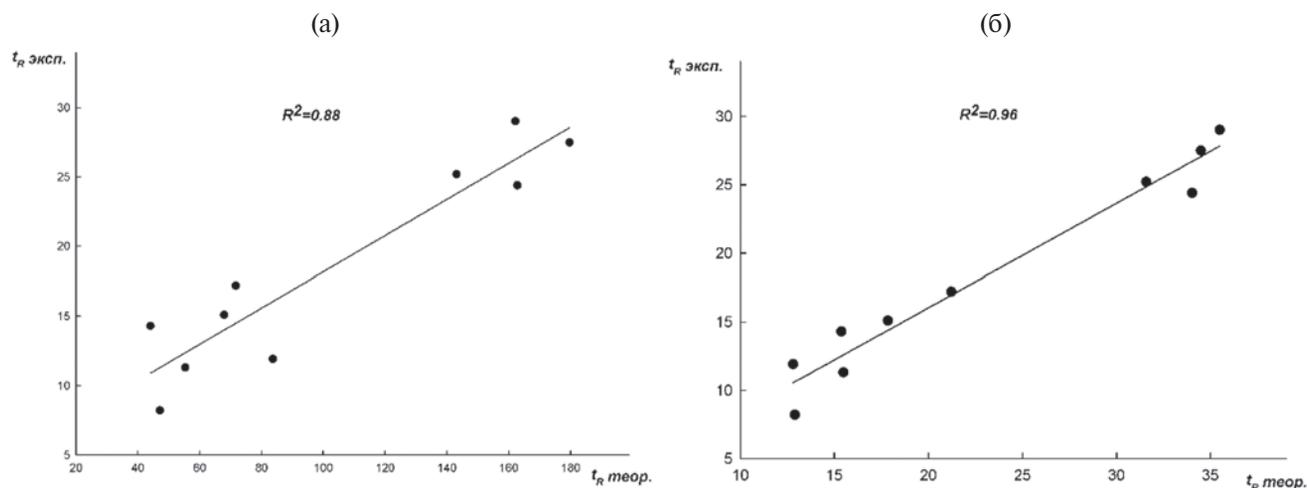


Рис. 8. Корреляция между экспериментальными $t_{R\text{эксп}}$ и рассчитанными в программе DeepLC $t_{R\text{теор}}$ временами удерживания инвертированных пептидов: а – тренировочный набор из 1366 пептидов в неизвестном градиенте, б – тот же набор в градиенте **б** системы **1** с теоретическими по модели *BioLCCC* временами удерживания.

в аддитивную модель в программе SSRCalc, основаны на влиянии заряженного N-конца на адсорбционное взаимодействие ближайших к этому концу аминокислотных остатков, так что данные поправки должны давать правильную картину. По сути, это альтернативный способ учета связанности звеньев в цепь вблизи заряженной группы, аналогичный качественному рассмотрению влияния инверсии на рис. 6. Расхождения с экспериментом для последовательностей 3 и 4 могут быть связаны с тем, что мы использовали некоммерческий вариант программы, возможно, не оптимальный для исследованных в работе градиентов. В отличие от работы [6, 7] модель *BioLCCC* дает правильный знак различия в удерживании инвертированных последовательностей для всех градиентов, не вводя никаких дополнительных поправочных коэффициентов и оставаясь в рамках минимального возможного для описания разделения пептидов числа (20) энергий адсорбции аминокислотных остатков.

Сравним также экспериментальные результаты с расчетом по модели Deep LC [12], используемой для предсказания времен удерживания вариант обучаемой нейронной сети. В версии 2.2.26. модели в качестве обучающей выборки первоначально был взят набор из 1366 известных последовательностей пептидов с соответствующими временами удерживания в некотором неизвестном градиенте, DeepLC(1) (табл. 3). На рис. 8а показана корреляция между предсказанными с таким набором и экспериментальными временами удерживания для системы **1 б**. Как видно, получающаяся при таком тренировочном наборе корреляция не слишком хорошая и знак различия объемов удерживания для некоторых последовательностей не соответствует эксперименту. Если в качестве обучающей выборки взять

те же 1366 последовательностей, но использовать для них времена удерживания, рассчитанные по модели *BioLCCC* для системы **1 б**, то корреляция заметно улучшается (DeepLC(2), табл. 3, рис. 8б). Знак различия в объемах удерживания инвертированных последовательностей при этом становится соответствующим эксперименту.

Аналогичные результаты сравнения с DeepLC получаются и для других исследованных нами систем разделения. Тем самым можно сделать вывод о том, что в качестве обучающей выборки в программе DeepLC можно использовать расчётные величины времен удерживания. Это может оказаться полезным в том случае, когда по каким-то причинам отсутствует набор известных последовательностей и их времен удерживания в градиенте, в котором проводится разделение неизвестного набора пептидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно сказать, что модель *BioLCCC*, основанная на модели адсорбции цепи случайных блужданий, дополненная феноменологическими параметрами энергий адсорбции аминокислотных остатков, дает правильное понимание физической причины изменения адсорбционных свойств пептидов при инверсии последовательности. Как показано, причина заключается в различии статстумм петель, связывающих концевые группы с другими звеньями в цепи. Влияние концевых групп на адсорбционное взаимодействие какого-то аминокислотного остатка проявляется через вероятность столкновения этого остатка с поверхностью. Отталкивающаяся от гидрофобной поверхности заряженная концевая группа существенно уменьшает вероятность стол-

кновения близких к ней аминокислотных остатков с поверхностью, в то время как для удаленных по цепи звеньев её влияние быстро затухает.

