

На правах рукописи



СУПРУН ОЛЬГА ВАСИЛЬЕВНА

**Полимерные комплексы сорбиновой кислоты и их
антифунгальное действие**

Специальность: 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2006

Работа выполнена в Российском химико-технологическом университете
имени Д.И.Менделеева

Научный руководитель	доктор химических наук, профессор Штильман М.И.
Официальные оппоненты	доктор химических наук, профессор Ямсков И.А. доктор химических наук, профессор Коршак Ю.В.
Ведущая организация	Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «01» ноября 2006 г. в 14⁰⁰ часов на заседании
Диссертационного совета Д 212.204.01 в Российском химико-
технологическом университете им. Д.И.Менделеева (125047 Москва,
Миусская площадь, д.9.) в ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном
центре РХТУ им. Д.И.Менделеева

Автореферат разослан «29» сентября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Д 212.204.01, доцент, кандидат технических наук

Л.Ф.Клабукова

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Создание биологически активных систем, обладающих повышенной эффективностью, имеет большое значение для разработки новых типов препаратов, предназначенных для применения в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве, пищевой и косметической промышленности.

Одним из направлений разработки таких систем, привлекающих в последнее время широкое внимание, является использование биологически активных веществ в виде форм с контролируемым выделением этих веществ. В большинстве случаев такие формы содержат макромолекулярные компоненты, связанные с выделяющимся активным веществом лабильной (чаще всего за счет гидролиза) связью.

В частности, для таких препаратов, обладающих пролонгированным (контролируемым) действием, важную роль играет прочность связи полимерного носителя и выделяющегося активного вещества. В большинстве случаев связывание компонентов системы реализуется за счет образования между ними гидролизуемой ковалентной, реже ионной, связями.

В то же время, для препаратов с ингибирующей и биоцидной активностью, когда требуется обеспечить высокую концентрацию активного вещества уже в начальные периоды действия, эффективность препарата может обеспечить образование более слабой связи полимерного носителя и иммобилизованного вещества, например, водородной связи.

Несмотря на то, что получение таких полимерных комплексов осуществляется значительно проще, чем систем с ковалентной связью, разработка эффективных препаратов на их основе сдерживается недостаточной изученностью взаимосвязи их строения и активности.

В связи с этим, большое значение имеют выбор технологически доступных методов получения таких систем и оптимизация их строения в соответствии с требуемыми свойствами.

В том числе это относится к препаратам, обладающим фунгицидным и фунгистатическим действием, находящим применение в различных областях.

Цели и задачи исследования. Целью работы является получение новых полимерных производных сорбиновой кислоты (полимерных комплексов с поли-N-винилпирролидоном и полимерных эфиров на основе эпоксидсодержащего поли-N-винилпирролидона), обладающих антифунгальной активностью по отношению к микроскопическим грибам, и исследование влияния их строения на свойства и активность. Выбор данного активного вещества в том числе связан с его весьма низкой побочной токсичностью для человека и широкими возможностями практического применения.

Научная новизна.

- Получены полимерные комплексы сорбиновой кислоты и поли-N-винилпирролидона широкого ряда молекулярных масс (от 2 до 360 тыс), исследованы их свойства и показана высокая антифунгальная активность против различных типов микроскопических грибов.

- Исследованием ИК-спектров системы «полимер-кислота» установлено, что взаимодействие ее компонентов реализуется с участием водородной связи между водородом карбоксильной группы и кислородом карбонильной группы пирролидового кольца полимера, причем с использованием диализа, вискозиметрии и метода конкурентного комплексообразования показано, что устойчивость комплексов поли-N-винилпирролидона и сорбиновой кислоты повышается с увеличением молекулярной массы полимера.

- Установлено, что уровень антифунгальной активности иммобилизованной на полимерном носителе сорбиновой кислоты (на примере *Fusarium oxysporum f. radicis-cucumerinum* N-10, *Candida albicans* TEI 101, *Candida tropicalis* TEI 184, *Aspergillus parasiticus* 1130, *Penicillium viridicatum* CA 100) определяется прочностью ее связи с полимерным носителем, повышаясь с

ее уменьшением, причем активность полимерных комплексов сорбиновой кислоты с поли-N-винилпирролидоном превышает активность самой кислоты, сорбата калия и ее полимерных эфиров.

Практическая значимость. Показано, что полученные системы могут найти применение в ряде пищевых технологий, в частности для создания грибоустойчивой бумажно-полимерной упаковки и оболочки пищевых продуктов.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на Международных конференциях Biomed 2002 (IXth International Symposium on Biomedical Science and Technology [19-22 Sept. 2002, Kemer-Antalya, Turkey], European Material Research Society. Fall Meeting [Warsaw, 15-19 September, 2003], «Биологически активные полимеры: Синтез, свойства и применение» [Ташкент, 2003] и XIV, XV и XVI Международных конференциях молодых ученых [2002, 2003, 2004, Москва].

