



УДК 547.391.1'465.5:542.952.6

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ 4-НИТРОФЕНИЛАКРИЛАТА В УСЛОВИЯХ МИКРОВОЛНОВОГО НАГРЕВА

© 2001 г. М. А. Дикусар*, И. В. Кубракова**, А. А. Чинарев*, Н. В. Бовин**

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117977 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;**Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН,
117975, Москва, ул. Косыгина, 19

Поступила в редакцию 25.12.2000 г. Принята к печати 19.04.2001 г.

Показана возможность проведения радикальной полимеризации 4-нитрофенилакрилата в растворе под действием 2,2'-азодиизобутиронитрила в условиях нагрева полимеризующейся смеси микроволновым излучением с частотой 2.45 ГГц. Продемонстрировано, что данный подход позволяет контролировать молекулярную массу поли(4-нитрофенилакрилата), используемого в синтезе мультивалентных гликоконъюгатов. Установлено, что полимеризация 4-нитрофенилакрилата в микроволновом поле приводит к продуктам с более узкими молекулярно-массовыми распределениями, чем при использовании обычного нагрева.

Ключевые слова: поли(4-нитрофенилакрилат); радикальная полимеризация; микроволновый нагрев; мультивалентные гликоконъюгаты.

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические аналоги природных гликоконъюгатов на основе полиакриламидных молекул-носителей представляют значительную ценность при решении широкого круга биоаналитических и биомедицинских задач [1, 2]. Удобным и универсальным подходом к синтезу подобных мультивалентных гликоконъюгатов является последовательная конденсация аминокислотных гликозидов и ряда неуглеводных аминокислот с полностью активированной 4-нитрофенолом полиакриловой кислотой, получаемой радикальной полимеризацией 4-нитрофенилакрилата (см. схему). Практическое применение гликоконъюгатов требует, чтобы полимер-носитель был как можно более однородным по молекулярной массе, причем для изучения и моделирования биологических процессов необходимы полимеры с различными молекулярными массами. Например, при изучении сиалогликополимерных ингибиторов адгезии вируса гриппа было продемонстрировано, что увеличение средней молекулярной массы гликоконъюгата от 20 до 1000 кДа ведет к повышению антивирусной активности на два порядка [3]. Для конъюгатов с более высокой молекулярной массой характер такой зависимости меняется на противоположный [4]. Так как методика, которая

обычно используется для получения поли(4-нитрофенилакрилата) (PNPA) [5], не позволяет эффективно регулировать среднюю молекулярную массу активированной полимерной матрицы и приводит к продукту с широким молекулярно-массовым распределением (ММР), возникает необходимость фракционирования по массам либо PNPA, либо уже готового гликоконъюгата. Цель данной работы – изучение возможности регулирования средней молекулярной массы PNPA в процессе его получения радикальной полимеризацией в растворе в условиях микроволнового нагрева.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроволновое облучение полярных веществ приводит к поглощению ими и последующему рассеянию в виде тепла энергии электромагнитных волн. В растворах такая трансформация энергии осуществляется главным образом за счет переориентации диполей под действием переменного электромагнитного поля. При этом вещество быстро и равномерно по всему своему объему разогревается, что обуславливает возможность использования электромагнитного излучения сверхвысокой частоты для решения синтетических задач.

Как было показано, микроволновый нагрев во многих случаях позволяет значительно сократить время протекания химических процессов в растворах, а иногда увеличить выход и/или селективность реакции в сравнении с условиями обычного (термического) нагрева. Возможные теоретичес-

Сокращения: AIBN – 2,2'-азодиизобутиронитрил; M_n и M_w – среднечисловые молекулярные массы полимера; ММР – молекулярно-массовое распределение; PNPA – поли(4-нитрофенилакрилат).

Автор для переписки (эл. почта: bovin@carb.siobc.ras.ru).