В исследованных пептидах определяющим для изменения адсорбционных свойств при инверсии последовательности является, по-видимому, физический фактор. Инверсию последовательности можно трактовать как перестановку концевых групп, имеющих разную энергию взаимодействия с поверхностью. Если в гомополимере такая перестановка не приводит к изменению адсорбционных свойств всей цепи, то гетерогенность цепи пептида как бы усиливает воздействие перестановки на адсорбционные свойства. В исследованных пептидах переставлялись группы с заметно различающимися энергиями адсорбции, что приводило к заметному коэффициенту перед суммой в уравнениях (6) и (7). Однако в других случаях, когда переставляются звенья, не столь различные по своим адсорбционным свойствам, или цепь имеет определенную симметрию вдоль последовательности в пространстве энергий взаимодействия звеньев, эффект перестановки концевых групп или инверсии последовательности может быть не столь заметен и не соответствовать рассматриваемой модели. Для уточнения описания необходимо будет вводить коррекцию энергии взаимодействия звена в зависимости от соседей по цепи. Хотя идейно такую коррекцию в модель *BioLCCC* ввести не сложно, для экспериментального определения коэффициентов коррекции необходимо провести большую работу по синтезу соответствующих моделей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-14-00229-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ivanov M.V., Bubis Ju.A., Gorshkov V., Tarasova I.A., Levitsky L.I., Lobas A.A., Solovyeva E.M., Pridatchenko M.L., Kjeldsen F., Gorshkov M.V.* // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 6. P. 4326.
2. *Guo D., Mant C.T., Taneja A.K., Parker J.M.R., Hodges R.S.* // *J. Chromatogr.* 1986. V. 359. P. 499.
3. *Mant C.T., Lorne Burke T.W., Black J.A., Hodges R.S.* // *J. Chromatogr.* 1988. V. 458. P. 193.
4. *Gilar M., Hie H.W., Jaworski A.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 265.
5. *Azarova I.N., Baram G.I., Gol'dberg E.L.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2006. V. 32. № 1. P. 50.
6. *Krokhin O.V., Craig R., Spicer V., Ens W., Standing K.G., Beavis R.C., Wilkins J.A.* // *Mol. Cell Proteom.* 2004. V. 3. № 9. P. 908.
7. *Krokhin O.V.* // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 22. P. 7785.
8. *Reimer J., Spicer V., Krokhin O.V.* // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1256. P.160.
9. *Palmblad M., Ramström M., Markides K. E., Håkansson P., Bergquist J.* // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 5826.
10. *Guan, S., Moran, M. F., Ma, B.* // *Mol. Cell. Proteom.* 2019. V. 18. P. 2099.
11. *Gessulat S., Schmidt T., Zolg D. P., Samaras P., Schnatbaum K., Zerweck J., Knaute T., Rechenberger J., Delanghe B., Huhmer A., Reimer U., Ehrlich H.-Ch., Aiche S., Kuster B., Wilhelm M.* // *Nat. Methods* 2019. V. 16. P. 509.
12. *Bouwmeester R., Gabriels R., Hulstaert N., Martens L., Degroeve S.* // *Nat. Methods* 2021. V. 18. P. 1363.
13. *Entelis S.G., Evreinov V.V., Gorshkov A.V.* // *Adv. Polym. Sci.* 1986. V. 76. P. 129.
14. *Entelis S.G., Evreinov V.V., Kuzaev A.I.* // *Reactive Oligomers.* Utrecht: VSP, 1989.
15. *Pasch H., Trathnigg B.* // *HPLC of Polymers.* Berlin: Springer, 1999.
16. *Gorshkov A.V., Tarasova I.A., Evreinov V.V., Savitski M.M., Nielsen M.L., Zubarev R.A., Gorshkov M.V.* // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. № 22. P. 7770.
17. *Gorshkov A. V., Evreinov V. V., Tarasova I. A., Gorshkov M. V.* // *Polymer Science B.* 2007. V. 49. № 3–4. P. 93.
18. *Tarasova I. A., Gorshkov A. V., Evreinov V. V., Adams K., Zubarev R. A., Gorshkov M. V.* // *Polymer Science A.* 2008. V. 50. № 3. P. 309
19. *Tarasova I.A., Goloborodko A.A., Perlova T.Y., Pridatchenko M.L., Gorshkov A.V., Evreinov V.V., Ivanov A.R., Gorskov M.V.* // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 6562.
20. *Gorshkov A. V., Goloborod'ko A. A., Pridatchenko M. L., Tarasova I. A., Rozdina I. G., Evreinov V. V., Gorshkov M. V.* // *Polymer Science A.* 2017. V. 59. № 3. P. 354.
21. *Tarasova I.A., Goloborodko A.A., Perlova T.Y., Pridatchenko M.L., Gorshkov A.V., Evreinov V.V., Ivanov A.R., Gorshkov M.V.* // *Anal. Chem.* 2015 V. 87. P. 6562.
22. *Snyder L.R.* // *Principles of Adsorption Chromatography.* New York: M. Dekker, 1968.
23. *Обухов С. П.* // *Журн. эксперим. и теорет. физики.* 1987. Т 93. № 6. С. 1973.
24. *Eisenriegler E., Kremer K., Binder K.* // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 77. P. 6296.
25. *Финкельштейн А. В., Птицын О. Б.* // *Физика белка.* М.: Книжный дом Университет, 2012.
26. *MacLean B., Tomazela D. M., Shulman N., Chambers M., Finney G. L., Frewen B., Kern R., Tabb D. L., Liebler D. C., MacCoss M. J.* // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. I. 7. P. 966.

