

Т. И. Давиденко, Г. И. Бондаренко, И. И. Пашкин

**СТАБИЛИЗАЦИЯ ПОЛИ-N-ВИНИЛКАПРОЛАКТАМА 2-БРОМ-2-НИТРОПРОПАДИОЛОМ-1,3**

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

В последние годы постоянно изучаются различные способы соединения биологически активных веществ с полимерами. Среди синтетических полимерных носителей поливиниллактамы: поливинилпирролидон, его сополимеры с акролеином, акриламидом и акриловой кислотой, поли-N-винилкапролактан (ПВК), — отличаются рядом полезных и, в некоторых отношениях, уникальных свойств. Они обладают высокой гидрофильностью, широким диапазоном растворимости, отсутствием токсичности, ярко выраженной склонностью к комплексообразованию, хорошими адгезионными свойствами. Однако в плане формирования биологически активных матриц эти полимеры (особенно поли-N-винилкапролактан) рассмотрены недостаточно [1–3]. Принимая во внимание, что на основе ПВК возможно получить гранулы полимера с включенным биологически активным соединением при добавлении водного раствора ПВК с инкапсулированным веществом в раствор стабилизатора, мы рассмотрели возможность стабилизации ПВК с помощью 2-бром-2-нитропропандиола-1,3 (бронопола). Целью нашей работы было получить комплексные препараты протеолитических ферментов, обладающих антимикробной активностью.

Отличительной чертой бронопола как консерванта является высокая антимикробная активность в отношении синегнойной палочки и других псевдомонад, плохо угнетаемых большинством антимикробных средств, в сочетании с довольно низкой токсичностью для теплокровных. Следует отметить также отсутствие отрицательного воздействия на естественную микрофлору кожи и более слабые цитотоксические свойства, чем, например, у хлоргексина [4]. Обращает на себя внимание широкое практическое использование бронопола для придания антисептических свойств таким продуктам, как зубные пасты и эликсиры, антацидные средства типа Альмагеля, инъекционные растворы, глазные капли, контактные линзы, косметические и гигиенические препараты детского ассортимента [5]. В то же время устойчивость бронопола в водных средах недостаточна. Он сохраняет

устойчивость только на холоду и в кислой среде. Увеличение pH и температуры способствует разложению, которое протекает, в основном, путем отщепления формальдегида.

Термоосаждение ПВК в растворах бронопола приводит к образованию осадка полимера, при этом в зависимости от концентрации используемого раствора бронопола образуются гранулы, сохраняющие (концентрация бронопола 4%), либо не сохраняющие (концентрация 0,5–3%) форму до полного высыхания.

В сухом препарате ПВК, образующем гранулы в 4% растворе бронопола, согласно данным анализа сохранилось 20% бронопола.

Изучение влияния температуры на стабилизацию ПВК бронополом показало, что максимальное включение бронопола наблюдалось при 40°C, т.е. в области температур термоосаждения ПВК (табл. 1).

Влияние pH на стабилизацию ПВК бронополом рассмотрели в Na-фосфатном буфере. Отмечено, что включение бронопола в ПВК выше при pH 5,0–6,0 (табл. 2).

Оценку биологической доступности бронопола, включенного в ПВК, в сравнении с такой же концентрацией бронопола в водном растворе проводили методом диализа через целлюлозную полупроницаемую мембрану (размер пор 200–400 мкм) относительно дистиллированной воды при температуре 37°C. Содержание бронопола в диализате контролировали через 0,5–3 ч. Динамика высвобождения бронопола

Таблица 2  
Влияние pH на включение бронопола в поли-N-винилкапролактан при постоянной температуре осаждения 37°C

pH, ед.	Содержание бронопола, %
5,0	36,0
6,0	32,1
7,0	21,4

Таблица 3  
Результаты диализа бронопола из раствора и из гранул поливинилкапролактама (ПВК)

Время диализа, ч	Выход бронопола в диализат, % от исходного	
	из раствора	из гранул ПВК
0,5	40,7	11,9
1,0	59,9	29,0
2,0	67,5	40,0
3,0	65,3	47,0

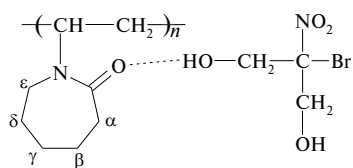
Таблица 1  
Влияние температуры на включение бронопола в поли-N-винилкапролактан (ПВК)

Температура стабилизации, °C	Содержание бронопола, %
20	17,4
40	21,4
50	16,3
60	11,7

представлена в табл. 3 (средние результаты трех параллельных исследований). Как следует из полученных данных, количество бронопола, перешедшее в диализат из раствора за одинаковое время, больше, чем из ПВК, что свидетельствует о пролонгированном выходе бронопола из ПВК.

