УДК 544.725

Э. А. Васильева<sup>1,2</sup>, А. Б. Миргородская<sup>1</sup>, Г. А. Гайнанова<sup>1,2</sup>, А. Р. Ибрагимова<sup>1</sup>, И. Р. Низамеев<sup>1</sup>, М. К. Кадиров<sup>1</sup>, Л. Я. Захарова<sup>1,2</sup>

## ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КАПСУЛЫ, СФОРМИРОВАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЗОПОРИСТОЙ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ ОКСИДА КРЕМНИЯ

<sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН, ул. Акад. Арбузова, 8, 420088 Казань, Россия. <sup>2</sup>Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. К. Маркса, 68, 420015 Казань, Россия. E-mail: lucia@iopc.ru

Разработана методика инкапсулирования низкомолекулярных гидрофобных соединений (эфиров жирных карбоновых кислот) в полиэлектролитных капсулах путем послойного осаждения полиэтиленимина и полиакриловой кислоты на частицы мезопористого диоксида кремния, функционализированного амфифильным каликс[4]ареном. Размер капсул, определенный методами динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии, лежит в наноразмерном диапазоне (≤ 300 нм). Проницаемость капсул оценивали спектрофотометрическим методом, путем измерения поглощения продуктов щелочного гидролиза субстрата, проходящего через стенки капсул в объем раствора. Для оценки роли мезопористой матрицы были приготовлены капсулы по протоколу, включающему обработку субстрата каликс[4] резориинареном в отсутствие SiO<sub>2</sub>. Показано, что в данном случае получаются капсулы, обладающие большей проницаемостью.

Ключевые слова: полиэлектролитные капсулы, каликс[4] арен, мезопористый оксид кремния, связывание/высвобождение.

# E. A. Vasilieva<sup>1,2</sup>, A. B. Mirgorodskaya<sup>1</sup>, G. A. Gaynanova<sup>1,2</sup>, A. R. Ibragimova<sup>1</sup>, I. R. Nizameev<sup>1</sup>, M. K. Kadirov<sup>1</sup>, L. Ya. Zakharova<sup>1,2</sup>

## POLYELECTROLYTE CAPSULES FORMED USING MESOPOROUS MATRIX **BASED ON SILICA**

<sup>1</sup>A. E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center RAS, Arbuzov Str., 8, 420088 Kazan, Russia. <sup>2</sup>Kazan National Research Technological University, K. Marx Str., 68, 420015 Kazan, Russia. E-mail: lucia@iopc.ru

The encapsulation technics of the low molecular weight hydrophobic compounds (carbonic acid esters) in polyelectrolyte capsules is developed by layer-by-layer deposition of polyethylene imine and polyacrylic acid onto the mesoporous silica particles functionalized by amphiphilic calix [4] arene. A capsule size determined by dynamic light scattering method and atomic force microscopy lies within the nanodimensional range ( $\leq 300$  nm). Permeability of capsules was estimated by spectrophotometry through the registration of the absorbency of the products of basic hydrolysis of the substrates diffused through capsule walls to the bulk solution. To assess the role of mesoporous matrix capsules were prepared through protocol involving the treatment of the substrate with calix[4] arene in the absence of SiO<sub>2</sub>. It is shown that in this case capsules are obtained with higher permeability.

*Key words:* polyelectrolyte capsule, calix[4]arene, mesoporous silica, loading/release.

Васильева Э. А., Миргородская А. Б., Гайнанова Г. А., Ибрагимова А. Р., Низамеев И. Р., Кадиров М. К., (C) Захарова Л. Я., 2015

### Введение

В настоящее время синтез микро- и нанокапсул привлекает особое внимание в связи с широким спектром их практического применения. С помощью капсулирования можно улучшить свойства используемых на практике соединений: белков, ДНК, лекарственных препаратов, пищевых добавок и красителей [1-4] В основе метода лежит поочередная адсорбция противоположно заряженных полиэлектролитов на частицы вспомогательного темплата различной природы, что приводит к формированию многослойной оболочки [5, 6]. В качестве темплата могут выступать полистирольные, силикагелевые, карбонатные ядра (MgCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CdCO<sub>3</sub>), а также биологические клетки. После формирования полиэлектролитной оболочки сферическая частица, использованная в качестве матрицы, удаляется без повреждения структуры капсулы. В зависимости от химической природы материала матрицы, для его удаления используют растворы соляной, этилендиаминотетрауксусной кислоты и др. Объем внутренней части капсул контролируется размером используемого темплата [7, 8].