Публикации. Основные положения и результаты работы изложены в 13 печатных работах, в том числе, 5 статьях в журналах и сборниках, 3 тезисах докладов и 4 депонированных рукописях. 1 статья отправлена в печать.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на _____ страницах, состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы; содержит _____ таблиц, _____ рисунков, _____ библиографических ссылок.

2. Полученные результаты и их обсуждение

Как известно, сорбиновая кислота (СК), являющаяся известным антифунгальным агентом, обладающим низкой токсичностью и широко используемым в пищевой промышленности, медицине, биотехнологии является наиболее активной в ряду низкомолекулярных карбоновых кислот, обладающих антифунгальной активностью.

В то же время, недостаточная растворимость СК и невысокая устойчивость самой кислоты и ее солей в жидких средах, их подверженность побочной

биодegradации позволяют предположить, что эффективность сорбиновой кислоты может быть увеличена при ее использовании в виде «систем с контролируемым выделением активного вещества».

В данной работе в качестве таких систем были рассмотрены полимерные комплексы и полимерные эфиры СК, способные выделять свободную кислоту со скоростью, зависящей от строения системы и влияющей на уровень биологической активности.

2.1. Получение полимерных производных сорбиновой кислоты на основе поли-N-винилпирролидона

В качестве полимерного носителя для получения полимерных комплексов в работе был использован поли-N-винилпирролидон (ПВП), который, как известно, образует комплексы с различными соединениями, что, в частности, определяет его широкое использование в качестве компонента кровезаменителей-дезинтоксикаторов и носителя различных лекарственных препаратов. В работе для получения комплексов были использованы полимеры N-винилпирролидона с различной молекулярной массой.

Для исследования и препаративного получения полимерных комплексов было использовано взаимодействие полимерного носителя и кислоты в среде этанола с последующим выделением образовавшегося комплекса осаждением в диэтиловый эфир. Полимерные комплексы могут быть получены и в водной среде.

Исследование влияния на состав полученных полимерных комплексов условий получения показало, что содержание СК в более высокомолекулярных комплексах было ниже (Рис.1). Можно предположить, что это явление связано с более затрудненным образованием комплексов в случае высокомолекулярных полимеров, что возможно объясняется меньшей доступностью их карбонильных групп при более крупном макромолекулярном клубке, особенно, как будет показано ниже, в условиях его компактизации при связывании гидрофобных молекул кислоты.

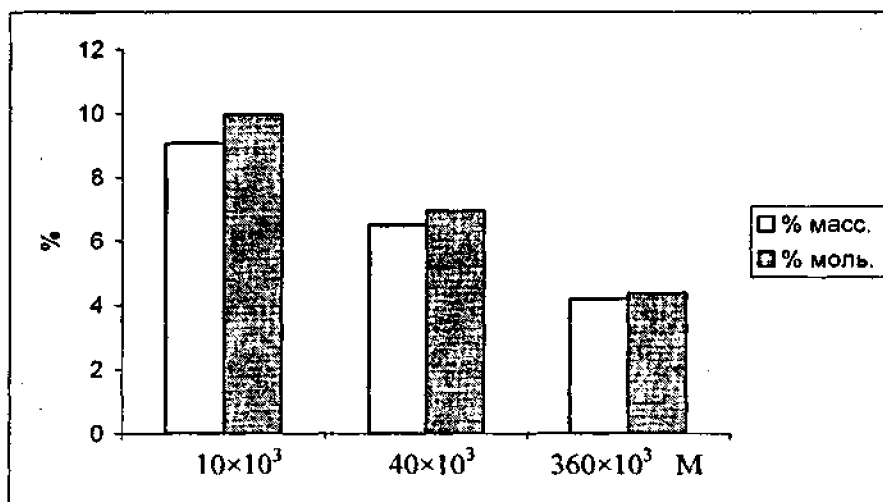


Рис. 1. Влияние молекулярной массы поли-N-винилпирролидона на содержание сорбиновой кислоты в комплексах ($T = 70^\circ\text{C}$, соотношение 1:1 осново-моль/моль).

На рис. 2 приведена зависимость количества связанной кислоты от ее количества, введенного в систему.