Проведение диализа бронопола из гранул ПВК, стабилизированных при различных значениях pH, относительно дистиллированной воды позволило отметить более быстрый выход бронопола из препарата ПВК, стабилизированного при pH 6,0.

Методами ЯМР  $^{13}\text{C}$  и ИК-спектроскопии нами установлено, что включение бронопола в ПВК происходит за счет образования водородных связей между карбонильной группой капролактаманного звеньев и гидроксильными группами бронопола, а также в результате вытеснения воды из структуры полимера и происходящего, как и в случае использования фенолов в качестве стабилизаторов, при этом уплотнения [6].



В ИК-спектрах отмечено присутствие характеристических полос валентных колебаний связей C–Br при  $530\text{ см}^{-1}$ , C–NO<sub>2</sub> при  $1560\text{ см}^{-1}$ , C=O при  $1694\text{ см}^{-1}$ , а также широкой полосы с максимумом  $3227\text{ см}^{-1}$  (табл. 4), вызванной колебаниями OH-групп, связанных межмолекулярными водородными связями. Следует отметить, что эта полоса отсутствует в ИК-спектрах ПВК и бронопола, что подтверждает ее характер. Об этом же свидетельствуют и спектры, записанные для различных концентраций ПВК, стабилизированного бронополом. При концентрации  $3 \cdot 10^{-2}\text{ М}$  (по бронополю) наблюдается интенсивная широкая полоса при  $3227\text{ см}^{-1}$ , уменьшающаяся с последующим разбавлением растворителем и полностью исчезающая при концентрации  $3 \cdot 10^{-4}\text{ М}$ . В ИК-спектрах ПВК, стабилизированного бронополом, присутствует также узкая полоса “свободной” OH-группы при  $3587\text{ см}^{-1}$ . Однако следует отметить, что интенсивность этой полосы в 2 раза меньше таковой в спектре самого бронопола, возможно, это указывает на то,

что в образовании водородной связи с карбонильной группой капролактаманного кольца участвует только одна OH-группа бронопола.

В табл. 5 приведены значения химических сдвигов и времен спин-решеточной релаксации ядер  $^{13}\text{C}$  в спектрах ЯМР ПВК и ПВК с бронополом. Отнесение сигналов ядер  $^{13}\text{C}$  выполнено на основании литературных данных и расчетов по методу Линдемана-Адамса [6].

При включении бронопола в ПВК происходит экранирование ядер углерода всех групп ПВК, кроме СН. Наиболее экранированы атомы углерода карбонильной группы, а также C ( $\beta$ ) и C ( $\delta$ ), химический сдвиг которых одинаков. Как и при встраивании фенола [6], сигналы СН-групп полимерной цепи ПВК смещаются в слабое поле. Подобные изменения свидетельствуют об образовании водородных связей OH-групп бронопола с атомом кислорода карбонильной группы.

При включении бронопола в ПВК фрагментарная подвижность карбонильной группы и главной цепи полимера снижается, при этом значение  $t_1$  для CO- и СН-групп уменьшается в 1,70 и 1,07 раза, соответственно. Поскольку  $t_1$  определяется временем вращательной корреляции  $\tau_c$ , описывающим фрагментарную подвижность молекул, уменьшение значений  $t_1$  обусловлено затруднением внутреннего вращения относительно связей и подтверждает образование водородной связи с CO-группой капролактаманного кольца.

Включение протеолитических ферментов (протеазы С и щелочной протеазы) проводили с использованием 4 % водного раствора бронопола, при этом образовывались довольно устойчивые гранулы, содержащие до 20 % бронопола и протеолитический фермент. Как следует из данных табл. 6, сохранение протеолитической активности для протеазы С и щелочной протеазы составило 4,0 и 10,8 % соответственно.

Добавление к раствору ПВК глицерина (10 %) позволило увеличить протеолитическую активность включенных протеазы С и щелочной протеазы до 16,7 и 5,7 ПЕ/г препарата, что составило 12,1 и 17,3 % от исходной активности, соответственно.

Таблица 5  
Эффекты включения 2-бром-2-нитропропандиола-1,3 в матрицу поливинилкапролактама (ПВК) по данным спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$

Атом углерода	ПВК		Комплекс ПВК с 2-бром-2-нитропропандиолом-1,3			
	$\delta$ , м.д.	$t_1$ , с	$\delta$ , м.д.	$\Delta\delta$ , м.д.	$t_1^{c*}$ , с	$t_1^c:t_1$
CO	177,50	3,290	176,81	-0,69	1,930	0,59
CH	46,09	0,228	46,53	0,44	0,213	0,93
CH <sub>2</sub>	34,08	0,109	33,96	-0,12	—**	—**
C( $\epsilon$ )	42,47	0,129	42,12	-0,35	0,143	1,11
C( $\alpha$ )	37,08	0,126	36,98	-0,10	0,135	1,07
C( $\gamma$ )	22,92	0,153	22,73	-0,19	0,154	1,01
C( $\beta,\delta$ )	29,42	0,154	29,15	-0,27	0,150	0,97

\*  $t_1^c$  — время спин-решеточной релаксации ядер  $^{13}\text{C}$  в комплексе;  
\*\* — уширение сигнала не позволяет определить  $t_1$  при инверсии.