Таблица 1. Полимеризация 4-нитрофенилакрилата в условиях термического нагрева

| Номер опыта | Концентрация мономера, моль/л | Концентрация инициатора*, % | Выход полимера, % | M_n , кДа | M_w , кДа | M_w/M_n |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------|-------------|-----------|
| 1 | 0.5 | 3 | 70 | 85 | 165 | 1.95 |
| 2 | 0.5 | 1.5 | 60 | 90 | 175 | 1.95 |
| 3 | 0.5 | 0.5 | 45 | 120 | 250 | 2.09 |
| 4 | 1.5 | 0.5 | 45 | 120 | 225 | 1.88 |
| 5 | 1.5 | 0.25 | 40 | 145 | 310 | 2.14 |
| 6 | 1.5 | 0.1 | 15 | 150 | 290 | 1.94 |

* Проценты по массе в расчете на мономер.

кие обоснования указанных кинетических эффектов можно найти в обзорах [6, 7], в них же содержится множество примеров успешного применения микроволнового нагрева для синтеза небольших органических молекул.

Также довольно многочисленны, хотя и не однозначны, данные, касающиеся использования микроволнового нагрева при проведении процессов полимеризации [8–15]. Так, для мономеров акрилового ряда, одними авторами наблюдалось эффективное протекание радикальной полимеризации в блоке [12, 13], в отдельных случаях даже и без химического инициатора [14], другими – отсутствие каких-либо преимуществ в сравнении с термическим нагревом полимеризующейся смеси, при заметном падении выхода полимера [15]. При этом среди особенностей полимеризации акрилатов в микроволновом поле часто упоминается необычно резкий гель-эффект, проявляющийся уже при невысоких степенях конверсии мономера и приводящий к отверждению полимеризующихся смесей [11, 12].

В данной работе предполагалось изучить особенности полимеризации 4-нитрофенилакрилата под действием инициатора полимеризации AIBN в условиях микроволнового нагрева. Отправной точкой в подготовке эксперимента стал выбор подходящего растворителя. Известно, что PNPA растворим в DMSO, DMF, THF, хлороформе, ме-

тилэтилкетоне, но не растворяется в углеводородах, спиртах и воде [16]. Для обеспечения эффективного и гомогенного нагрева полимеризующейся смеси, особенно на завершающих стадиях процесса, когда большая часть молекул мономера уже включена в состав макромолекул и ограничена в своей подвижности, необходимо, чтобы главным абсорбентом электромагнитной энергии был полярный растворитель. Желательно также, чтобы используемый растворитель имел высокую температуру кипения и оставался инертным в условиях проведения процесса полимеризации. Всем этим требованиям идеально удовлетворяет DMSO.

Была проведена серия контрольных опытов без микроволнового облучения, в которых образцы 4-нитрофенилакрилата, растворенного в DMSO, полимеризовались под действием AIBN в условиях термического нагрева при 70°C в течение 24 ч. Составы полимеризуемых смесей, выходы и характеристики полученных полимеров приведены в табл. 1. Полученные результаты позволили провести сравнение двух способов нагрева полимеризующейся смеси: обычного (термического) и под действием микроволнового излучения с частотой 2.45 ГГц.

Влияние концентрации мономера и инициатора на результаты полимеризации 4-нитрофенилакрилата в микроволновом поле оценивали в опытах, в которых поочередно изменяли один из этих

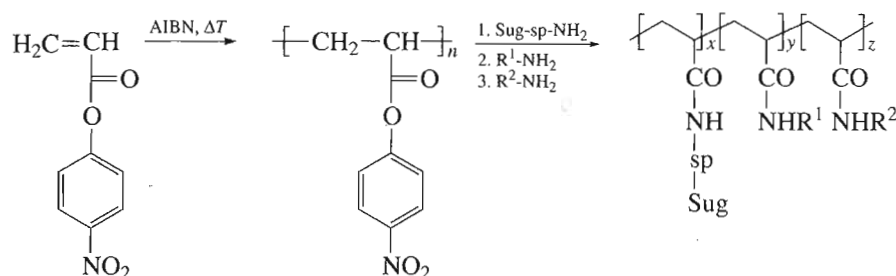


Схема получения полиакриламидных гликоконъюгатов исходя из PNPA (Sug – моно- или олигосахаридный антиген, контр-рецептор, ферментный субстрат и т.д.; sp – спейсер; R¹, R² – неуглеводные группы, метки, векторы, регуляторы растворимости конъюгата и т.д.).

