

СВЯЗЬ СТРОЕНИЯ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ С ИХ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ В РАСТВОРАХ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2023 г. Е. М. Зубанова^{1*}, Д. А. Рубцов¹, Е. Н. Голубева¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: kate_zub@mail.ru

Поступила в редакцию 16.01.2023;

после доработки 16.02.2023;

принята в печать 20.02.2023

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (методика спинового зонда) была применена для выяснения влияния структуры молекул на примере нитроксильных радикалов на их локализацию в водных растворах термочувствительного поли-N-изопропилакриламида в ходе фазового перехода клубок—глобула. Показано, что гидрофобный зонд малого размера 4-гидроксibenзоато-ТЕМПО практически полностью (до 95% от общего количества) захватывается образующейся в ходе фазового перехода глобулой, в то время как крупный зонд метил-5-доксилстеарат, содержащий длинный алкильный хвост, не заходит в полимерную глобулу.

Ключевые слова: термочувствительные полимеры, нитроксильные радикалы, переход клубок—глобула, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса.

DOI: 10.31857/S0207401X23070191, **EDN:** YGQTXS

1. ВВЕДЕНИЕ

Термочувствительные полимеры — высокомолекулярные соединения, которые претерпевают резкое, нелинейное изменение физических свойств, прежде всего растворимости или, в случае сшитого геля, объемных параметров в ответ на изменение температуры [1–3]. Классическим термочувствительным полимером является поли-N-изопропилакриламид (PNIPAM), который содержит в своем звене гидрофобные алкильные фрагменты и гидрофильные амидные группы [4]. При температурах ниже нижней критической температуры растворения (НКТР), равной 32 °С, этот полимер растворим в воде за счет образования водородных связей между молекулами воды и полимерными цепями [5]. По достижении НКТР водородные связи разрушаются, гидрофобные взаимодействия превалируют, что приводит к переходу полимерных цепей из состояния неориентированного клубка в компактную глобулу [6]. Данный переход лежит в физиологическом диапазоне температур, что позволяет использовать PNIPAM в биомедицине [1], например, в системах контролируемой доставки лекарств [7], тканевой инженерии [8] или в качестве покрытий и подложек для получения клеточных пластов [9].

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в рамках методик спинового зонда и спиновой метки активно применяется для определения свойств полимерных систем [10], в том числе для оценки подвижности цепей полимера [11–13], вязкости [14], микрополяриности [15] и pH [16] в растворах и гелях. В случае растворов термочувствительных полимеров методика спинового зонда позволяет делать выводы о структуре и динамике неоднородностей, образующихся в растворах при повышении температуры за счет захвата зонда образующейся полимерной глобулой [17]. В качестве спиновых зондов обычно используют стабильные нитроксильные радикалы, так как их магнитно-резонансные (тензор сверхтонкого взаимодействия (СТВ), g-тензор) и динамические (время вращательной корреляции) параметры зависят от окружения зонда. Ранее с использованием нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила (ТЕМПО) методика спинового зонда была применена как для определения НКТР в водных растворах PNIPAM [18] и его сополимеров [19], так и для оценки микрополяриности и микродинамики образующихся в ходе фазового перехода клубок—глобула неоднородностей. Было показано, что спектр ЭПР радикала ТЕМПО в водном

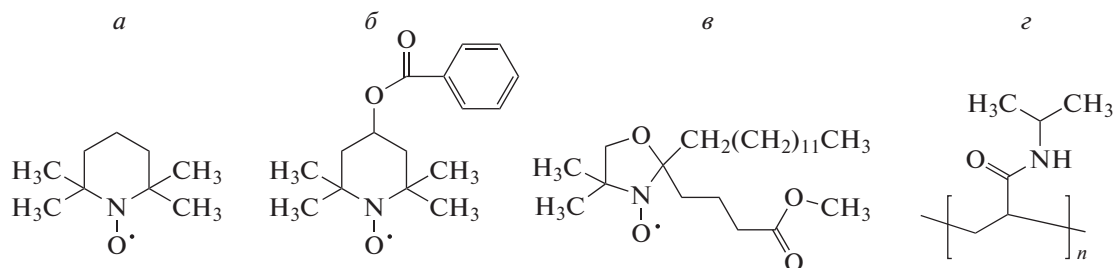


Рис. 1. Структурные формулы нитроксильных зондов TEMPO (а), 4-гидроксibenзоато-TEMPO (б), метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты (в) и поли-N-изопропилакриламида (PNIPAM) (г).