Таблица 4  
Характеристические полосы поглощения в ИК-спектрах ( $V_{\text{max}}$ ,  $\text{см}^{-1}$ ) поливинилкаролактама (ПВК), бронопола и их композиций

Отнесение	ПВК, стабилизированный бронополом		Бронопол
	ПВК	Бронопол	
—C–Br	530	—	530
—C–NO <sub>2</sub>	1560	—	1560
—C=O	1624	1624	—
—OH “связанная”	3227	—	—
—OH “свободная”	3587	—	3587

С учетом имеющихся данных о возможности применения мочевины для ускорения очистки ожоговых ран от некротических тканей [7] добавили в раствор ПВК при термоосаждении 10 % мочевины. При этом наблюдалось совместное включение бронопола, мочевины и протеолитического фермента в ПВК, несмотря на то, что в растворах самой мочевины (5 % раствор) термоосаждения ПВК не наблюдалось. В полученных гранулах ПВК содержание мочевины 0,09 г/г препарата (определено согласно [8]).

Как следует из данных табл. 6, включение мочевины и для протеазы С и для щелочной протеазы увеличивает протеолитическую активность, хотя и в разной степени, для протеазы С до 7,6 %, тогда как в случае щелочной протеазы до 28,1 %. Добавление глицерина совместно с мочевиной (табл. 6) не дает дополнительных преимуществ по сравнению с их раздельным применением.

Хранение включенных в ПВК протеолитических ферментов изучалось в течение 8 месяцев в 0,03 М Na-фосфатном буфере, рН 7,6. Отмечена большая устойчивость при хранении включенной в ПВК щелочной протеазы с добавками глицерина и мочевины (сохранялось 100 % исходной активности), в случае протеазы С стабилизирующее влияние оказывает глицерин (сохранение протеолитической активности 118,6 %), тогда как в препаратах с мочевиной активность снижалась до уровня 40 – 50 % от исходной. Включенная в ПВК щелочная протеаза оказалась более стабильной, при хранении с добавками и глицерина, и мочевины оставалось 100 % исходной активности.

Нами также изучено влияние рН и температуры на сохранение активности ферментных препаратов. Как следует из полученных данных, иммобилизованная в ПВК протеаза С сохраняет максимальную исходную активность в щелочной области (Na-фосфатный буфер, 0,03 М), как и нативный фермент. Иммобилизованный ферментный препарат совместно с мочевиной максимально сохраняет исходную активность при рН 7,6. Однако для всех иммобилизованных в ПВК препаратов следует отметить значительно большую стабильность при кислых значениях рН, что важно при использовании препарата для лечения ожогов и гнойных

ран. Аналогичные результаты получены и для щелочной протеазы, для которой также характерно стабилизирующее влияние матрицы при значениях рН в кислой области.

Таким образом, на основе поливинилкапролактама, стабилизированного бронополом, получены комплексные препараты протеолитических ферментов с мочевиной и антимикробной активностью, обладающие пролонгированным действием, стабильные при кислых значениях рН и при хранении.

### Экспериментальная часть

ИК-спектры записаны на спектрофотометре “Spercord IR-75” в растворах в абсолютном хлороформе.

Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  получали в режиме преобразования Фурье с селективным подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами на спектрометре “Bruker AM-250” при рабочей частоте 62,896 МГц в растворе ДМСО- $d_6$ . Ширина импульса составляла 16 мкс, время прослушивания отклика 1,3 с, задержка между импульсами 4 с (для полной релаксации ядер  $^{13}\text{C}$ ), число накоплений 900. Стабилизацию осуществляли на ядрах дейтерия ДМСО- $d_6$ . Химические сдвиги отсчитывали с погрешностью  $\pm 0,01$  м.д. от сигнала растворителя и пересчитывали к ТМС. Температуру в датчике спектрометра устанавливали и поддерживали с точностью  $\pm 0,5$  К.

