

ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ

УДК 541.64 : 547.29

© 1992 г. М. И. Штильман, М. Я. Корнаков, А. М. Тсатсакис,
Н. В. Курушина, Т. П. Залукаева

**ПОЛИМЕРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ
1-АМИНОЦИКЛОПРОПАН-1-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

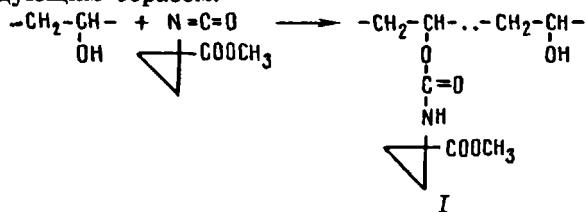
Полимерные производные 1-аминоциклогексан-1-карбоновой кислоты (регулятор роста и развития растений) были получены двумя методами — взаимодействием триметилсилильных производных указанной кислоты с поливиниловым спиртом и сополимерами малеинового ангидрида, а также сополимеризацией метакрилоильного производного эфира этой же кислоты с N-винилпирролидоном. Исследование гидролиза полимеров методом тонкослойной хроматографии выявило характер влияния их химического строения на выделение низкомолекулярной кислоты и взаимосвязь скорости гидролиза с биологической активностью полимеров.

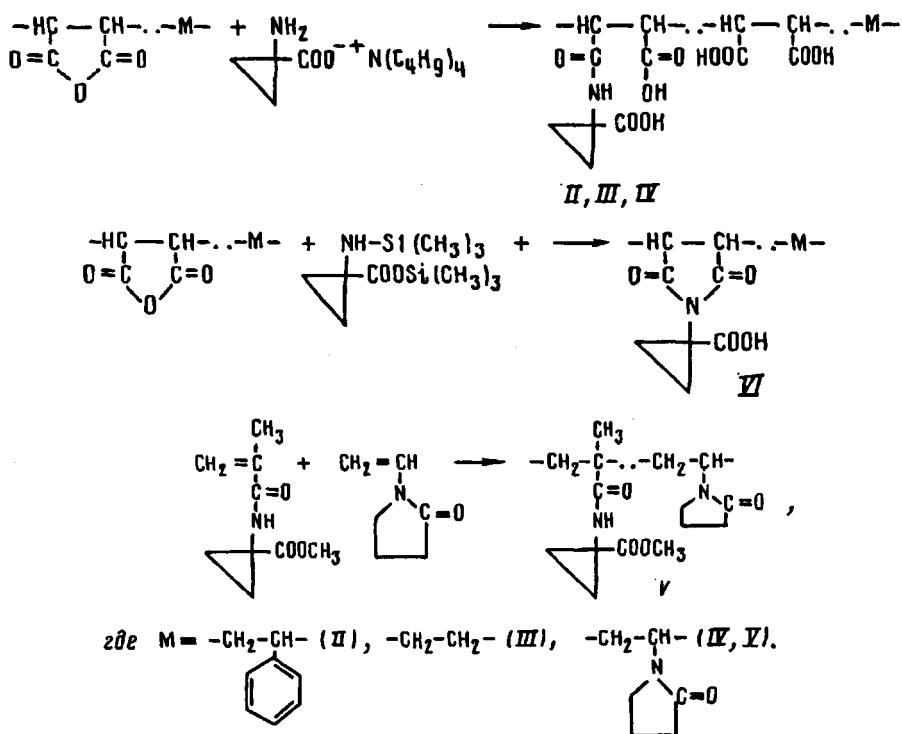
Полимерные формы регуляторов роста и развития растений, в которых остаток биологически активного вещества связан с основной полимерной цепью гидрологически лабильной связью, представляют большой интерес [1—3]. Такие биологически активные полимеры, содержащие остатки фитогормонов или других природных или синтетических регуляторов, получили название фитоактивных полимеров [4, 5].

