

УДК 541.64:542.938

ГИДРОЛИЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В РЯДУ ВОДОРАСТВОРIMЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ЭФИРОВ АРИЛСОДЕРЖАЩИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ¹

© 1997 г. М. И. Штильман*, А. М. Tsatsakis**, J. C. Vlahos***, А. А. Хачанян*,
М. Dragassaki***, П. С. Восканян*, И. М. Шашкова*

* Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева
125047 Москва, Миусская пл. 9

** Crete University, Greece, 71110 Iraklion

*** Technological Education Institute of Iraklion, Greece, 71500 Iraklion

Поступила в редакцию 01.02.97 г.

Принята в печать 09.07.97 г.

Установлено, что скорость щелочного гидролиза полимерных эфиров ряда монокарбоновых кислот, относящихся к регуляторам роста растений ауксиновой группы (2,4-дихлорфеноксикусной, 1-нафтилкусной, 2-нафтоксикусной, 2-нафтилиоуксусной), понижается с уменьшением силы кислоты, повышением молекулярной массы полимеров и при наличии в них боковых карбоксильных групп. На примере полимерных эфиров 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты показано, что для полимеров с низкими скоростями гидролиза зона максимальной стимулирующей активности смешивается в область более высоких концентраций.

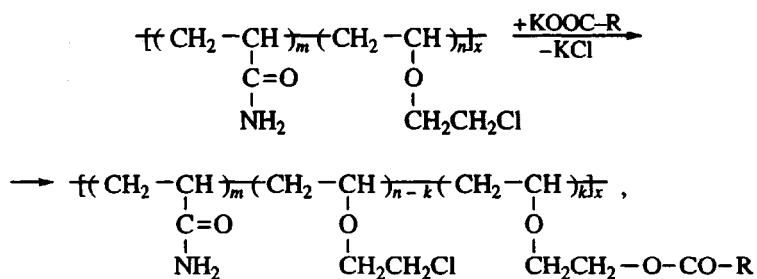
Полимерные производные регуляторов роста и развития растений (фитоактивные полимеры) проявляют активность в результате гидролитического выделения низкомолекулярного регулятора с последующим поступлением его в биологический объект [1–3]. Поэтому изучение особенностей гидролиза и биологической активности таких высокомолекулярных соединений и исследование влияния на этот процесс их химического строения может дать важную информацию, определяющую возможность создания более эффективных препаратов.

Ранее в ряду поливиниловых эфиров 2,4-дихлорфеноксикусной (2,4-Д) и 1-нафтилкусной (НУК) кислот, наиболее часто рассматриваемых в качестве модели регуляторов роста растений ауксиновой группы, было показано, что скорость гидролиза сложной эфирной группы, связывающей

регулятор с полимерным носителем, понижается при повышении молекулярной массы полимера и содержания в нем остатков регулятора [4].

Настоящая работа посвящена исследованию щелочного гидролиза водорастворимых карбокипных полимерных эфиров арилсодержащих карбоновых кислот ауксиновой группы, отличающихся строением остатка регулятора и содержащих различные боковые лиофилизующие группы.

В качестве объектов исследования в работе использовали полимерные эфиры, полученные взаимодействием сополимера акриламида и винил-2-хлорэтилового эфира (94.9 : 5.1) с калиевыми солями 2,4-Д, НУК, 2-нафтоксикусной (НОУК) и 2-нафтилиоуксусной (НТУК) кислот:

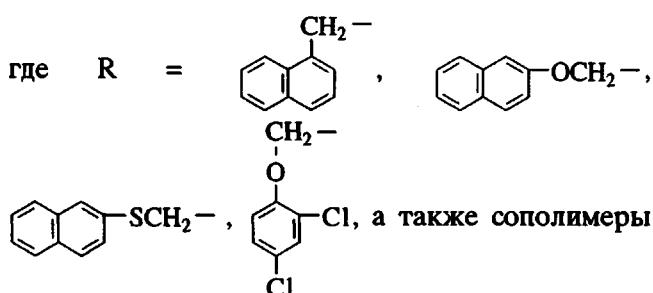


¹Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 94-03-08372) и Международного научного фонда (грант JVC 100).