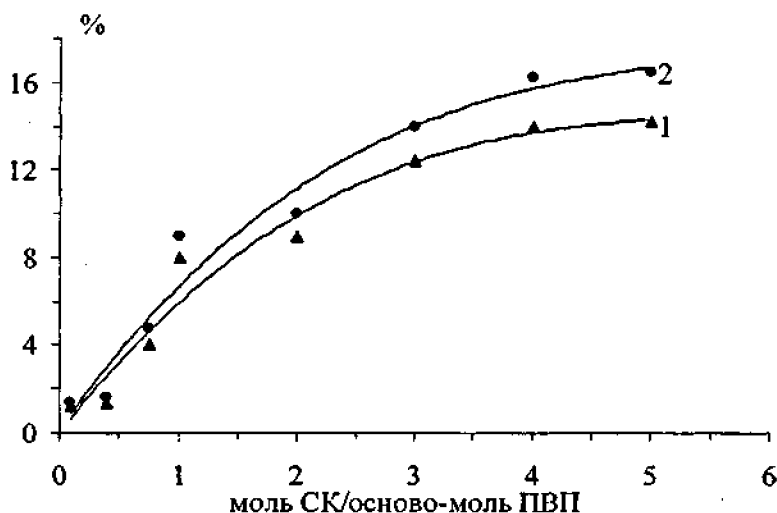
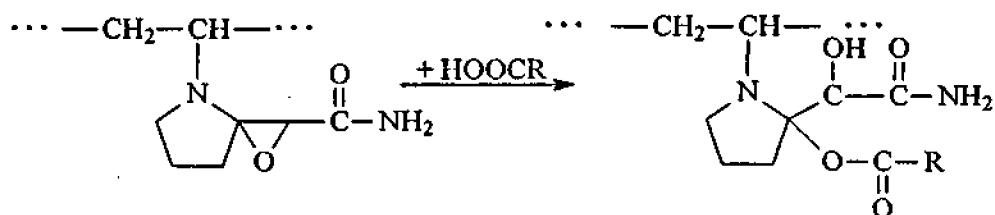


Рис. 2. Влияние соотношения СК:ПВП на содержание сорбиновой кислоты в комплексах ($T = 70^\circ\text{C}$, $M = 10 \times 10^3$). 1- % масс., 2- % мольн.

Содержание сорбиновой кислоты в комплексах, полученных на основе полимеров с различной молекулярной массой (ПК-10, ПК-25, ПК-30, ПК-40, ПК-90,

ПК-360, где цифра обозначает тысячи молекулярной массы) в различных исследованных образцах было от 2,5 до 12,0 масс.% (2,56 – 14,0 молн.%).

Для сравнения свойств полимерных комплексов сорбиновой кислоты с другими ее полимерными производными, в которых кислота связана с полимерным носителем гидролизуемой ковалентной связью, в работе были получены ее полимерные эфиры, которые были синтезированы взаимодействием кислоты с эпоксицикловым полимером N-винилпирролидоном в среде сухого диметилформамида при 100°C:



В этом случае были использованы образцы полимера с различной молекулярной массой (10, 40, 360×10^3) и приблизительно одинаковым содержанием эпексидных групп (7-11 молн.%) и содержанием звеньев со связанной кислотой (3,4-5,1 молн.%).

Содержание сорбиновой кислоты в ее иммобилизованных формах определяли по поглощению в УФ-области ($\lambda = 254$ нм).

2.2. Строение и структура полимерных комплексов.

Для исследования строения комплексов был использован ИК-спектральный анализ. Наличие на спектрах поглощения в области 2500-2800 см^{-1} , отсутствующего на спектре кислоты и на спектре полимера и соответствующего колебанию водородной связи типа $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{O}-$, позволяет полагать, что образование комплекса протекает с участием гидроксила карбоксильной группы и карбонила кольца пирролидона:

характеристической вязкости разбавленных растворов показало снижение последней в случае комплекса по сравнению со свободным полимером уже при введении в раствор 2 мол.% СК, что, вероятно, определяется повышением общей гидрофобности системы после связывания с поли-N-винилпирролидоном кислоты, содержащей длинноцепной алифатический радикал.

Светорассеяние водных растворов. В работе факт компактизации макромолекулярного клубка поли-N-винилпирролидона при связывании с ним сорбиновой кислоты был подтвержден исследованием светорассеяния растворов полимерных комплексов. Эти исследования позволили определить эффективные гидродинамические радиусы комплексов (R_h) используя уравнение Стокса-Эйнштейна.