растворе PNIPAM, зарегистрированный выше НКТР, представляет собой сумму спектров радикалов во внешней водной среде и в полимерной глобуле, при этом доля зондов в глобуле составляет около 70% [18].

Одним из факторов, который определяет распределение нитроксильного радикала между гидрофобной полимерной глобулой и внешним водным раствором, является сродство к воде, т.е. гидрофильность или гидрофобность (лиофильность) зонда [20]. Так, гидрофильный радикал, 4-гидрокси-ТЕМПО [21] и положительно заряженный 4-триметиламино-ТЕМПО (CAT1) [20] практически не заходят в глобулы полиоксамеров и PNIPAM в ходе фазового перехода клубок—глобула. Размер зонда также может оказывать влияние на его локализацию в растворах термочувствительных полимеров и характеризовать размер глобул. Например, спин-меченные производные стеариновой кислоты заходят в объемные (около 20 нм) гидрофобные полости полимеров на основе полиэтиленгликоля [15, 22, 23].

Цель данной работы — выяснение влияния гидрофобности и размера нитроксильного радикала на его локализацию в водных растворах поли-N-изопропилакриламида в ходе фазового перехода клубок—глобула. Влияние гидрофобности зонда оценивали путем сравнения коэффициентов распределения амфифильного радикала TEMPO ($\log P_{ow} = 1.79$) [24] и более гидрофобного радикала 4-гидроксibenзоато-ТЕМПО (4-НВТ, $\log P_{ow} = 2.63$) [25] в системе глобула—водный раствор. Гидрофобный радикал, имеющий длинный алкильный заместитель — метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты (5-DSM, $\log P_{ow} = 6.12$) был выбран для оценки влияния размера зонда. Производные доксил-стеариновой кислоты часто применяют для изучения структуры гидрофобных липидных систем, с которыми они образуют мицеллы [26]. Для получения индивидуальных спектров зондов в полимерных глобулах была ис-

пользована методика подавления сигнала радикалов в водной фазе за счет спин-обменного взаимодействия с парамагнитными ионами меди (II) [27].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стабильные нитроксильные радикалы 4-гидрокси-2,2,6,6-тетрамethylпиперидин-1-оксилбензоат, 2-этил-2-(15-метокси-15-оксопентадецил)-4,4-диметил-3-оксазоли-динилоксил, а также дигидрат хлорида меди (II) ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) компании Sigma-Aldrich (USA) использовали без дополнительной очистки. Структурные формулы исследуемых радикалов, а также радикала TEMPO представлены на рис. 1а–в.

Поли-N-изопропилакриламид (PNIPAM), любезно предоставленный нам сотрудниками лаборатории катализа полимеризационных процессов НИИ физико-химических проблем БГУ (Минск, Беларусь), был синтезирован (рис. 1г) путем радикальной полимеризации с использованием AIBN в качестве инициатора [18]. Согласно данным гель-проникающей хроматографии средняя числовая молекулярная масса полимера составила $M_n = 175.5$ кДа, коэффициент полидисперсности $D = 4.3$.

Водные 10%-ные растворы PNIPAM готовили путем растворения необходимых количеств полимера в предварительно приготовленных ~0.2 мМ водных растворах радикалов 4-НВТ и 5-DSM в течение 24 ч при температуре 4°C. Образцы (8–10 мг) полученных растворов помещали в капилляры диаметром 2 мм и запаивали для предотвращения испарения воды. Для регистрации индивидуальных спектров зондов в глобулах в исследуемые растворы добавляли кристаллический дигидрат хлорида меди $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ для получения 0.1 М растворов ионов Cu^{2+} , как рекомендовано в работе [18].