В наших предыдущих работах разработана и апробирована оригинальная методика капсулирования низкомолекулярных гидрофобных соединений на основе полиакриловой кислоты (ПАК) и полиэтиленимина (ПЭИ) с использованием на начальной стадии ПАВ – цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) для придания заряда нейтральной молекуле субстрата [9, 10]. Данная работа является продолжением исследований в этой области. В качестве вспомогательной матрицы для синтеза капсул использованы частицы мезопористого оксида модифицированного кремния амфифильным оксиэтилированным каликсареном, содержащим нонильные радикалы на верхнем ободе (9KO9@SiO<sub>2</sub>, рис. 1). синтез которого описан в работе [11]. Преимуществом этого темплата является возможность более высокой загрузки субстрата по сравнению с другими матрицами, так как его связывание может происходить не только за счет адсорбции субстрата частицами оксида кремния, но и за счет дополнительных взаимодействий с молекулами каликсарена.

### Эксперимент

Для формирования оболочки полиэлектролитных капсул выбраны полиакриловая кислота  $(M_r = 1800 \ r/моль «Sigma-Aldrich»)$  и полиэтиленимин ( $M_r = 25000$  г/моль «Sigma-Aldrich»), дополнительной которые использованы без очистки. В качестве инкапсулируемого субстрата выбран *п*-нитро-фениллаурат (ПНФЛ). Мезопористый оксид кремния получали темплатным методом; в качестве структурообразующей матрицы использовали мицеллярный раствор ЦТАБ, а в качестве силикатной компоненты тетраэтоксисилан. Методами абсорбции бензола и толуола были найдены количественные характеристики образца: объем пор 1,63 см<sup>3</sup>/г; удельная поверхность 730 м<sup>2</sup>/г; пористость 0,093 кг/м<sup>3</sup>. Модификацию полученных образцов оксиэтилированным каликс[4]ареном (рис. 1) проводили по методике [11].



Рис. 1. Структурная формула оксиэтилированного каликсарена и схематическое изображение поверхности мезопористого оксида кремния с иммобилизованным амфифильным каликс[4]ареном

Получение 2,8,14,20-тетра (натрия этилсульфонат)-4,6,10,12,16,18,22,24-октагидрокси - 5,11, 17,23-тетра (N,N-диметиламинометил) каликс[4] арена (КР): 1 г 2,8,14,20-тетра (натрия этилсульфонат) калик[4] резорцинарена растворили в 10 мл воды и добавили при перемешивании магнитной мешалкой 1 мл N,N,N',N'-тетраметилметилендиамина. Колбу установили на глицериновой ванне с обратным холодильником на 24 часа при температуре 80° в атмосфере аргона. При добавлении этанола к полученному раствору выпадал осадок темно-красного цвета, который отфильтровали на водоструйном насосе. При фильтровании промывали этанолом. Вещество собрали в колбу, которую поместили в глицериновую ванну, и высушили на масляном насосе

при температуре 80 градусов. Выход продукта составил 1 г ( 80 %).

Формирование многослойной оболочки начинали с ПЭИ, который при рН 6 выступает в роли поликатиона, так как сама силикатная матрица заряжена отрицательно. При интенсивном перемешивании (750 об/мин) к 5 мл спиртового раствора ПНФЛ с концентрацией 0,01 М добавляли 10 мг 9KO9@SiO2 в виде порошка и выдерживали в течение 3 часов. Далее этот раствор центрифугировали в течение 15 минут при 8000 об/мин и отделяли надосадочную жидкость. К осадку добавляли 8 мл раствора ПЭИ (1 мг/мл), перемешивали 10 минут, после чего несвязавшийся полимер удаляли центрифугированием (8000 об/мин) в течение 10 минут. Далее осадок ресуспезировали в воде при рН 6 и подобную процедуру повторяли с ПАК. После нанесения заданного количества слоев полиэлектролитов проводили промывку капсул бидистиллированной которую водой, также использовали для хранения капсул.

Морфология И размер частиц были исследованы методом атомно-силовой микроскопии (микроскоп Multi Mode V, CША); во всех измерениях использованы кантилеверы 250-350 кГц (Veeco, США) с силиконовым наконечником радиусом кривизны 10-13 с HM. Микрофотографии получены с помощью 8279 JV сканера с разрешением 256х256. Скорость сканирования составляет 1Гц. Образцы водных дисперсий помещали на поверхность слюды с шероховатостью не более 1-5 нм. АСМ-съемка была выполнена после испарения воды.