Таблица 2. Полимеризация 4-нитрофенилакрилата с нагревом под действием микроволнового облучения

| Номер опыта | Концентрация мономера, моль/л | Концентрация инициатора*, % | Температура, °С | Время нагрева, мин | Выход полимера, % | M_n , кДа | M_w , кДа | M_w/M_n |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------|-------------|-----------|
| 7 | 1.5 | 0.5 | 70 | 10 | 50 | 180 | 275 | 1.53 |
| 8 | 1.5 | 0.5 | 70 | 20 | 53 | 180 | 285 | 1.59 |
| 9 | 1.5 | 0.5 | 90 | 10 | 45 | 210 | 320 | 1.53 |
| 10 | 1.5 | 0.5 | 90 | 20 | 47 | 180 | 295 | 1.64 |
| 11 | 1.5 | 0.5 | 100 | 20 | 33 | 270 | 445 | 1.65 |
| 12 | 1.5 | 0.5 | 120 | 20 | 30 | 290 | 470 | 1.62 |
| 13 | 1.5 | 2 | 100 | 20 | 55 | 140 | 220 | 1.58 |
| 14 | 1.5 | 5 | 100 | 20 | 62 | 60 | 95 | 1.59 |
| 15 | 3 | 0.5 | 100 | 20 | 50 | 140 | 225 | 1.61 |
| 16 | 3 | 2 | 100 | 20 | 65 | 105 | 175 | 1.67 |
| 17 | 3 | 5 | 100 | 20 | 68 | 100 | 160 | 1.60 |

* См. примечание к табл. 1.

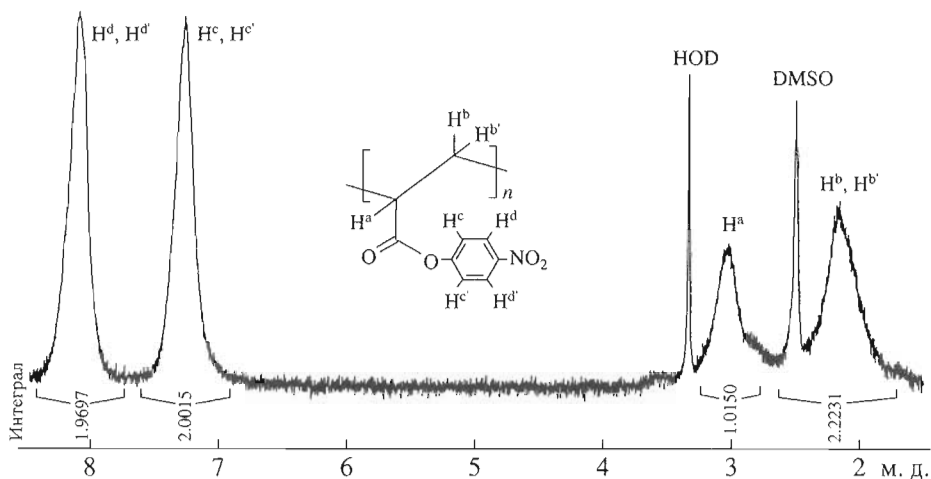
параметров. Как и следовало ожидать, даже при максимальной мощности печи энергия излучения оказывается недостаточной для образования данным мономером радикала в отсутствие химического инициатора, т.е. полимеризация при этом не протекает. Было показано, что с увеличением концентрации AIBN в расчете на мономер от 0.5 до 5% (по массе), выход полимера растет с одновременным уменьшением его средней молекулярной массы (табл. 2, ср. опыты 11, 13, 14; 15, 16, 17). Хорошо согласуется с теорией радикальной полимеризации и наблюдаемое возрастание выхода PNPA при увеличении концентрации мономера, однако данная зависимость выражена слабее. В последнем случае происходит также снижение средней молекулярной массы полимера, что, по-видимому, обусловлено увеличением вероятности передачи цепи на мономер (табл. 2, ср. опыты 11, 15; 13, 16; 14, 17). В целом, наблюдаемые эффекты вполне укладываются в рамки классической теории радикальной полимеризации [17].