Спектры ЭПР регистрировали с помощью радиоспектрометра X-диапазона EMX-500 при тем-

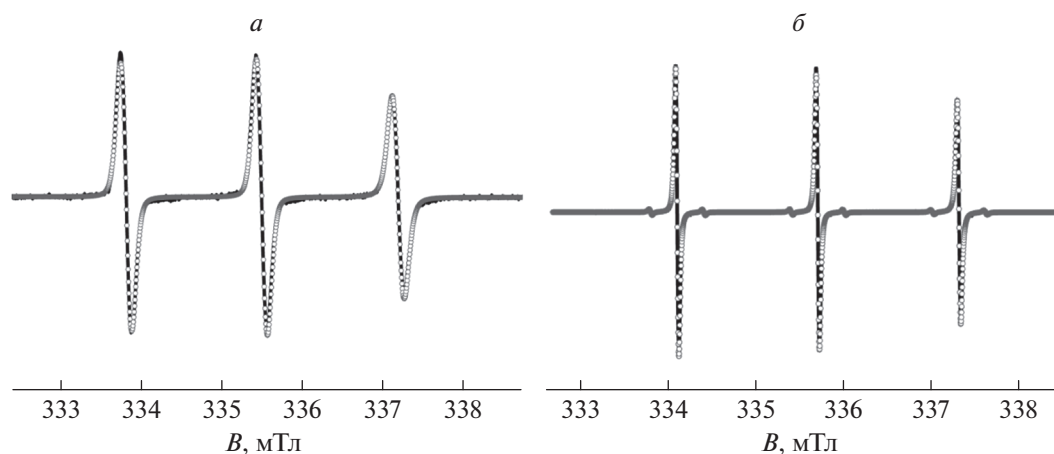


Рис. 2. Спектры ЭПР нитроксильных зондов в 10%-ном водном растворе PNIPAM, зарегистрированные при комнатной температуре (22°C): 4-гидроксibenзоато-ТЕМПО-бензоат (а), метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты (б). Сплошные линии — экспериментальные спектры, кружочки — результаты моделирования.

пературах 22–90°C с использованием температурной приставки (Bruker, Germany). Точность термостатирования составила $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Спектры регистрировали при мощности 0.8 мВт и амплитуде модуляции 0.02–0.08 мТл, развертка составила 8–12 мТл. При этих условиях не наблюдали искажение формы спектральных линий и насыщение сигнала.

Математическое моделирование спектров ЭПР проводили с использованием программного пакета Matlab и модуля EasySpin [28]. Моделирование спектров радикала 4-HBT и спектров радикала 5-DSM при температуре ниже 30°C проводили в рамках модели свободного изотропного вращения, реализованной в EasySpin как функция “garlic”. Моделирование спектров радикала 4-HBT при температуре выше 30°C проводили в рамках модели анизотропного заторможенного вращения [29], реализованной в EasySpin как функция “chili”. Форму линий спектра ЭПР описывали как конволюцию гауссовой и лоренцевой функций. В качестве начальных значений магнитно-резонансных параметров (тензоров СТВ и g -тензоров) радикала 4-HBT использовали данные из работы [30]. Соответствующие параметры радикала 5-DSM были оценены из экспериментальных спектров по расстоянию между крайними компонентами спектра ЭПР и положению центра сигнала. В случае радикала 5-DSM, помимо сверхтонкого расщепления на ядре ^{14}N , при математическом моделировании спектров ЭПР учитывали сверхтонкое расщепление на ядрах ^{13}C метильных заместителей и атомов углерода оксазолидинового кольца. Значение изотропной константы СТВ (0.6 мТл) на ядрах ^{13}C в ходе моделирования

не варьировали. Качество моделирования оценивали путем вычисления среднеквадратичного отклонения разностных спектров, которое для всех теоретических спектров составило менее 1%.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР радикалов 4-HBT и 5-DSM в 10%-ном водном растворе PNIPAM при комнатной температуре представляют собой триплет, обусловленный сверхтонким расщеплением на ядрах азота ^{14}N , имеющих ядерный спин $I = 1$ (рис. 2). В спектрах радикала 5-DSM, помимо расщепления на ядрах азота, наблюдается дополнительное малоинтенсивное расщепление каждой компоненты, вызванное сверхтонким взаимодействием с ядрами ^{13}C ($I = 1/2$). Форма линий спектров соответствует изотропному быстрому вращению нитроксильных радикалов в растворе (частицы типа А). Значения констант СТВ и времен вращательной корреляции, полученные путем моделирования экспериментальных спектров в рамках модели быстрого вращения, представлены в табл. 1.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР радикала 4-HBT в 10%-ном водном растворе PNIPAM при различных температурах. При повышении температуры от 22 до 27°C форма линий спектра 4-HBT практически не меняется. При температурах выше 27°C наблюдается снижение амплитуды сигнала, затем, начиная с 32°C, линии уширяются и при температурах выше 50°C наблюдается расщепление крайней высокопольной компоненты на две. Согласно литературным данным [18], эти сигналы соответствуют радикалам в растворе (ча-