Измерения с помощью сканирующего электронного микроскопа «Hitachi TM'1000» комнатной температуре выполняли при на стандартно приготовленных образцах. Каплю дисперсии помещали на стеклянную поверхность; после испарения растворителя осуществляли фотосъемку.

Размер и дзета-потенциал агрегатов в исследуемых системах определяли на фотонном корреляционном спектрометре динамического рассеяния света Zeta Sizer Nano (фирмы «Malvern», Великобритания). Источником лазерного излучения служил Не-Ne газовый лазер мощностью 10 мВт и длиной волны 633 нм. Анализ сигналов осуществляли одноплатным многоканальным коррелятором, сопряженным с компьютером. Угол рассеяния света составлял 173°. Время накопления импульсов 5–7 минут.

Высвобождение субстрата контролировали спектрофотометрическим методом по выделению продукта его гидролиза \_ *п*-нитрофенола, имеющего В щелочных средах интенсивное поглощение при длине волны 400 нм. Для ускорения гидролиза ПНФЛ по аналогии с [9,10] предыдущими статьями использовали водный раствор ПАВ – цетилгидроксиэтилдиметиламмоний бромид (ЦГАБ) с концентрацией 3 мМ при рН 9.2.

## Результаты и их обсуждение

Природа вспомогательной матрицы является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность капсулирования и возможность управления процессом связывания/высвобождения субстрата. Поэтому важным направлением исследований в данной области является поиск новых способов и вспомогательных веществ для нанесения полиэлектролитных слоев. В рамках данной работы В качестве матрицы для формирования нанокапсул, содержащих эфиры жирных карбоновых кислот, для первичного связывания субстрата предполагали использовать модифицированный кремнезем МСМ-41, способный выступать в качестве адсорбента. На первой стадии методом темплатного синтеза в мицеллярном растворе ЦТАБ был получен мезопористый минеральный носитель. На рис. 2 приведены электронные фотографии частиц мезопористого оксида кремния (9КО9@SiO<sub>2</sub>), характеризующие их размер и морфологию. Затем была проведена модификация его поверхности путем нанесения органического слоя – амфифильного каликс[4]арена, образовывать способного адмицеллы в приповерхностном слое, увеличивая связывание субстрата.

Полученный образец был использован при формировании капсул В качестве темплата, содержащего субстрат, связанный адмицеллами каликсарена и поровой поверхностью. Применение субстрата *п*-нитрофениллаурата качестве обусловлено его химической структурой, спектрофотометрическим методом позволяющей количественно характеризовать процесс капсулирования этого вещества, а также его дальнейшее высвобождение из капсулы. Связывание субстрата осуществляли при смешении спиртового раствора *n*нитрофениллаурата (или его ближайших гомологов) (0,01 М) с кремнеземом.



Рис. 2. Микрофотографии частиц мезопористого оксида кремния, модифицированного каликсареном, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, масштаб 500 нм (*a*, *δ*), в том числе с высоким разрешением (масштаб 20 нм) (*в*)

С целью оптимизации условий синтеза продолжительность контакта субстрат-кремнезем варьировали от 30 минут до 24 часов, при этом фиксировали содержание субстрата в растворе. На рис. З в качестве примера приведены спектры поглощения растворов ПНФЛ, снятые через различные промежутки времени после контакта с кремнеземом. Количество связанного субстрата рассчитывали по убыванию оптической плотности раствора при длине волны 260 нм Установлено, что время сорбции не должно превышать 2-3 часов, поскольку при увеличении длительности контакта может происходить десорбция молекул. В связи с этим для дальнейших синтезов в качестве оптимального времени осаждения субстрата на кремнезем приняты 3 часа.



*Рис.* 3. Изменение оптической плотности раствора ПНФЛ в зависимости от времени его контакта с 9KO9@SiO<sub>2</sub>; С<sub>ПНФЛ</sub> = 0,01 М

Методом динамического и электрофоретического рассеяния света показано, что частицы кремнезема с адсорбированным субстратом характеризуются электрокинетическим потенциалом -40 мВ, а их гидродинамический диаметр (D<sub>h</sub>) составляет 100–300 нм. В качестве примера на рис. 4 приведены данные динамического рассеяния света для трехслойных капсул.