Влияние температуры на ход процесса полимеризации в условиях микроволнового нагрева изучалось в диапазоне 70–120°C. Выбор верхнего предела был обусловлен началом разложения PNPA при 130°C [16]. Оказалось, что увеличение температуры полимеризации приводит к заметному снижению выходов и возрастанию средней молекулярной массы PNPA (табл. 2, опыты 7, 9, 11, 12). Однако та или иная интерпретация данного результата требует детального изучения кинетики элементарных стадий изучаемого процесса полимеризации.

С точки зрения дальнейшего использования приготовленных полимеров в синтезе гликоконъюгатов важно, чтобы в процессе полимеризации не происходило заметного разрушения 4-нитрофенилкарбоксилатных групп, т.е. чтобы полу-

чался продукт, в котором каждое из мономерных звеньев содержало бы активированную карбоксильную функцию [1]. В связи с этим после каждой полимеризации проводилось подтверждение химической структуры продукта методом $^1\text{H-NMR}$. Было продемонстрировано, что во всех случаях продуктом полимеризации действительно являлся PNPA (см. рисунок).

Из табл. 2 видно, что, изменяя условия полимеризации, при использовании микроволнового нагрева можно получать PNPA со значениями M_n в диапазоне от 60 до 290 кДа. При термическом нагреве полимеризующейся смеси образуются PNPA с $M_n \leq 150$ кДа (табл. 1). Необходимо отметить, что одновременно с увеличением M_n продуктов, микроволновый нагрев приводит и к сужению их ММР (в качестве коэффициента, характеризующего ширину распределения, использовали отношение M_w/M_n) в сравнении с полимерами, полученными в аналогичных условиях, но при использовании термического нагрева. Данный эффект, по-видимому, определяется комбинацией диффузионных и кинетических факторов, так или иначе связанных с разрушением структуры раствора при действии микроволнового излучения на полимеризующуюся систему. Так, за счет молекулярного перемешивания могут достигаться гомогенные условия протекания полимеризации во всех точках объема реакционной смеси, помещенной в переменное электромагнитное поле, что приводит к получению продукта с более узким распределением макромолекул по массам, чем при обычном нагреве. То, что величины M_w/M_n для полимеров, получавшихся в экспериментах с микроволновым и термическим нагревом, попадают соответственно в интервалы 1.5–1.6 и 1.9–2.1, может свидетельствовать о протекании реакции обрыва полимерной цепи преимущественно по ме-



^1H -ЯМР-спектр поли(4-нитрофенилакрилата); Bruker AC-200, $\text{DMSO-}d_6$, T 297 К.

ханизму рекомбинации в первом случае, и диспропорционирования – во втором [17]. Известно, что тенденция к обрыву цепи по механизму диспропорционирования характерна не только для 4-нитрофенилакрилата, но также и для многих других акрилатов [16]. Разрушение структуры раствора и снижение его вязкости при действии микроволнового излучения на полимеризующуюся систему должно приводить к увеличению вероятности бимолекулярного обрыва цепи, определяющейся скоростью диффузии растущих макрорадикалов в жидкой среде. В свою очередь с изменением механизма обрыва цепи в значительной степени может быть связано наблюдаемое увеличение молекулярной массы и сужение ММР PNPA в сравнении с полимером, полученным в условиях обычного нагрева.