Таблица 1. Магнитно-резонансные и динамические параметры спиновых зондов в растворе PNIPAM при разных температурах, полученные в результате математического моделирования спектров ЭПР и значения константы распределения зондов глобула–раствор

Радикал	t , °C	Частицы типа А		Частицы типа Б					K_D
		a_{iso} , мТл	$\tau_{corr, iso}$, нс	a_{iso} , мТл	τ_{corr} , нс				
					iso	x	y	z	
ТЕМРО*	27	1.72	0.02	—	—	—	—	—	0
ТЕМРО*	80	1.72	0.002	1.60	0.7	20	0.3	1.3	20
4-НВТ	25	1.69	0.1	—	—	—	—	—	0
4-НВТ	90	1.68	0.01	1.63	1.9	1.0	2.0	10	140
5-DSM	25	1.61	0.02	—	—	—	—	—	0
5-DSM	90	1.61	0.01	—	—	—	—	—	0

* Данные из работы [18].

$$** K_D = \frac{C_B}{C_A}.$$

стицы типа А), детектируемым и ранее при более низких температурах, а также зондам в глобуле (частицы типа Б). Дальнейшее повышение температуры до 90°C приводит к увеличению амплитуд компонент спектра, отвечающих зонду в полимерной глобуле, что, по-видимому, связано с увеличением подвижности зондов в полимерной глобуле. Похожее изменение формы линий спектров наблюдали при регистрации спектров ЭПР радикала ТЕМРО в растворах термочувствительных полимеров, в том числе PNIPAM [18] и его сополимеров [19].

Регистрация спектров ЭПР радикала 4-НВТ в водном растворе PNIPAM в присутствии ионов Cu^{2+} позволяет получить индивидуальный спектр зонда в полимерной глобуле (частицы типа Б). Так, благодаря уширению сигнала частиц типа А до базовой линии за счет спин-обменного взаимодействия с парамагнитными ионами их спектр практически исчезает. При этом спиновые зонды, локализованные в полимерных глобулах, недоступны для парамагнитных ионов, и именно их спектр можно зарегистрировать. Действительно, при температурах $22\text{--}27^\circ\text{C}$ спектр ЭПР зонда 4-НВТ в водном растворе ионов Cu^{2+} не проявляется. Начиная с 29°C в спектре ЭПР данной системы регистрируется малоинтенсивный триплет, амплитуда которого растет при дальнейшем повышении температуры. Спектр 4-НВТ в 10%-ном водном растворе PNIPAM, зарегистрированный в присутствии ионов $\text{Cu}(\text{II})$ при 90°C , представлен

на рис. 4а. Видно, что он описан как спектр одной частицы в рамках модели анизотропного вращения нитроксида. Константа СТВ a_{iso} составила 1.63 мТл, времена вращательной корреляции — $\tau_x = 1 \text{ нс}$, $\tau_y = 2 \text{ нс}$, $\tau_z = 10 \text{ нс}$. Времена вращательной корреляции относительно осей X и Y близки и наблюдается заторможенность вращения вокруг оси Z . Стоит отметить, что анизотропия вращения радикала 4-НВТ в полимерной глобуле отличается от анизотропии вращения радикала ТЕМРО в аналогичной системе, описанной в работе [18]. В случае радикала ТЕМРО анизотропное вращение заторможено вокруг оси X , времена вращательной корреляции радикала ТЕМРО в глобуле при 80°C составили $\tau_x = 20 \text{ нс}$, $\tau_y = 0.3 \text{ нс}$, $\tau_z = 1.3 \text{ нс}$. По-видимому, радикалы по-разному ориентируются относительно полимерных цепей в глобуле. Гидрофобный фенильный фрагмент радикала 4-НВТ может координироваться по алкильным фрагментам за счет дисперсионных взаимодействий, что будет приводить к более свободному вращению нитроксильного фрагмента.