Таблица 1. Константы гидролиза полимерных эфиров, полученных реакцией калиевых солей кислот с сополимером акриламида и ВХЭЭ (рН 10.0, $T = 313$ К)

Кислота	pK_a	Полимерный эфир	
		A^* , мол. %	$k_{\text{зф}}^0$, л/моль с
НУК	5.12	0.82	0.56
НОУК	3.38	0.76	7.47
НТУК	3.13	0.69	9.20
2,4-Д	2.94	0.78	12.9

* A – содержание звеньев с остатками карбоновых кислот.



аллилового эфира 2,4-Д (АЭ 2,4-Д) с акриламидом, N-винилпирролидоном и акриловой кислотой, полученные радикальной полимеризацией.

В работе использовали также водорастворимый низкозамещенный поливиниловый эфир 2,4-Д.

Выбор этих полимеров позволил выявить влияние строения радикала регулятора и типа боковой лиофилизующей группы на протекание гидролиза.

Для сравнения биологической активности полимеров был использован стандартный биотест, применяемый для исследования биологической активности регуляторов роста и развития растений ауксинового типа – стимулирование под действием растворов регулятора удлинения колеоптилей (отрезков, вырезанных из цилиндрической части проростков злаков).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные вещества

Сополимер акриламида и винил-2-хлорэтилового эфира (ВХЭЭ) и полимерные эфиры карбоновых кислот на его основе. Сополимер акриламида и ВХЭЭ с содержанием звеньев ВХЭЭ 9.8 мол. % и $M_w = 24 \times 10^3$ получали сополимеризацией мономеров в среде изопропанола в присутствии ДАК [5]. Синтез полимерных эфиров 2,4-Д, НУК, НОУК и НТУК путем взаимодействия сополимера акриламида и ВХЭЭ с калиевыми солями кислот в среде ДМСО описан в работе [5]. Для исследования были выбраны полимерные эфиры с со-

держанием звеньев с остатками активного вещества 0.7–0.8 мол. % (табл. 1).

Сополимеры аллилового эфира 2,4-Д (типовая методика). В колбу, снабженную мешалкой, термометром, обратным холодильником и вводом инертного газа, загружали 20.9 г (0.08 моля) АЭ 2,4-Д, 2.64 г (0.12 моля) акриловой кислоты, 0.33 г (0.022 моля) азодиизобутиронитрила и гептан, которым доводили общий объем реакционной смеси до 100 мл. Содержимое продували инертным газом и нагревали до 353 К при перемешивании. Через 20 мин после выпадения продукта, реакционную смесь охлаждали и сополимер отделяли фильтрованием, промывали на фильтре гептаном и сушили в вакууме до постоянной массы. Выход 18.6 г (70%).

Сополимеры с акриламидом и N-винилпирролидоном получали аналогично. В качестве растворителя использовали изопропиловый спирт. При этом образующийся сополимер с акриламидом в ходе реакции выпадал в осадок, а сополимер с N-винилпирролидоном был выделен осаждением в диэтиловый эфир.

Для получения сополимеров с требуемыми ММ и содержанием в сополимерах звеньев с остатком регулятора сополимеризацию проводили при варировании соотношения мономеров в исходной смеси.

Полученные сополимеры фракционировали дробным осаждением с отделением выпадающих фракций центрифугированием. Для сополимера с акриловой кислотой в качестве растворителя использовали изопропиловый спирт, в качестве осадителя – гептан, для сополимера с акриламидом, соответственно – ДМСО и изопропиловый спирт, для сополимера с N-винилпирролидоном – диоксан и диэтиловый эфир. В каждой фракции определяли вязкость и содержание активного вещества.

В работе использовали также поливиниловый эфир 2,4-Д с $M_w = 29.0 \times 10^3$, полученный ацилированием поливинилового спирта хлорангидридом кислоты в среде ДМАА [4].

Содержание в полимерах кислот находили по поглощению в УФ-области при $\lambda = 284$ (2,4-Д), 282 (НУК), 271 (НОУК), 252 нм (НТУК) в водной среде (спектрофотометр "Specord M-40").