В литературе описаны полимерные производные регуляторов роста и развития растений, относящихся к различным группам — ауксинам [4—11], цитокининам [12—13], гиббереллинам [14, 15], витаминам и нуклеотидам [16, 17]. Однако в большинстве случаев в этих работах рассматривали только синтез соответствующих полимеров. В то же время их способность к гидролизу и особенности биологической активности изучены недостаточно.

В настоящей работе рассмотрены возможности синтеза и некоторые свойства полимерных гидролизуемых производных предшественника фитогормонального этилена в его биосинтезе — 1-аминоциклогексан-1-карбоновой кислоты (АЦК), о возможности использования которой в качестве регулятора, обладающего ретардантной активностью, указано в литературе [18].

Общая схема синтеза полимерных форм АЦК может быть представлена следующим образом:





Содержание АЦК в полученных полимерных производных и их молекулярные массы были близки, что в значительной мере позволило снизить влияние этих факторов при сравнении свойств полимеров.

АЦК и ее низкомолекулярные производные синтезировали согласно работам [18, 19].

Производное АЦК и поливинилового спирта (I). 4,4 г (0,1 осново-моля) ПВС (количество ацетатных групп 1 мол.%, $M_w = 4,5 \cdot 10^4$), 14,4 г (0,1 моля) метилового эфира 1-изоцианатоциклогексан-1-карбоновой кислоты и 250 мл N-метилпирролидона нагревали в течение 20 ч при 60°. Полученный полимер осаждали в смесь метанол — ацетон (2 : 1), промывали осадителем и сушили до постоянной массы в вакууме. Водорастворимый продукт содержал 24,3 мол.% звеньев с остатками АЦК.

ИК-спектры, cm^{-1} : 1555 (амид); 866, 1048 (циклогексан). Полимер I растворяли в растворителях второй и третьей групп с параметрами растворимости 21,1—26,5 и 21,3—47,7 ($\text{МДж}/\text{м}^3$)^{1/2} соответственно.

Полимерные формы АЦК, полученные с использованием в качестве носителей сополимеров малеинового ангидрида (II, III, IV, VI). Для синтеза этой группы производных АЦК использовали сополимеры малеинового ангидрида со стиролом ($M_w = 4,0 \cdot 10^4$, содержание ангидридных групп 41 мас.%), этиленом ($M_w = 3,0 \cdot 10^4$, содержание ангидридных групп 44 мол.%), и N-винилпирролидоном ($M_w = 35 \cdot 10^4$, содержание ангидридных групп 45 мол.%).

Полимерные амиды (II, III, IV) (общая методика). Требуемые количества ангидридсодержащего полимера и тетрабутиламмонийной соли АЦК нагревали в течение 4 ч при 50° в сухом ДМФА (соотношение соли : полимер = 1,1 : 1 моль/осново-моль). Реакционную смесь затем нейтрализовали 1%-ной HCl, диализовали против дистilledированной воды и сушили лиофильно. Содержание связанной АЦК 32,4; 36,1; 34,8 мол.% для соединений II, III, IV соответственно.

Эти полимерные формы АЦК растворимы в растворителях второй группы с параметром растворимости 21,1—26,5 и в растворителях третьей группы с параметрами растворимости 24,9—47,7 (для полимеров II и III) и 21,3—47,7 ($\text{МДж}/\text{м}^3$)^{1/2} (для полимера IV).

Полимерный имид (VI) (общая методика). Один объем 5%-ного раствора сополимера малеинового ангидрида и N-винилпирролидона в ДМФА обрабатывали двойным количеством к эквивалентному (считая на ангидридные группы) N, O-бис- trimетилсилил-1-аминоцикло-пропан-1-карбоновой кислоты (1,1 моль на 1 моль ангидридных групп). Реакцию проводили в течение 4 ч при 50°, продукт осаждали в диэтиловый эфир, промывали хлороформом и сушили в вакууме до постоянной массы. Содержание звеньев с остатками АЦК 39,9 мол.%.