Полученные магнитно-резонансные и динамические параметры радикала 4-НВТ в полимерной глобуле были использованы для моделирования экспериментальных спектров радикала 4-НВТ в водном растворе PNIPAM при температурах выше НКТР как суммы спектров частиц типов А и Б. На рис. 4б представлен результат моделирования спектра, зарегистрированного при 90°C . Доля частиц типа Б при этой температуре составляет

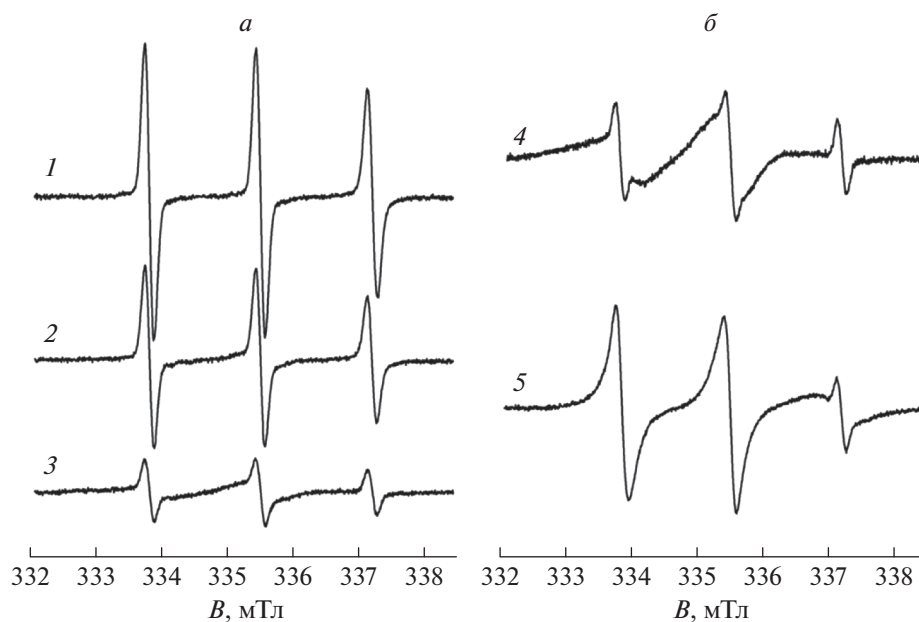


Рис. 3. Спектры ЭПР 4-гидроксibenзоато-ТЕМРО в 10%-ном водном растворе PNIPAM, зарегистрированные при 25 (1), 31 (2), 32 (3), 50 (4) и 90 °C (5).

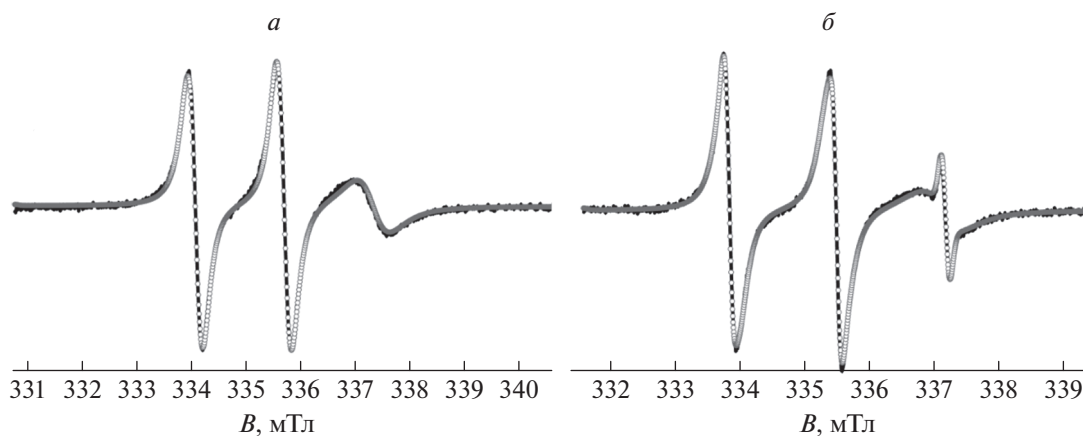


Рис. 4. Спектры ЭПР 4-гидроксibenзоато-ТЕМРО в 10%-ном водном растворе PNIPAM, зарегистрированные при 90 °C: в присутствии (а) и в отсутствие (б) ионов Cu(II). Сплошные линии — экспериментальные спектры, точки — результаты моделирования.