ММ сополимеров при низком содержании заместителей определяли вискозиметрически по известным формулам – для сополимера акриламида (в воде) $[\eta] = (6.31 \times 10^{-3}) M_w^{0.8}$ [6], сополимера N-винилпирролидона (в воде) $[\eta] = (1.3 \times 10^{-2}) M_w^{0.68}$ [7], сополимера с акриловой кислотой (в диоксане) $[\eta] = (76 \times 10^{-5}) M_w^{0.5}$ [8].

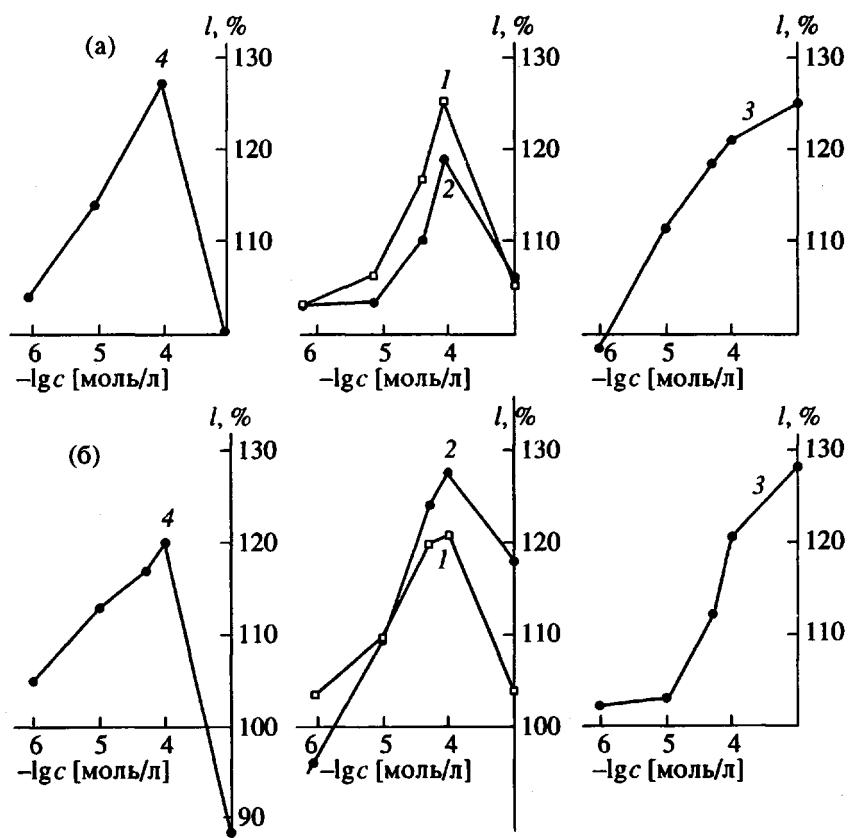


Рис. 1. Влияние концентрации регулятора (в пересчете на 2,4-Д) на длину (выраженную в процентах от контроля) колеоптилей пшеницы (а) и ячменя (б) для сополимеров АЭ 2,4-Д с акриламидом (1), N-винил-пирролидоном (2), акриловой кислотой (3) и низкомолекулярной 2,4-Д (4).

Исследование гидролиза

К навеске полимера в виде мелкодисперсного порошка, отсеянного на сите с диаметром отверстий 0.1 мм (~ 0.01 г), добавляли 0.5 мл бидистиллированной воды и выдерживали при 50°C и перемешивании 3 ч. После растворения полимера температуру в реакционной смеси доводили до требуемой и в емкость вводили 4.5 мл терmostабилизированного буфера с pH 10.0 (фиксант фирмы "Merck"), отмечая время начала реакции.

Количество выделившейся кислоты определяли в аликовтной доле высокоеффективной жидкостной хроматографией после введения отобранной пробы в инжектор. В работе использовали набор для ВЭЖХ фирмы LKB, снабженный колонкой Bondapak C₁₈ фирмы "Waters".

Выделившиеся кислоты детектировали при $\lambda = 280$ нм. Элюент — смесь метанола, воды и уксусной кислоты (145 : 130 : 15 об. долей).