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС 77 - 83243 от 12 мая 2022 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати	г.	Формат	$60 \times 88\frac{1}{8}$	Усл. печ. л.	Уч.-изд. л.
Тираж	экз.	Зак.	3	Цена свободная	

Учредители: Российская академия наук,
Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24 ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»
121099, Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

16+

Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке

Автоматика и телемеханика
 Агрехимия
 Азия и Африка сегодня
 Акустический журнал
 Астрономический вестник. Исследования Солнечной системы
 Астрономический журнал
 Биологические мембраны
 Биология внутренних вод
 Биология моря
 Биоорганическая химия
 Биофизика
 Биохимия
 Ботанический журнал
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук
 Вестник древней истории
 Вестник Российской академии наук
 Вестник российской сельскохозяйственной науки
 Водные ресурсы
 Вопросы истории естествознания и техники
 Вопросы ихтиологии
 Вопросы языкознания
 Вулканология и сейсмология
 Высокомолекулярные соединения. Серия А
 Высокомолекулярные соединения. Серия Б
 Высокомолекулярные соединения. Серия С
 Генетика
 Геология рудных месторождений
 Геомагнетизм и аэронавигация
 Геоморфология и палеогеография
 Геотектоника
 Геохимия
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология
 Государство и право
 Дефектоскопия
 Дифференциальные уравнения
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах
 Журнал аналитической химии
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова
 Журнал вычислительной математики и математической физики
 Журнал неорганической химии
 Журнал общей биологии
 Журнал общей химии
 Журнал органической химии
 Журнал прикладной химии
 Журнал физической химии
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии
 Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Записки Российского минералогического общества
 Зоологический журнал
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая
 Известия Российской академии наук. Серия географическая
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка
 Известия Российской академии наук. Серия физическая
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана
 Известия Российской академии наук. Энергетика
 Известия Русского географического общества
 Исследование Земли из Космоса
 Кинетика и катализ
 Коллоидный журнал
 Координационная химия
 Космические исследования
 Кристаллография
 Латинская Америка
 Лёд и Снег
 Лесоведение
 Литология и полезные ископаемые
 Мембраны и мембранные технологии
 Металлы
 Микология и фитопатология
 Микробиология
 Микроэлектроника
 Молекулярная биология
 Нейрохимия
 Неорганические материалы
 Нефтехимия
 Новая и новейшая история
 Общественные науки и современность
 Общество и экономика
 Океанология
 Онтогенез
 Палеонтологический журнал
 Паразитология
 Петрология
 Письма в Астрономический журнал
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования
 Почвоведение
 Приборы и техника эксперимента
 Прикладная биохимия и микробиология
 Прикладная математика и механика
 Проблемы Дальнего Востока
 Проблемы машиностроения и надежности машин
 Проблемы передачи информации
 Программирование
 Психологический журнал
 Радиационная биология. Радиоэкология
 Радиотехника и электроника
 Радиохимия
 Расплавы
 Растительные ресурсы
 Российская археология
 Российская история
 Российская сельскохозяйственная наука
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
 Русская литература
 Русская речь
 Сенсорные системы
 Славяноведение
 Современная Европа
 Социологические исследования
 Стратиграфия. Геологическая корреляция
 США & Канада: экономика, политика, культура
 Теоретические основы химической технологии
 Теплофизика высоких температур
 Успехи современной биологии
 Успехи физиологических наук
 Физика Земли
 Физика и химия стекла
 Физика металлов и металловедение
 Физика плазмы
 Физикохимия поверхности и защита материалов
 Физиология растений
 Физиология человека
 Химическая физика
 Химия высоких энергий
 Химия твердого топлива
 Цитология
 Человек
 Экология
 Экономика и математические методы
 Электрохимия
 Энтомологическое обозрение
 Этнографическое обозрение
 Ядерная физика