Сополимер N-(1-метоксикарбонилциклогексил)метакриламида с N-винилпирролидоном (V). 3,66 г (0,02 моля) N-(1-метоксикарбонилциклогексил)метакриламида, 2,22 г (0,02 моля) N-винилпирролидона, 10 мл диоксана и 0,03 г азодиизобутиронитрила выдерживали при 80° в запаянной ампуле в атмосфере аргона в течение 10 ч. По завершении реакции ампулу вскрывали, сополимер высаждали в диэтиловый эфир, промывали осадителем и хлороформом и сушили в вакууме. Выход сополимера 69%. Турбидиметрическое титрование дало мономодальную кривую осаждения, что указывало на отсутствие примесей гомополимеров. Содержание связанной АЦК 65%, $[\eta] = 0,185$ дL/g (ДМФА, 25°).

Анализ на содержание АЦК в ее полимерных формах. 2 мг полимера, содержащего АЦК, обрабатывали 2 мл бн.HCl при 150° в течение 2 ч в запаянной ампуле в атмосфере аргона. Ампулу вскрывали и жидкую фазу упаривали. Сухой остаток растворяли в 1,5 мл дистиллированной воды и затем наносили шприцем на пластинку для тонкослойной хроматографии с силикагелевым слоем. На эту же пластинку наносили растворы АЦК со стандартными концентрациями в диапазоне от $5 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. При использовании элюента (25%-ный аммиак : изопропанол = 3 : 7) кислота имела $R_f = 0,43$. Для проявления хроматограммы применяли 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне. После опрыскивания пластинку выдерживали 10 мин при 80° и затем при комнатной температуре в темноте в течение 24 ч. Количество АЦК определяли на приборе «Hitachi-557», снабженном адаптером для сканирования тонкослойных хроматограмм (скорость сканирования 0,5 см/мин и длины волн 490 и 520 нм).

Изучение кинетики гидролиза полимерных форм АЦК. Гидролиз водорастворимых полимерных форм АЦК проводили при различных значениях pH с использованием буферов с pH = 1,6—12. Количество выделившейся АЦК в водной фазе определяли с использованием УФ-спектроскопии при обработке смеси стандартным реагентом по сравнению с калибровочным графиком. В качестве реагента на АЦК использовали смесь 30 мл 0,4 м. боратного буфера (pH = 9,7), 0,5 мл 1%-ного раствора α -фталевого альдегида в метаноле и 0,5 мл 0,5%-ного раствора меркаптоэтанола в метаноле. Оптическую плотность фиксировали при длине волны 340 нм.

Исследование биологической активности. Ретардантный эффект, оказываемый синтезированными полимерами, оценивали по влиянию их растворов на рост проростков ржи сорта Кустро. Опрыскивание проростков проводили после появления первого листа. Концентрация раствора составляла 1 моль/л (по АЦК). Степень ретардантного эффекта оценивали по длине первого листа на десятый день после обработки.

Изучение гидролиза полимерных форм АЦК, обладающих различным химическим строением, показало, что скорости гидролиза полимеров I—V при pH = 7,0 (фосфатный буфер) и температуре 20° невелики. Только незначительные количества АЦК были обнаружены через 240 ч для полимерных форм II—V. Для полимера I в данном случае степень гидролиза не превышала 2%. Гидролиз полимера VI в этих условиях не наблюдался вообще; при pH = 1,68 и 12,0 скорость гидролиза увеличивалась, причем в большей степени в щелочной области.

В дальнейшем сравнение скоростей гидролиза различных полимеров проводили при pH = 12,0 и временах реакции 8—10 ч при температуре 20°. Так как расчетные величины констант скорости реакции могли изменяться с глубиной протекания процесса, что часто наблюдается при проведении реакций полимеров в растворе, при обсуждении полученных результатов были использованы значения начальных констант скорости реакции.