94%, в то время как для ТЕМРО аналогичное значение не превышает 70%. Полученные данные позволяют рассчитать константу распределения для спиновых зондов в системах глобула—раствор, K_D , при температурах выше НКТР: при 90 °C K_D составила 120 для 4-НВТ и 20 — в случае ТЕМРО соответственно (табл. 1).

На рис. 5 представлены спектры ЭПР радикала 5-DSM в 10%-ном водном растворе PNIPAM, зарегистрированные в интервале температур 25—

90 °C. Форма линий спектра практически не меняется при повышении температуры и во всем температурном диапазоне отвечает быстрому вращению нитроксильных радикалов, что также подтверждается математическим моделированием спектров ЭПР, зарегистрированных при разных температурах. Наблюдаемое незначительное уширение линий при температурах 50—90 °C, по-видимому, объясняется усилением спин-обменного взаимодействия при повышении температуры. Подобные эффекты, связанные с уширением

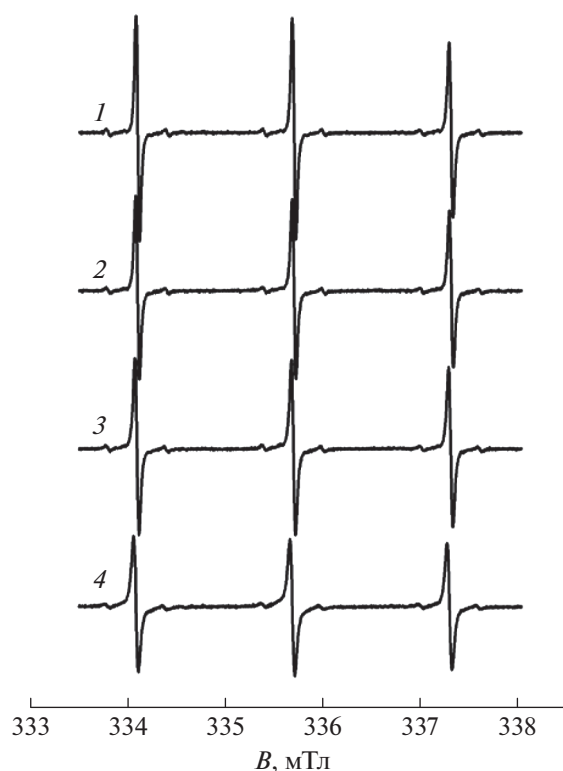


Рис. 5. Спектры ЭПР метилового эфира 5-доксилстеариновой кислоты в 10%-ном водном растворе PNIPAM, зарегистрированные при 22 (1), 35 (2), 50 (3) и 90 °C (4).

линий спектров ЭПР нитроксидов в растворах с ростом температуры, неоднократно наблюдали ранее, в том числе для растворов радикала ТЕМПО в воде [19]. Таким образом, несмотря на высокую гидрофобность, зонд 5-DSM локализован в гидрофильной области системы PNIPAM–вода во всем температурном диапазоне, в отличие от липидных систем, в которых зонд локализуется в гидрофобных областях и характеризуется заторможенным вращением [26]. По-видимому, значительный размер зонда не позволяет ему зайти в свободный объем глобул PNIPAM из-за стерических затруднений.

4. ВЫВОДЫ

С использованием спектроскопии электронного парамагнитного резонанса показано, что локализация спиновых зондов в водных растворах термочувствительного поли-N-изопропилакриламида в ходе фазового перехода клубок–глобула определяется гидрофобностью зонда и его размером. Гидрофобный зонд малого размера (до 10 нм) 4-гидроксibenзоато-ТЕМПО практически полностью (до 95% от общего количества) захватыва-