Способность исследованных полимеров к гидролизу оценивали по значениям констант скорости реакции, рассчитанным по уравнению второго порядка с учетом начальных концентраций сложных эфирных групп и $[\text{OH}^-]$ и скоростей ре-

акции, определенных методом касательных к кинетическим кривым. При обсуждении полученных результатов использовали константы скорости, относящиеся к начальным моментам реакции ($k_{\text{зф}}^0$). Точность эксперимента, определенная в нескольких сериях по пяти параллельным пробам, составляла 2.5–4.0% (для вероятности 0.05).

Исследование биологической активности

По 15–20 сегментов колеоптилей длиной 10 мм, вырезанных из 17–18-миллиметровых проростков семян пшеницы (*Triticum vulgare L.*) сорта *Vergina* и ячменя (*Hordeneum vulgare L.*) сорта *Hexastichum* [9], помещали в пятисантиметровые стерильные чашки Петри, содержащие по 10 мл раствора полимеров с различной концентрацией регулятора (контроль — дистиллированная вода). Чашки выдерживали 24 ч в темном воздушном термостате при 25°C . По истечении этого времени колеоптили извлекали и их длину измеряли с точностью до 0.5 мм. На рис. 1 приведены средние арифметические значения длин колеоптилей в процентах от контроля.

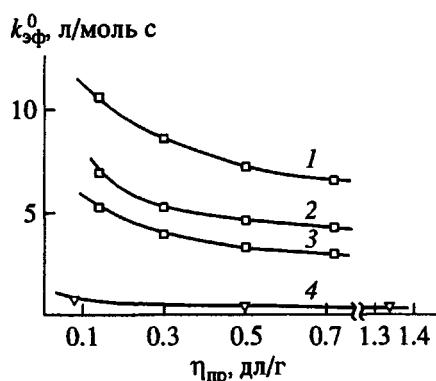


Рис. 2. Влияние $\eta_{\text{пр}}$ на $k_{\text{эф}}^0$ гидролиза сополимеров АЭ 2,4-Д с акриламидом (1–3) и акриловой кислотой (4). $T = 308$ (1), 303 (2), 298 (3), 343 К (4). Концентрация субстрата $c \times 10^3 = 1.3$ – 1.4 (1–3) и 4.7 – 5.6 осново-моль/л (4); содержание в сополимерах звеньев АЭ 2,4-Д 0.49 – 0.51 (1–3); 3.7 – 4.7 мол. % (4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранный ряд полимерных эфиров позволил выявить характер влияния некоторых особенностей их химического строения на протекание гидролиза. При этом для исключения существенного влияния на протекание гидролиза компактизации макромолекулярного клубка, наблюдающейся при введении в водорастворимые полимеры боковых ароматических заместителей [4], в настоящей работе были рассмотрены главным образом полимерные эфиры, содержащие невозмущающие количества звеньев с остатками кислот (0.7–0.8 мол. %). Это количество гидрофобных заместителей было близко к содержанию обычно вводимых в полимеры специальных меток (флуоресцентных, парамагнитных и т.п.).

Получаемые кинетические кривые имели обычный вид и не содержали перегибов. Поскольку в работе исследовали щелочной гидролиз ($\text{pH} 10.0$), для расчета констант скорости реакции было использовано стандартное уравнение

второго порядка, рекомендуемое для гидролиза сложных эфиров в аналогичных условиях и отличающее известной схеме реакции с нуклеофильной атакой OH^- атома углерода карбонила сложной эфирной группы. Правильность выбора данного уравнения была подтверждена определением частных порядков по реагентам, которые оказались близкими к первым.

В табл. 1 приведены значения констант скорости реакции $k_{\text{эф}}^0$ полимерных эфиров различных карбоновых кислот, полученных взаимодействием с сополимером акриламид-ВХЭ. Как видно из таблицы, в этих условиях основное влияние на протекание гидролиза оказывает строение радикала карбоновой кислоты, которое, как и в случае низкомолекулярных сложных эфиров, сказывается на силе кислоты и прочности гидролизуемой связи.

Полученные данные показывают, что увеличение силы кислоты приводит к значительному возрастанию скорости гидролиза. В исследуемом ряду наибольшей способностью к гидролизу обладал полимерный эфир наиболее сильной 2,4-Д, а наименьшей — полимерный эфир наиболее слабой НУК.