Для полимеров I и V в результате гидролиза могли выделяться как

Гидролиз и биологическая активность полимерных форм АЦК
($\text{pH} = 12,0$; температура 20°)

Полимер	Тип гидролизуемой группы	Эффективные константы скорости гидролиза, $k_{\text{зф}} \cdot 10^{-4}$ л/моль·с	Степень уменьшения длины первого листа проростков ржи, %
I	$\text{P}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NHR}$	8,33	38
II	$\text{P}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$	0,91	21
III	$\text{P}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$	0,86	20
IV	$\text{P}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{COOH}$	0,82	18
V	$\text{P}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$	0,33	10
VI	$\text{P}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NR}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NR}$	0,79	—

* P — остаток полимера, R — остаток аминокислоты или ее эфира.

сама АЦК, так и ее метиловый эфир. Однако в условиях эксперимента (время реакции 1–12 ч, температура 20° , концентрация полимера $5 \cdot 10^{-3}$ — 10^{-2} моль/л) на тонкослойных хроматограммах проявлялось только одно вещество, которым являлась АЦК. Это явление, вероятно, обусловлено более высокой скоростью гидролиза сложной эфирной группы по сравнению со скоростью гидролиза групп, связывающих АЦК с полимерной цепью, распад которых и определял кинетику суммарного процесса в указанных условиях.

Значения полученных эффективных констант скорости гидролиза зависели от строения гидролизуемой группы (таблица). Так, наибольшей способностью к гидролизу обладал полимер I, полученный на основе поливинилового спирта, в котором остаток кислоты был связан с полимером карбаматной связью. Более низкая склонность к гидролизу наблюдалась для полимеров II—IV, полученных на основе сополимеров малеинового ангидрида, в которых аминокислота была связана с полимером амидной группой, содержащей соседнюю карбоксильную группу. Наименьшей способностью к гидролизу обладал полимер V, в котором гидролизу подвергалась амидная группа.

Скорость гидролиза полимера VI, полученного на основе сополимера N-винилпирролидона и малеинового ангидрида и содержащего имидную группу, была близка к скоростям, характерным для полимеров II—IV.

Строение основной цепи играло в исследуемом случае подчиненную роль. Во всяком случае не наблюдалось существенного различия в значениях констант скорости реакции для производных различных сополимеров ма-

леинового ангидрида II—IV. Некоторое уменьшение значения константы скорости гидролиза при переходе от сополимера N-винилпирролидона к сополимеру стирола, возможно, обусловлено понижением общей полярности и гидрофильности системы.

Полученные результаты показывают, что на скорость гидролиза в данных системах, имеющих близкую молекулярную массу, главным образом оказывает влияние строение гидролизующихся групп, связывающих остаток АЦК с цепью полимера-носителя.

В отличие от химического гидролиза полимерных форм АЦК, практически не протекающего при комнатных температурах при значениях рН, близких к нейтральным, ферментативный гидролиз полимеров протекает в более мягких условиях. Это было подтверждено исследованием гидролиза полимера II в присутствии ферментного комплекса проназы. Так, при 20° и рН = 7,4 (фосфатный буфер) значение эффективной константы скорости реакции в присутствии проназы достигало $1,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л·с и было значительно выше, чем для случая химического гидролиза.

Этот факт подтверждает определенную роль ферментативного гидролиза в проявлении активности фитоактивными полимерами.

Исследование биологической активности полученных полимеров показало определенное влияние их химического строения на способность проявления ретардантного эффекта, проявляющегося в стандартном биотесте на уменьшение длины первого листа проростков ржи (таблица).

Так, полимеры, имевшие более высокие скорости гидролиза, проявляли более заметное ретардантное действие. При этом наибольшая активность проявлялась у полимера, в котором АЦК был связано с полимерной цепью карбаматной связью и который показал наибольшую способность к гидролизу.

Более низкой биологической активностью обладали полимеры амидов малеиновой кислоты II—IV и полимер с амидной группой V, проявлявшие и более низкую склонность к гидролизу. В то же время, несмотря на достаточно высокую скорость гидролиза полимеров, содержащего имидную группу, он не обладал биологической активностью. Возможно, этот факт обусловлен низкой способностью имидной группы к гидролизу в условиях функционирования фитоактивного полимера в биологическом объекте.