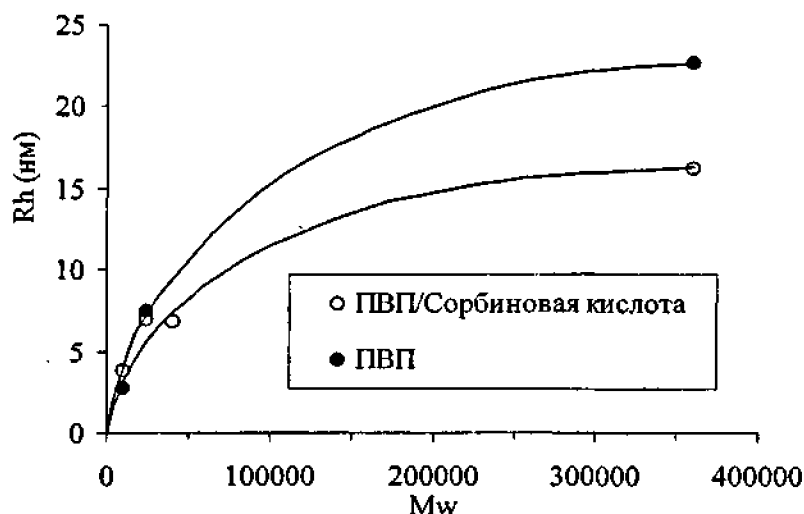


Рис.3. Эффективный гидродинамический радиус ПВП и ПВП/СК комплексов как функция от молекулярной массы полимеров.

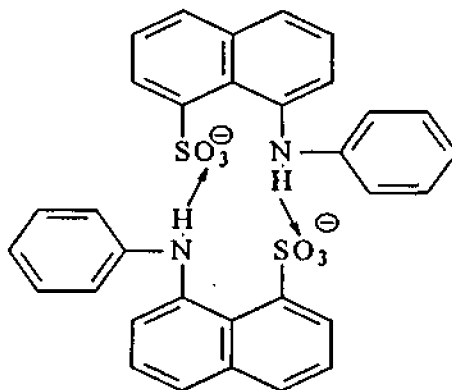
Как было показано (рис.3), введение СК в систему вызывает значительное понижение размеров макромолекулярных клубков полимера, в который введена связанная кислота.

Как видно, соотношение эффективных гидродинамических радиусов чистого поли-N-винилпирролидона и его комплексов с СК зависят от

молекулярной массы полимеров. Причем степень компактизации при увеличении молекулярной массы повышается. При этом во всех случаях эффективные гидродинамические радиусы комплексов ниже, чем у соответствующих полимерных носителей.

Исследование конкурентного комплексообразования. Склонность СК к образованию комплекса с ПВП была оценена также методом конкурентного связывания. Этот метод основан на исследовании спектров флуоресценции двух систем – системы, содержащей ПВП и флуоресцентный краситель и системы, содержащей ПВП, флуоресцентный краситель и СК.

В качестве флуоресцентного зонда в работе была использована N-фенил-1-нафтиламин-8-сульфокислота (1-анилинонафтил-8-сульфокислота) (АНСК), находящаяся в свободном состоянии в виде не флуоресцирующего димера:



и образующая флуоресцирующий комплекс состава 1 молекула АНСК на 1 звено полимера за счет водородной связи между $\text{--SO}_3\text{H}$ группой и карбонилем пирролидинового кольца.

При наличии в системе СК - конкурента в связывании АНСК с полимером, уровень флуоресценции снижался.

Как было показано, интенсивность флуоресценции, с одной стороны, увеличивается с увеличением количества введенной АНСК, а с другой стороны, проявляется зависимость между интенсивностью флуоресценции и молекулярной массой используемого полимера. Наибольшая величина

интенсивности флуоресценции наблюдается для ПВП с молекулярной массой 360×10^3 и уменьшается с уменьшением молекулярной массы.

Зависимость между интенсивностью флуоресценции и молекулярной массой полимера для систем, содержащих СК и АНСК представлена на рис.4.