ется образующейся в ходе фазового перехода глобулой, в то время как крупный зонд, содержащий длинный алкильный хвост (метил-5-доксилстеарат), не заходит в полимерную глобулу. Полученные данные следует учитывать при выборе биологически активных веществ, используемых в системах доставки лекарств на основе поли-N-алкиламидов.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, и при финансовой поддержке грантом Российского научного фонда № 22-73-00062.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ward M.A., Georgiou T.K. // *Polymers* (Basel). 2011. V. 3. № 3. P. 1215.
2. Gandhi A., Paul A., Sen S.O. et al. // *Asian J. Pharm. Sci.* 2015. V. 10. № 2. P. 99.
3. Khan A., Sajjad M., Shah L.A. et al. // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2021. V. 15. № S1. P. S109.
4. Heskins M., Guillet J.E. // *J. Macromol. Sci. Part A – Chem.* 1968. V. 2. № 8. P. 1441.
5. Kubota K., Shouei F., Ando I. // *Polym. J.* 1990. V. 22. № 1. P. 15.
6. Podewitz M., Wang Y., Quoika P.K. et al. // *J. Phys. Chem. B.* 2019. V. 123. № 41. P. 8838.
7. Cole M.A., Voelcker N.H., Thissen H. et al. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 9. P. 1827.
8. Nash M.E., Healy D., Carroll W.M. et al. // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. № 37. P. 19376.
9. Frolova A., Ksendzov E., Kostjuk S. et al. // *Langmuir.* 2021. V. 37. № 38. P. 11386.
10. EPR Spectroscopy. Applications in Chemistry and Biology / Eds. Drescher M., Jeschke G. Berlin: Springer, 2011. P. 67.
11. Иванова Т.А., Голубева Е.Н. // *Хим. физика.* 2022. Т. 41. № 6. С. 35.
12. Shibryaeva L.S., Lyusova L.R., Karpova S.G. et al. // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2022. V. 16. № 2. P. 334.
13. Тертышная Ю.В., Подзорова М.В. // *Хим. физика.* 2020. Т. 39. № 1. С. 57.
14. Климович М.А., Сажина Н.Н., Радченко А.Ш. и др. // *Хим. физика.* 2021. Т. 40. № 2. С. 33.
15. Kurzbach D., Junk M.J.N., Hinderberger D. // *Macromol. Rapid Commun.* 2013. V. 34. № 2. P. 119.
16. Chumakova N.A., Golubeva E.N., Kuzin S.V. et al. // *Polymers* (Basel). 2020. V. 12. № 12. P. 3046.
17. Kurzbach D., Schömer M., Wilms V.S. et al. // *Macromolecules.* 2012. V. 45. № 18. P. 7535.
18. Zubanova E.M., Kostjuk S.V., Timashev P.S. et al. // *Polymers* (Basel). 2021. V. 13. № 21. P. 3829.
19. Zubanova E.M., Ivanova T.A., Ksendzov E.A. et al. // *Polymers* (Basel). 2022. V. 14. № 21. P. 4746.
20. Junk M.J.N., Jonas U., Hinderberger D. // *Small.* 2008. V. 4. № 9. P. 1485.
21. Junk M.J.N., Li W., Schlüter A.D. et al. // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2010. V. 49. № 33. P. 5683.

22. *Persson K., Bales B.L.* // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1995. V. 91. № 17. P. 2863.
23. *Beghein N., Rouxhet L., Dingizli M. et al.* // J. Controlled Release. 2007. V. 117. № 2. P. 196.
24. *Hunold J., Wolf T., Wurm F.R. et al.* // Chem. Commun. 2019. V. 55. № 23. P. 3414.
25. *Spagnuolo M., Jacobson A.R., Baveye P.* // Environ. Toxicol. Chem. 2005. V. 24. № 10. P. 2435.
26. *De Queirós W.P., de Sousa Neto D., Alonso A.* // J. Controlled Release 2005. V. 106. P. 374.
27. *Caldararu H., Caragheorgheopol A., Dimonie M. et al.* // J. Phys. Chem. 1992. V. 96. P. 7109.
28. *Stoll S., Schweiger A.* // J. Magn. Reson. 2006. V. 178. № 1. P. 42.
29. *Schneider D.J., Freed J.H.* Spin Labeling: Theory and Applications. Boston (USA): Springer, 1989.
30. *Jarocho L.E.* // PhD Diss. 2014;
<https://doi.org/10.17615/1gb2-fr97>