Рис. 4. Распределение частиц по размерам трехслойных капсул ПАК/ПЭИ, полученных при рН 6 с предварительной сорбцией ПНФЛ в образце 9КО9@SiO<sub>2</sub>, усредненное по числу частиц

Для доказательства осаждения полиэлектролитов на частицы, после каждого нанесенного слоя измеряли электрокинетический потенциал частиц. Из рис. 5 четко видна перезарядка системы, которая происходит при полиэлектролитов. поочередном нанесении На рис. 6 представлены данные АСМ для трехслойных капсул ПЭИ/ПАК, которые хорошо согласуются результатами, полученными с динамическим рассеянием света. Кроме того из что синтезированные капсулы них следует, характеризуются некоторой полидисперсностью: присутствуют размером ~250 нм частицы и 50 нм.



Рис. 5. Изменение электрокинетического потенциала частиц при нанесении противоположно заряженных полиэлектролитов ПЭИ/ПАК на темплат 9КО9@SiO<sub>2</sub>

Важнейшей характеристикой капсул является их способность выделять иммобилизованный субстрат в объемную среду. Для оценки проницаемости капсул в настоящем исследовании

была использована методика, разработанная нами ранее [9,10]. Субстрат, выделяющийся из капсул, подвергали щелочному гидролизу и определяли константу скорости реакции. Процесс проводили в таких условиях, чтобы его скорость определялась не химическим взаимодействием, а диффузией субстрата через оболочку. Для этого в растворе создавали высокое значение рН и добавляли ЦГАБ, который, как известно, является эффективным катализатором реакций нуклеофильного замещения [12]. За характеристику проницаемости время капсул принимали полупревращения субстрата (т<sub>1/2</sub>) в этих условиях. Оказалось, что для инкапсулированного ПНФЛ, в трехслойных капсулах ПАК/ПЭИ с использованием модифицированной каликс[4]ареном мезопористой матрицы, значение тиз при рН 9,2 и СЦГАБ 0,003М составляет 90 минут, что практически на порядок выше, чем время полупревращения «свободного» субстрата [13].



*Рис. 6.* АСМ-фото трехслойных капсул ПЭИ/ПАК, синтезированных с использованием мезопористого темплата

Для оценки роли мезопористой матрицы были приготовлены капсулы по протоколу, включающему обработку субстрата каликсареном Эта методика в отсутствие  $SiO_2$ . явилась модификацией способа синтеза капсул, содержащих низкомолекулярные незаряженные вещества, включающего стадию предварительной обработки субстрата ионным ПАВ для придания заряда дисперсным частицам субстрата. В данной работе ПАВ заменено каликс[4]ареном (КР), несущим отрицательный заряд на нижнем ободе, формула которого представлена на рис. 7.



Рис. 7. Структурная формула каликс[4]арена

В результате обработки образуется отрицательно заряженный комплекс КР-ПНФЛ, что за счет электростатических взаимодействий облегчает дальнейшее нанесение поликатиона, в частности ПЭИ. Для доказательства осаждения полиэлектролитов на комплекс субстрат–ПАВ измеряли дзета-потенциал системы. На рис. 8 показано, что после каждого нанесенного слоя происходит перезарядка системы.



Рис. 8. Значения дзета-потенциала, фиксируемые в процессе формирования трехслойных капсул ПАК/ПЭИ, полученных с предварительной обработкой субстрата в растворе каликсарена при рН 6

В условиях чередования полиэлектролитов нами были получены капсулы, содержащие ПНФЛ, с различным числом слоев в оболочке. Гидродинамический диаметр трехслойных капсул составляет приблизительно 110 нм, а увеличение числа слоев до 5 и 7 приводит к росту значения  $D_h$ до 150 нм и 202 нм соответственно (рис. 9), при этом системы характеризуются высокой полидисперсностью (индекс полидисперсности составляет 0,6–0,7).





Для сравнительного анализа проницаемости капсул, полученных по различным протоколам, на рис. 10 представлена зависимость времени полупревращения ПНФЛ от количества нанесенных на него полиэлектролитных слоев и условий синтеза.