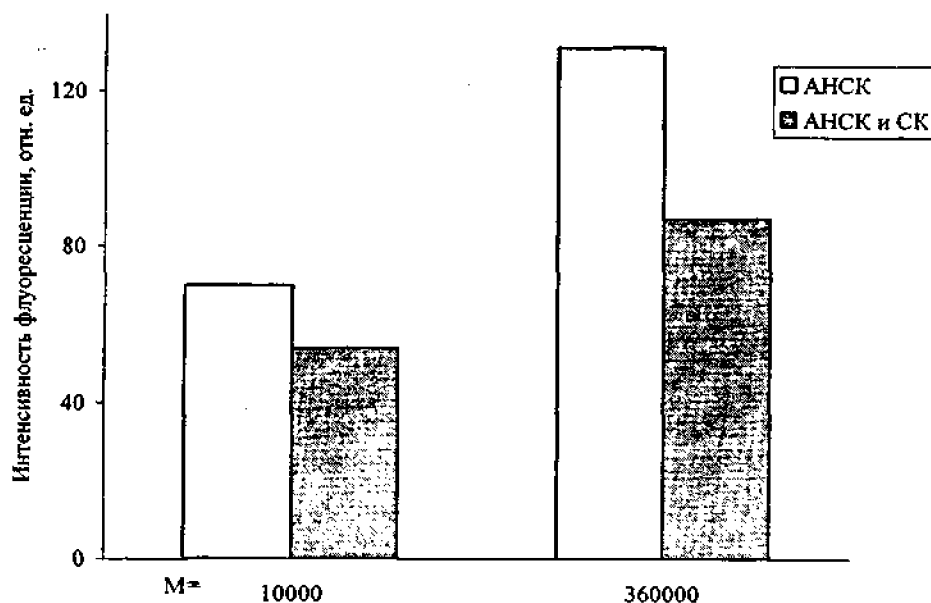


Рис.4. Интенсивность флуоресценции растворов ПВП различной молекулярной массы, содержащих АНСК или АНСК и СК ($\lambda=475$ нм, $[\text{АНСК}] = 6 \times 10^{-4}$ моль/л, $[\text{ПВП}] = [\text{СК}] = 1,2 \times 10^{-4}$ осново-моль/л (моль/л).

Равновесный диализ. Для исследования уровня связывания сорбиновой кислоты в заранее приготовленных комплексах с ПВП в работе был использован метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану (диализные мешки на основе целлюлозы).

При исследованиях были использованы предварительно диализованные через эти же мембраны образцы ПВП молекулярной массы 10 и 360×10^3 . Содержание СК в исследованных при диализе комплексах соответствовало 3 мольн.% звеньев, содержащих связанную СК. Количество выхода кислоты через диализную мембрану оценивали по поглощению при длине волны 254 нм.

Изменение интенсивности поглощения вне диализного мешка при помещении в него раствора комплекса сорбиновой кислоты и полимера с молекулярной массой 10 и 360×10^3 показано на рис. 5.

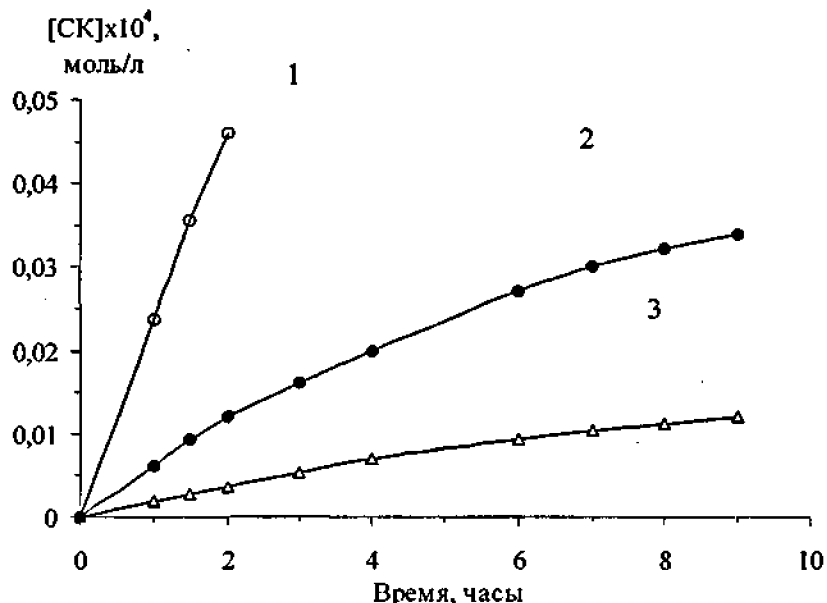


Рис.5. Зависимость количества выхода СК из водного раствора (1), из комплекса СК и ПВП с $M = 10 \times 10^3$ (2), комплекса СК и ПВП с $M = 360 \times 10^3$ (3) через диализную мембрану от времени. Температура 24°C . $[\text{СК}] = 0,5 \times 10^{-4}$, $[\text{ПВП}] = 0,5 \times 10^{-3}$. $\lambda = 254 \text{ нм}$.

Как видно, в случае комплексов скорость выхода СК снижалась с увеличением молекулярной массы полимера, что указывает на большую устойчивость комплексов, образовавшихся на основе ПВП с большей молекулярной массой.

Таким образом, комплексы АНСК и ПВП образуются легче в случае более низкомолекулярных полимеров. Однако, с другой стороны, уже образовавшиеся комплексы более устойчивы в случае более высокомолекулярных полимеров.

Причем, даже в случае такой слабой связи, как водородная, иммобилизация СК на полимерном носителе существенно изменяет свойства системы, что сказывается на скорости выделения активного вещества и

отражается на биологической активности полимерных комплексов по сравнению с самой кислотой.

По-видимому, существенное влияние на выход кислоты оказывает и установленная выше степень компактизации макромолекулярного клубка.