Наиболее существенным оказалось влияние микроволнового нагрева на скорость протекания полимеризации. Показано, что для проведения синтеза достаточно 20 мин; дальнейшее увеличение времени нагрева не приводит к заметному возрастанию выхода полимера. При обычном нагреве появление высокомолекулярного продукта в реакционной смеси удастся зафиксировать только через 6–8 ч после начала процесса, а в целом проведение полимеризации занимает порядка 24 ч. Таким образом, при использовании микроволнового нагрева удалось сократить длительность процесса примерно в 70 раз.

Наконец, к преимуществам использования микроволнового нагрева при синтезе PNPA следует отнести хорошую воспроизводимость результатов: выходы, значения средних молекулярных масс и ММР продуктов, полученных в одинаковых условиях, оказываются практически идентичными. В ряде опытов объемы полимеризуемых смесей, составлявшие, как правило, 300 мкл, были увеличены в 5–10 раз, что не повлияло заметным образом на выходы и изучавшиеся харак-

теристики полученных полимеров, т.е. метод поддается масштабированию.

Таким образом, разработана удобная, хорошо воспроизводимая методика, позволяющая в условиях микроволнового нагрева быстро получать поли(4-нитрофенилакрилат) в количествах, необходимых для последующего синтеза гликоконъюгатов, и обеспечивающая возможность регулирования в процессе полимеризации его молекулярной массы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4-Нитрофенилакрилат, полученный согласно методике, приведенной в работе [18], и 2,2'-азодиизобутиронитрил (“ч.д.а.”; Реахим) растворяли в DMSO (Merck, Германия). Полимеризуемые смеси (300 мкл) вносили в стеклянные ампулы, которые после дегазации содержимого запаивали под вакуумом. Ампулы помещали в термостат (VS-1000, Jablonec N. NIS., Чехия), где их выдерживали при 70°C в течение 24 ч, или в микроволновую печь (MDS-2000, SEM Corp., США; частота излучения 2.45 ГГц; максимальная мощность генератора 650 Вт). В последнем случае температуру и время нагрева варьировали. Температуру полимеризующейся смеси измеряли с помощью волоконно-оптического зонда, помещенного внутрь реакционного сосуда и соединенного с блоком управления микроволновой печи. Регулирование температуры осуществлялось автоматически путем изменения подаваемой мощности. Для изучения воспроизводимости метода одновременно проводили полимеризацию 2–4 идентичных образцов. Составы полимеризующихся смесей, условия проведения полимеризации и характеристики полученных полимеров приведены в табл. 1 и 2.

После прерывания полимеризации ампулы вскрывали, растворитель удаляли лиофилизацией.

Для очистки от мономера и низших олигомеров полученный продукт промывали метанолом (Merck, Германия). Полноту очистки PNPA контролировали с помощью ТСХ на пластинках из фольги, покрытых слоем силикагеля (Kieselgel 60; Merck, Германия); элюция – толуол–ацетон, 4 : 1; проявление – выдерживание пластинок 5–10 мин в парах аммиака. В этих условиях величина R_f для мономера составляет 0.68, в то время как полимер находится на старте. Очищенный PNPA высушивали в вакууме и по сухому остатку вычисляли выход полимера.