Ранее [4] в ряду поливиниловых эфиров 2,4-Д и НУК было показано, что увеличение ММ способствует постепенному снижению значений констант скорости гидролиза, причем наиболее явно это снижение проявляется в области более низких молекулярных масс.

В настоящей работе это явление было подтверждено на примере фракционированных водорастворимых сополимеров АЭ 2,4-Д с акриламидом и акриловой кислотой (рис. 2). В данном случае в каждом ряду был исследован гидролиз фракций сополимеров, содержащих близкие и невысокие количества заместителей. Возможно, наблюдаемый характер влияния на гидролиз ММ полимеров связан с возрастающим пространственным влиянием полимерной цепи [10].

В табл. 2 приведены значения констант скорости гидролиза сополимеров АЭ 2,4-Д с различными

Таблица 2. Значения $k_{\text{эф}}^0$ гидролиза полимерных эфиров 2,4-Д ($\text{pH} 10.0$; $T = 308$ К)

Тип полимерного эфира	Содержание звеньев в 2,4-Д, мол. %	$M_w \times 10^{-3}$	$k_{\text{эф}}^0$, л/моль с
Поливиниловый эфир	0.72	29	5.20
Сополимер АЭ 2,4-Д с акриловой кислотой	0.68	25	0.29*
Сополимер АЭ 2,4-Д с акриламидом	0.51	26	8.42
Сополимер АЭ 2,4-Д с N-винилпирролидоном	0.75	27	5.95

* Определена при 343 К.

гидрофильными сомономерами – акриламидом, N-винилпирролидоном и акриловой кислотой. Для сравнения в таблице приведена также константа скорости гидролиза поливинилового эфира 2,4-Д. Все эти полимеры растворимы в воде. Поскольку в них входит один и тот же регулятор, а ММ полимеров и содержание в них остатков активного вещества практически одинаковы (причем последнее не превышает 0.75 мол. %, т.е. находится в пределах невозмущающих количеств), при изучении способности полимерных эфиров к гидролизу можно непосредственно сравнивать влияние на гидролиз такого фактора, как строение боковой лиофилизующей группы.

Как видно из табл. 2, значения $k_{3\phi}^0$ для производных поливинилового спирта, акриламида и N-винилпирролидона близки, что показало несущественное влияние на гидролиз характера строения их боковых групп (гидроксильной, первичной амидной и циклической амидной) и различия в строении макромолекулярного клубка.

Несколько более высокая константа скорости в случае гидролиза сополимера акриламида, возможно, обусловлена взаимодействием сложной эфирной и соседней амидной групп с образованием водородной связи и промежуточной имидной структуры [11].

Значения $k_{3\phi}^0$ для сополимера акриловой кислоты, находящегося в условиях щелочного гидролиза в солевой форме, была значительно ниже, чем в случае других полимерных эфиров, хотя гидролиз проводили при 343 К, т.е. при более высокой температуре. Более низкие значения $k_{3\phi}^0$ сополимеров акриловой кислоты видны и на рис. 2, где показано влияние на гидролиз ММ полимеров.

Вероятно, более низкие скорости гидролиза для сополимеров акриловой кислоты в щелочной среде являются результатом влияния отрицательно заряженной карбоксилатной группы, находящейся в соседнем звене и препятствующей поступлению катализирующего гидролиз иона OH⁻ в зону контакта с гидролизующейся сложной эфирной группой. По-видимому, в данном случае не может быть реализован механизм гидролиза, сопровождающийся катализом карбоксилатной группой с промежуточным образованием ангидрида, описанный для ряда эфиров полиакриловых кислот [12].

Ранее было показано, что для полимеров с более низкой скоростью щелочного гидролиза зона наибольшего стимулирования, найденная для реального биологического объекта, смешена в область более высоких концентраций [9].

Подобная ситуация наблюдается и для сополимеров АЭ 2,4-Д в стандартном для ауксинов биотесте по стимулированию роста колеоптилей (отрезков, вырезанных из цилиндрической части проростков злаков). Результаты этих опытов приведены на рис. 2 как зависимость длины колеоптилей, выдержаных в растворах полимера с различной концентрацией, выраженной в процентах от длины выдержаных в воде контрольных образцов.