2.4. Биологическая активность полимерных производных сорбиновой кислоты

В работе были исследованы особенности биологической активности полимерных производных сорбиновой кислоты, связанных с полимерными носителями различными типами связи – водородной связью и ковалентной гидролизуемой (в данном случае - сложной эфирной).

Сравнительное исследование антифунгальной активности трех полимерных эфиров и трех полимерных комплексов, полученных на основе полимеров с молекулярной массой 10, 40 и 360×10^3 . Сравнение активности полимерных эфиров и полимерных комплексов проводили на культуре *Fusarium oxysporum f. radicis-cucumerinum* N-10. Опыты проводили методом агаровых блочков в течение шести дней, при 27°C, pH=6.4.

На рис. 6 показана сравнительная эффективность ингибирующего действия этих полимерных производных по окончании эксперимента.

Как видно, во-первых, во всех случаях антифунгальная активность для полимерных носителей с одинаковой молекулярной массой значительно выше в случае полимерных комплексов, и во-вторых, во всех случаях активность повышается с уменьшением молекулярной массы полимеров.

Было показано, что антифунгальная активность повышается с уменьшением молекулярной массы полимерного носителя при действии комплексов и на другие типы микроскопических грибов, например, относящихся к группам плесени (*Aspergillus parasiticus* и *Penicillium viridicatum*) и дрожжей (*Candida tropicalis* и *Candida albicans*) (Таблица 1).

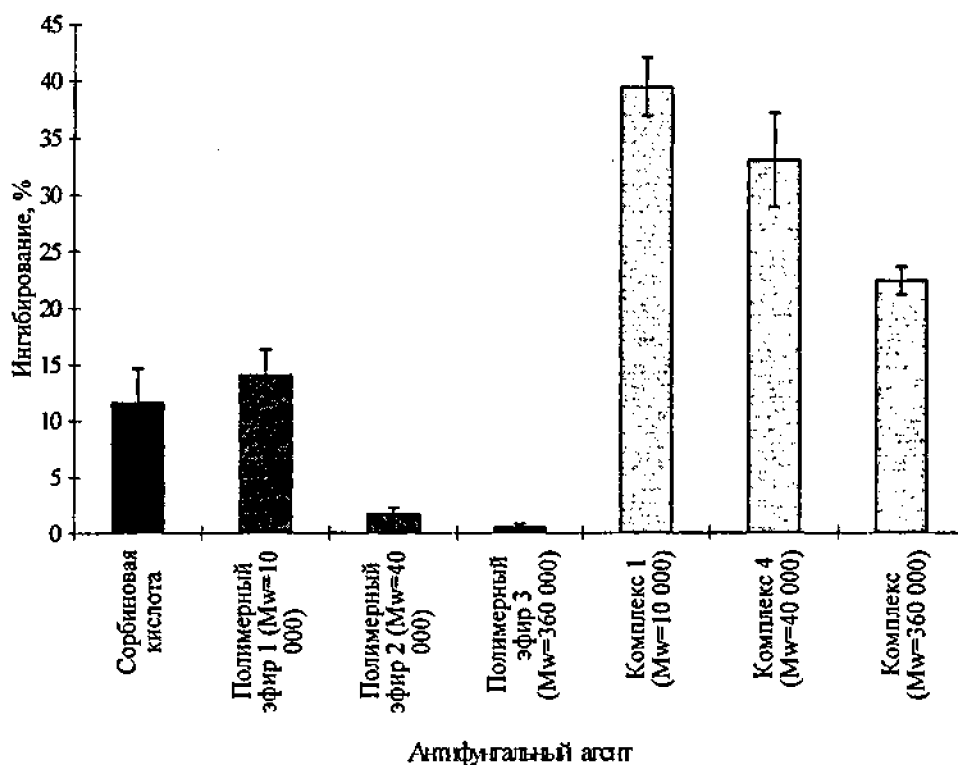


Рис. 6. Степень ингибирования роста колонии культуры *Fusarium oxysporum f. radicis-cucumerinum* N-10 (6 дней, 27°C, pH=6.4) для различных полимерных производных сорбиновой кислоты.