количество слоев

Рис. 10. Время полупревращения ПНФЛ, инкапсулированного в трех-, пяти- и семислойные капсулы ПАК/ПЭИ синтезированные при рН 6,0 с использованием мезопористого темплата и анионного каликс[4]арена, (объемная среда 3 мМ ЦГАБ; рН 9,2; 25 °C)

Наглядно видно, что капсулы, синтезированные с предварительной обработкой субстрата каликс[4]резорцинареном КР, обладают более пропускающей высокой способностью вне зависимости от количества нанесенных слоев по сравнению с капсулами, синтезированными с использованием вспомогательной матрицы 9КО9@SiO2. Таким образом, варьируя условия полиэлектролитных синтеза капсул, можно управлять их свойствами достигать и поставленной задачи, связанной с проницаемостью капсул И скоростью стенок вылеления инкапсулированных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта МК – 6136.2014.3

#### Список литературы / References

- 1. *Sambanis A*. Encapsulated cell systems: The future of insulin delivery? // Therapeutic Delivery. 2012. Vol. 3. P. 1029–1032.
- Qi W., Yan X., Fei J., Wang A., Cui Y., Li J. Triggered release of insulin from glucose-sensitive enzyme multilayer shells // Biomaterials. 2009. Vol. 30. P. 2799–2806.
- Mertz D., Wu H., Wong J. S., Cui J., Tan P., Alles R., Caruso F. Ultrathin, bioresponsive and drugfunctionalized protein capsules // J. Mater. Chem. 2012.Vol. 22. P. 21434–21442.
- Zhao Q. H., Han B. S., Wang Z. H., Gao C. Y., Peng C. H., Shen J. C. Hollow chitosan–alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies // J. Nanomed. Nanotechnol. 2007. Vol. 3. P. 63–74.

- Mak W. C., Cheung K. Y., Trau D. Influence of Different Polyelectrolytes on Layer-by-Layer Microcapsule Properties: Encapsulation Efficiency and Colloidal and Temperature Stability // Chem. Mater. 2008. Vol. 20. P. 5475–5484.
- DeGeest B. G., Jonas A. M., Demeester J. Glucose-Responsive Polyelectrolyte Capsules // Langmuir. 2006. Vol. 22. P. 5070–5074.
- Zelikin A. N., Becker A. L., Johnston A. R., Wark K. L. A General Approach for DNA Encapsulation in Degradable Polymer Microcapsules // ACS Nano. 2007. Vol. 1. P. 63–69.
- Donath E., Sukhorukov G. B., Caruso F., Davis S. A., Möhwald H. Novel hollow polymer shells by colloidtemplated assembly of polyelectrolytes // Angew. Chem. 1998. Vol. 37. P. 2202–2205.
- Zakharova L. Ya., Vasilieva E., Gaynanova G., Mirgorodskaya A., Ibragimova A., Salnikov V., Uchegbu I., Konovalov A., Zuev Yu. The polyacrylic acid/modified chitosan capsules with tunable release of small hydrophobic probe and drug // Colloids Surf., A. 2015. Vol. 471. P. 93–100.
- Zakharova L. Ya., Ibragimova A. R., Vasilieva E. A., Mirgorodskaya A. B., Yackevich E. I., Nizameev I. R., Kadirov M. K., ZuevYu. F., Konovalov A. I. Polyelectrolyte capsules with tunable shell behavior

fabricated by the simple Layer-by-Layer technique for the control of the release and reactivity of small guests // J. Phys. Chem. C. 2012. Vol. 116. P. 18865–18872.

- Zakharova L. Ya., Kudryashova Yu. R., Ibragimova A. R., Vasilieva E. A., Valeeva F. G., Popova E., Solovieva S. E., Antipin I. S., Yusupova T., Konovalov A. I. Step-by-step design of novel biomimetic nanoreactors based on amphiphilic calix[4]arene immobilized on polymer or mineral platforms for destruction of ecological toxicants // Chem. Eng. J. 2012. Vol. 185–186. P. 285–293.
- Zakharova L. Ya., Mirgorodskaya A. B., Yackevich E. I., Yurina A. V., Syakaev V. V., Latypov S. K., Konovalov A. I. Polyethyleneimine + cationic surfactant systems: Self-organization and reactivity study // J. Chem. Eng. Data. 2010. Vol. 55. P. 5848–5855.
- Mirgorodskaya A. B., Bogdanova L. R., Kudryavtseva L. A., Lukashenko S. S., Konovalov A. I. Role of surface potential in the catalytic action of micelles of cationic surfactants with a hydroxyalkyl fragment in the head group // Russ. J. Gen. Chem. 2008. Vol. 78. P. 163–170.

Поступила в редакцию 19.03. 2015 г.