Таким образом, исследование способности к химическому и ферментативному гидролизу полимерных производных АЦК различного химического строения может быть использовано для прогнозирования их биологической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршак В. В., Штильман М. И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: 1984. 261 с.
2. Штильман М. И./Химия и технология высокомолекулярных соединений (Итоги науки ВИНИТИ). 1987. Т. 20. С. 252.
3. Miller J. M., Yahaiani A./Bioactive Polymer Systems/Ed. by Gebelein C. G., Garraher C. E. New York; London. 1985. P. 121.
4. Shtilman M. I./31st IUPAC Makromolecular Symposium. Merseburg, 1987. P. 269.
5. Shtilman M. I./Preprints and Abstracts of the 16th Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials/Ed. by Peariman R., Fillan Miller J. Chicago, 1989. P. 110.
6. Shtilman M. I., Tsatsakis A. M., Dais P., Shashkova I. M., Angelakis K./Program and Abstracts of the 17th Int. Symp. of the Controlled Release of Bioactive Materials/Ed. by Lee H. L. Reno (Nevada, USA), 1990. P. 67.
7. Allan G. G., Chopra C. S., Neogi A. N., Wilkins R. M./Nature (London). 1971. V. 234. P. 349.
8. Allan G. G., Cousion M. J., Mikels R. A./Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. 1979. V. 20. P. 341.

9. McCormick C. L., Kim Ki Soo, Ezzell S. A.//Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. 1987. V. 28. P. 97.
10. McCormick C. L., Kim Ki Soo, Ezzell S. A.//J. Contr. Release. 1988. V. 7. P. 101.
11. McCormick C. L., Kim Ki Soo, Ezzell S. A.//J. Contr. Release. 1988. V. 7. P. 109.
12. Bittner S., Perry I.//Chimie. et industrie. 1981. V. 61. P. 291.
13. Bittner S., Perry I., Knobler Y.//Phytochemistry. 1977. V. 16. P. 305.
14. Kramell R., Miller P., Knofel A. Pat. 121785 GDR. 1976//Chem. Abstrs. 1977. V. 87. 1189b.
15. Муромцев Г. С., Павлова З. Н., Зарезова Г. Н., Штильман М. И.//Физиология и биохимия культурн. растений. 1990. Т. 22. С. 55.
16. Штильман М. И., Коршак В. В., Ярошенко И. В.//Изв. вузов. Химия и хим. технология. 1982. Т. 25. С. 984.
17. Коршак В. В., Штильман М. И., Восканян П. С., Тарасов В. Н.//Тез. докл. Всесоюз. конф. «Биологически активные полимеры и полимерные реагенты для растениеводства». Нальчик, 1980. С. 45.
18. Романовская О. И., Курушина Н. В., Штильман М. И., Корнаков М. Я.//Изв. ЛатвАН. 1966. Т. 456. С. 36.
19. Коршак В. В., Штильман М. И., Давидович Ю. А., Корнаков М. Я.//М., 1986. 6. с.—Деп. в ВИНТИ, № 2561.

Московский химико-технологический
институт им. Д. И. Менделеева

Поступила в редакцию
04.02.92

Институт биологии Академии наук
Латвии, Саласпилс

Критский университет,
Ираклион, Греция

M. I. Shil'man, M. Ya. Kornakov, A. M. Tsatsakis,
N. V. Kurushina, T. P. Zalukaeva

**POLYMER DERIVATIVES
OF 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID**

С у м м а г у

Polymer derivatives of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (the plants grows and development regulator) have been synthesized by two methods: by interaction of trimethylsilyl derivatives of this acid with polyvinyl alconol and copolymers of maleic anhydride and by copolymerization of the methacryloyl derivative of the same acid ester with N-vinylpyrrolidone. Study of hydrolysis of polymers by the thin-layer chromatography method showed the character of the influence of their chemical structure on the separation of the low-molecular acid and correlation of the hydrolysis rate with biological activity of the polymers.