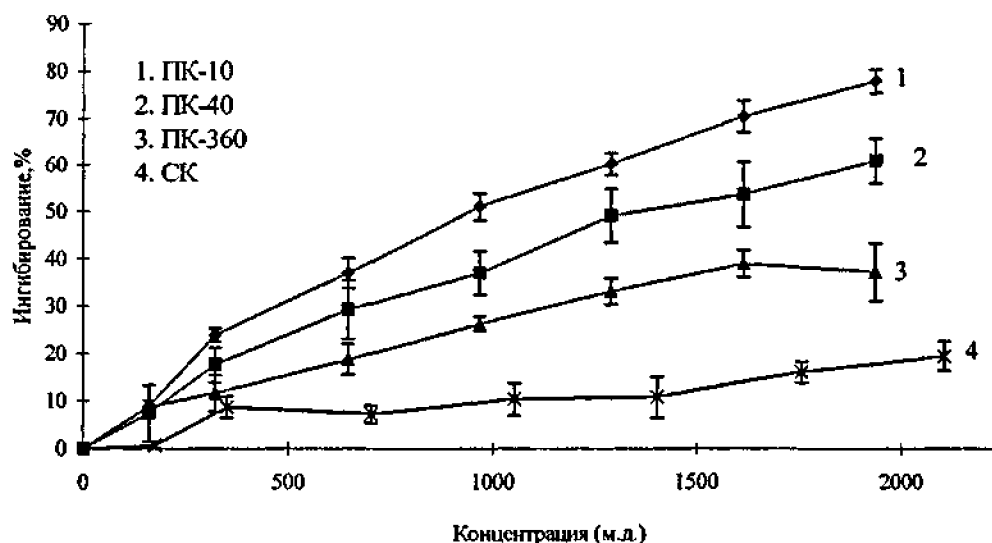


Рис. 7. Зависимость степени ингибирования роста колонии культуры *Fusarium oxysporum f. radicis-cucumerinum* N-10 (6 дней, 27°C, pH=6.4) для различных полимерных комплексов сорбиновой кислоты при различной ее концентрации в комплексах.

Таблица 1

Минимальная ингибирующая концентрация сорбиновой кислоты (СК), сорбата калия (К-С) и полимерных комплексов (ПК) сорбиновой кислоты и поли-N-винипирролидона различной молекулярной массы при действии на различные культуры.

Культура	МИК, мкг/мл							
	СК	К-С	ПК-10	ПК-25	ПК-30	ПК-40	ПК-90	ПК-360
<i>Candida albicans</i> TEI 101	1000	>1000	250	300	400	500	700	1000
<i>Candida tropicalis</i> TEI 184	1000	>1000	300	400	500	600	800	>1200
<i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i> 1130	300	500	100	150	200	250	300	500
<i>Penicillium</i> <i>viridcatum</i> CA 100	500	750	200	250	300	350	500	750

Заметное различие в активности самой СК и ее комплексов было выявлено и в опытах по исследованию способности к росту колоний культур (*Candida tropicalis* TEI 184 и *Aspergillus parasiticus* 1130) после отмывки от среды, содержащей антифунгальный агент.

Как было показано, сама сорбиновая кислота и более высокомолекулярные комплексы оказывают фунгистатическое действие. С другой стороны, в случае комплекса с низкомолекулярным полимерным носителем при длительном культивировании в присутствии антифунгального агента наблюдается фунгициное действие вводимого антифунгального агента (полученные данные приведены в работе).

Таким образом, во всех исследованных случаях повышение активности систем с иммобилизованным антифунгальным агентом проявляется в большей степени при ослаблении прочности связи между носителем и иммобилизованным активным веществом, как это имеет место в случае

перехода от полимерных эфиров к полимерным комплексам или при уменьшении молекулярной массы полимерного носителя.

2.5. Возможности применения

Полученные полимерные комплексы СК представляют собой системы, хорошо растворимые в воде и большинстве органических растворителей и образуют при нанесении из раствора прозрачные гомогенные пленки, обладающие антифунгальной активностью.

Как было показано (опыты проводились в Проблемной лаборатории полимеров и Испытательном центре Московского государственного университета прикладной биотехнологии), комплексы ПВП и СК могут быть использованы в качестве антифунгальных добавок к полимерным латексам, используемым для покрытия сыров, и для пропитки бумажной упаковки продуктов, снижая их осемененность микроорганизмами.

3. Выводы

1. Впервые получены водорастворимые полимерные комплексы сорбиновой кислоты и поли-N-винилпирролидона широкого ряда молекулярных масс (от 10 до 360 тыс), исследованы их свойства и показана высокая антифунгальная активность против различных типов микроскопических грибов. Взаимодействием эпоксидсодержащего поли-N-винилпирролидона различной молекулярной массы и сорбиновой кислоты получен ряд ее водорастворимых полимерных эфиров.

2. Исследованием ИК-спектров системы «поли-N-винилпирролидон – сорбиновая кислота» установлено, что их взаимодействие реализуется с участием водородной связи между водородом карбоксильной группы и кислородом карбонильной группы пирролидового кольца полимера. Изучением рентгенограмм комплексов показано, что при этом нарушается кристаллическая система кислоты.

3. Определением вязкости разбавленных водных растворов комплексов и методом светорассеяния показано, что комплексование поли-N-

винилпирролидона и сорбиновой кислоты приводит к уплотнению макромолекулярного клубка, проявляющемуся в большей мере для более высокомолекулярных полимеров.