Для оценки молекулярно-массовых характеристик PNPA его превращали в водорастворимый поли(2-гидроксиэтилакриламид). Для этого 10 мг PNPA растворяли в 100 мкл DMSO (Merck, Германия), к раствору прибавляли 30 мкл этаноламина (Merck, Германия), реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 24 ч. Продукт реакции выделяли на геле Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Австрия), элюируя смесью ацетонитрил–вода, 1 : 1. Полученный образец поли(2-гидроксиэтилакриламида) подвергали гель-хроматографии: хроматограф – LKB 2140, колонка – TSK-Gel 4000SW, 7.5 × 300 мм (Ultrapac, Швеция), элюент – 0.2 М NaCl в воде, скорость потока – 1 мл/мин, УФ-детекция полимера (λ 200–220 нм). Колонку калибровали по набору глобулярных белков с массами от 17.8 до 364 кДа. Исходя из профиля элюции полимера, методом Шульца проводили построение дифференциальной кривой ММР и на основе ее стандартного анализа получали интересные молекулярно-массовые характеристики полимера: M_n , M_w и M_w/M_n [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bovin N. // Glycoconjugate J. 1998. V. 15. P. 431–436.
2. Roy R. // Topics in Current Chemistry. Glycoscience: Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics. 1997. V. 187. P. 241–274.
3. Mochalova L., Tuzikov A., Marinina V., Gambaryan A., Byramova N., Bovin N., Matrosovich M. // Antiviral Research. 1994. V. 23. P. 179–190.
4. Lee W., Spaltenstein A., Kingery-Wood J., Whitesides G. // J. Med. Chem. 1994. V. 37. P. 565–582.
5. Bovin N., Korchagina E., Zemlyanukhina T., Byramova N., Galanina O., Ivanov A., Zubov V., Mochalova L. // Glycoconjugate J. 1993. V. 10. P. 142–151.
6. Whittaker A., Mingos D. // The Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy. 1994. V. 29. P. 196–212.
7. Abramovich R. // Organic Preparations and Procedures International. 1991. V. 23. P. 685–711.
8. Dhanalksmi K., Sundararajan G. // Polym. Bull. 1997. V. 39. P. 333–337.
9. Marrand E., Baker K., Graybeal J. // Macromolecules. 1992. V. 25. P. 2243.
10. Correa R., Gonzales G., Dougar V. // Polymer. 1998. V. 39. P. 1471–1474.
11. Chia H., Jacob J., Boey F. // J. Polym. Sci. Part A. Polym. Chem. 1996. V. 34. P. 2087–2094.
12. Jacob J., Chia H., Boey F. // Polym. Testing. 1995. V. 14. P. 343–347.
13. Chia H., Jacob J., Boey F. // J. Mat. Proc. Tech. 1995. V. 48. P. 445–452.
14. Teffal M., Gourdenne A. // Eur. Polym. J. 1983. V. 19. P. 543–555.
15. Doori A., Huggett R., Bates J., Brooks S. // Dent. Mater. 1988. V. 4. P. 25.
16. Thamizharasi S., Gnanasundaram P., Venkata Rao K., Venkata Rami Reddy A. // Eur. Polym. J. 1996. V. 32. P. 105–109.
17. Шур А.М. Высокомолекулярные соед. М.: Высшая школа, 1981.
18. Pollak A., Blumenfeld H., Wax M., Baughn R., Whitesides G. // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 6324–6336.
19. Тунг Л. // Математическая обработка результатов фракционирования. Фракционирование полимеров / Ред. Н.С. Наметкин, А.Д. Литманович. М.: Мир, 1971. С. 335–362.

Polymerization of 4-Nitrophenyl Acrylate under Microwave Heating Conditions

M. A. Dikussar*, I. V. Kubrakova**, A. A. Chinarev*, and N. V. Bovin**

E-mail: bovin@carb.siobc.ras.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

**Vernadskii Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, ul. Kosygina 19, Moscow, 117975 Russia

The 2,2'-azodiisobutyronitrile-induced radical polymerization in solution of 4-nitrophenyl acrylate was performed under microwave heating at a frequency of 2.45 GHz. This approach allows the control of the molecular mass of poly(4-nitrophenyl acrylate) used in the synthesis of multivalent glycoconjugates. It was found that the polymerization of 4-nitrophenyl acrylate under microwave irradiation results in products with a narrower molecular mass distribution than at conventional heating.

Key words: microwave heating, multivalent glycoconjugates, poly(4-nitrophenyl acrylate), radical polymerization