Как видно, для сополимеров акриламида и N-винилпирролидона, гидролизующихся с высокой скоростью, характер зависимости уровня активности от концентрации близок к аналогичной зависимости для низкомолекулярной 2,4-Д. При этом в обоих случаях область стимулирования характеризуется экстремальной зависимостью с тенденцией к ингибированию при концентрациях, превышающих оптимальные.

Такой же характер зависимости наблюдался, ранее для приведенного в табл. 2 поливинилового эфира 2,4-Д, имеющего скорость гидролиза, близкую к скоростям гидролиза сополимеров АЭ 2,4-Д с акриламидом и N-винилпирролидоном [9].

В случае сополимера АЭ 2,4-Д с акриловой кислотой, гидролизующегося с более низкой скоростью, активное стимулирование наблюдается во всем диапазоне исследованных концентраций, а начало области ингибирования не проявляется вообще.

Эти результаты подтверждают выводы работы [9] о возможности целенаправленного синтеза фитоактивных полимеров с оптимальным характером биологической активности, исходя из данных по скорости выделения низкомолекулярного регулятора, найденных в модельных условиях их химического гидролиза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsatsakis A.M., Shtilman M.I. // Plant Morphogenesis / Ed. by Angelakis K. New York; London: Plenum Press, 1993. P. 255.
2. Tsatsakis A.M., Shtilman M.I. // Plant Growth Regulation. 1994. V. 14. № 1. P. 69.
3. Штильман М.И. // Высокомолек. соед. Б. 1995. Т. 37. № 5. С. 902.
4. Штильман М.И., Тсатсакис А.М., Хачанян А.А., Восканян П.С., Селала М., Шашкова И.М. // Высокомолек. соед. Б. 1996. Т. 38. № 6. С. 1076.
5. Штильман М.И., Саркисян М.Б., Tsatsakis A.M., Шашкова И.М., Dais P. // Высокомолек. соед. А. 1995. Т. 37. № 1. С. 29.
6. Polymer Handbook / Ed by Brandrup J., Immergut E.H. New York: Wiley, 1989.
7. Frank H.P., Levy G.B. // J. Polym. Sci. 1953. V. 10. № 2. P. 371.

8. Липатов Ю.С., Нестеров А.Е., Грищенко Т.М., Веселовский Р.А. Справочник по химии полимеров. Киев: Наукова думка, 1971.
9. Штильман М.И., Тсатсакис А.М., Vlahos J.C., Dragassaki M., Восканян П.С., Шашкова И.М. // Физиология растений. 1997 (в печати).
10. McCormick C.L., Kim Ki Soo, Ezzell S.A. // J. Contr. Release. 1988. V. 7. № 2. P. 109.
11. Behme M.T., Cordes E.H. // J. Org. Chem. 1964. V. 29. № 5. P. 1255.
12. Morawetz H., Zimmerman P.E. // J. Phys. Chem. 1964. V. 29. № 3. P. 753.

Hydrolysis and Biological Activity in a Series of Water-Soluble Polymeric Esters of Aryl-containing Carboxylic Acids

M. I. Shtil'man*, A. M. Tsatsakis, J. C. Vlahos***, A. A. Khachanyan*, M. Dragassaki***,
P. S. Voskanyan*, and I. M. Shashkova***

* Mendeleev University of Chemical Technology,
Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

** Crete University, Greece, 71110 Iraklion

*** Technological Education Institute of Iraklion, Greece, 71500 Iraklion

Abstract—It was established that the rate of alkaline hydrolysis of polymeric esters of a number of monocarboxylic acids falling into the category of plant growth regulators of the auxin group (2,4-dichlorophenoxyacetic, 1-naphthylacetic, 2-naphthoxyacetic, and 2-naphthylthioacetic) decreases as the strength of the acid decreases and the molecular mass of the polymer increases. The presence of side carbonyl groups also reduces the rate of hydrolysis. Using polymeric esters of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as an example, it was shown that, for the polymers with low rates of hydrolysis, the zone of the maximum stimulating activity shifts to the region of higher concentrations.