4. Методами конкурентного комплексообразования, диализа и исследованием особенностей получения комплексов установлено, что образование и разрушение комплексов происходят легче в случае более низкомолекулярных полимеров.

5. Показана высокая активность комплексов поли-N-винилпирролидона и сорбиновой кислоты по отношению к микроскопическим грибам различных групп. При этом антифунгальная активность полимерных производных сорбиновой кислоты повышается с уменьшением прочности ее связи с полимерным носителем, причем активность полимерных комплексов сорбиновой кислоты с поли-N-винилпирролидоном превышает активность самой кислоты, сорбата калия и полимерных эфиров сорбиновой кислоты.

6. Показано, что полученные полимерные комплексы, обладающие хорошей растворимостью в воде и в полярных органических растворителях и способные к образованию пленок, могут быть использованы для создания антифунгальных покрытий пищевых продуктов и пропитки бумаго-полимерных упаковочных материалов.

Список работ по теме диссертации

1. Штильман М.И., Супрун О.В., Tzatzarakis E., Лоттер М.И., Лебедева Т.Л., Харенко А.В., Tsatsakis A.M. Комплексы поли-N-винилпирролидона и сорбиновой кислоты. // Пластические массы, 2004, № 2, С.23-27.
2. Снежко А.Г., Федотова А.В., Борисова З.С., Филинская Ю.А., Штильман М.И., Супрун О.В. Использование полимерных комплексов сорбиновой кислоты для получения антимикробных покрытий пролонгированного действия из полимерных латексов. // Лакокрасочные материалы и их применение, 2006, № 10, С.25-32.
3. Супрун О.В., Садовский С.Н., Шашкова И.М., Штильман М.И. Имобилизация фунгицида сорбиновой кислоты на полимерных носителях. // Успехи в химии и химической технологии, 2002, Т.16, №3(20), С.63.

4. Супрун О.В., Лоттер М.М., Штильман М.И. Исследование полимерных комплексов сорбиновой кислоты. // Успехи в химии и химической технологии, 2003, Т.17, №5, 118-125.
5. Супрун О.В., Ловягин Дм.А., Штильман М.И. Биологическая активность полимерных комплексов сорбиновой кислоты и поли-N-винилпирролидона. // Успехи в химии и химической технологии, 2004, Т.18, №2 (42), С.79-82.
6. Исследование физико-химических свойств комплексов сорбиновой кислоты и поли-N-винилпирролидона / Штильман М.И., Супрун О.В., Лоттер М.М., Tzatzarakis E., Tsatsakis A.M., Депонир.рукопись (ВИНИТИ), № 2069-B-2003 от 28.11.03.
7. Исследование полимерных комплексов сорбиновой кислоты методом равновесного диализа / Штильман М.И., Супрун О.В., Лоттер М.М., Tzatzarakis E., Tsatsakis A.M., Депонир.рукопись (ВИНИТИ) № 2070-B-2003 от 28.11.03.
8. Фунгицидная активность сорбиновой кислоты и полимерных производных / Штильман М.И., Супрун О.В., Лоттер М.М., Tzatzarakis E., Tsatsakis A.M. Депонир.рукопись (ВИНИТИ) № 2071-B-2003 от 28.11.03.
9. Фунгицидная активность сорбиновой кислоты, ряда органических кислот и их солей / Штильман М.И., Супрун О.В., Лоттер М.М., Tzatzarakis E., Tsatsakis A.M. Депонир.рукопись (ВИНИТИ) № 2072-B-2003 от 28.11.03.
10. Tsatsakis A.M., Manolis N. Tzatzarakis, Suprun O.V., Shtilman M.I. Polymeric derivatives of sorbic acid – water-soluble preparations for fungicide activity. // Biomed 2002 (IXth International Symposium on Biomedical Science and Technology [19-22 Sept. 2002, Kemer-Antalya, Turkey], 2002, P-48.
11. Супрун О.В., Лоттер М.М., Тзатзаракис Э., Тсатсакис А.М., Штильман М.И. Полимерные комплексы сорбиновой кислоты. // Тезисы докл. Международной конференции «Биологически активные полимеры: Синтез, свойства и применение» [Ташкент, 2003].- АН Респ.Узбекистан-2003, с.64.
12. Suprun O.V., Lotter M.M., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M. Polymeric complexes of sorbic acid. // Тезисы докл. European Material Research Society. Fall Meeting [Warsaw, 15-19 September, 2003].- 2003, P.168.

Заказ № 638. Объем 1 п.л. Тираж 100экз.
Отпечатано в ООО «Петроруш»
г.Москва,ул.Палиха 2а,тел.250-92-06
www.postator.ru