**Изменение времени спин-решеточной релаксации ( $t_1$ ) ядер  $^{13}\text{C}$**  проводили методом инверсии восстановления, используя импульсную последовательность  $T - 180 - \tau - 90^\circ$ . Величины  $\tau$  варьировали от 0,2 с до  $T$  с, а  $T$  выбирали равным  $4 \times t_1$  для полной релаксации ядер. Значения  $t_1$  рассчитывали по уравнению,  $A_\infty/A_\tau = 2A_\infty \times \exp(-\tau/t_1)$ , где  $A_\infty$  — предельное значение  $A_\tau$  при самом длительном интервале между 180- и 90-градусными импульсами;  $A_\tau$  — амплитуда индуцированного сигнала после 90-градусного импульса. Расчет проводили на процессоре “Aspekt-3000” спектрометра. Относительная погрешность изменения  $t_1$  не превышала 5 %.

**Контроль содержания бронопола в ПВК.** Растворяют в воде 0,050 г стабилизированного бронополом ПВК в мерной колбе на 250 см<sup>3</sup>. Затем в две мерные колбы на 50 см<sup>3</sup> вносят по 20 см<sup>3</sup> этого раствора, в одну приливают 20 см<sup>3</sup> NaOH (0,5 М) и обе колбы доводят до метки дистиллированной водой. Колбу с раствором NaOH закрывают пробкой и термостатируют при температуре 60 °С в течение 10 мин, после чего охлаждают до комнатной температуры. Переносят по 1 см<sup>3</sup> в 2 пробирки из каждой колбы, добавляют по 4 см<sup>3</sup> реактива на формальдегид. В качестве контроля вместо 1 см<sup>3</sup> пробы используют 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Пробирки термостатируют 5 мин при 60 °С, охлаждают до комнатной температуры и фотометрируют в кюветах толщиной 1 см на КФК-2 МП при 400 нм. Количество выделившегося формальдегида определяют по калибровочному графику, который

Таблица 6  
Активность протеолитических ферментов, включенных в ПВК (стабилизатор-4 % водный раствор бронопола, температура осаждения 40 – 42 °С, время осаждения 20 мин) в присутствии добавок

Добавки	Протеаза С		Щелочная протеаза	
	Активность, ПЕ/г препарата	Сохранение исходной активности, %	Активность ПЕ/г препарата	Сохранение исходной активности, %
–	2,51 ± 0,01	4,0	2,48 ± 0,02	10,8
Глицерин	16,71 ± 0,05	12,1	5,71 ± 0,05	17,3
Мочевина	9,33 ± 0,58	7,6	17,61 ± 0,08	28,1
Глицерин + мочевина	10,73 ± 0,30	8,3	11,66 ± 0,12	25,7

строят по стандартному раствору формальдегида. Количество включенного формальдегида в процентах находят по формуле:

$$X = \frac{mM100}{m_0},$$

где  $m_0$  — точная навеска анализируемого образца в фотометрируемой пробе, г;  $M$  — молекулярная масса бронопола, г;  $m$  — количество выделившегося формальдегида в пробе, моль.

Для приготовления реактива на формальдегид 172 г ацетата аммония растворяют в 0,6 л воды, добавляют 2 г перегнанного ацетилацетона при хорошем перемешивании до полного растворения ацетилацетона. Затем при необходимости по каплям добавляют уксусную кислоту до pH 6,0 и доводят раствор водой до 1 л.

**Иммобилизация протеолитических ферментов в поли-N-винилкапролактаме, сшитый бронополом.** В стакан, помещенный в термостат (37 °С), вносят 20 см<sup>3</sup> 4 % водного раствора бронопола, термостатируют в течение 5 мин, затем через медицинский шприц добавляют по каплям 1 см<sup>3</sup> раствора фермента в 7 % растворе поливинил-N-капролактама. Образовавшиеся гранулы выдерживают при 37 °С в течение 20 мин, затем раствор сливают, гранулы быстро промывают 4–5 см<sup>3</sup> холодной дистиллированной воды, сушат при комнатной температуре 16–17 ч, затем в холодильнике до постоянной массы.

**Определение протеолитической активности** выполнено модифицированным методом Ансона [9]. За единицу протеолитической активности принимают та-

кое количество фермента, которое при 37 °С в течение 10 мин повышает оптическую плотность субстрата при 280 и 276 нм, соответственно на 1,0.

pH-Оптimum ферментных препаратов определяют, приливая к равным по активности пробам ферментных препаратов раствор субстрата и буферные растворы с различными значениями pH (4,0–9,0). Затем определяют активность ферментов по вышеуказанным методикам.

Температурный optimum ферментных препаратов определяют в одинаковых по активности пробах нативных или иммобилизованных ферментов, измеряя активность при температурах 20–70 °С в соответствующих буферных растворах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. Ф. Шерстюк, И. Ю. Галаев, А. П. Савицкий и др., *Биотехнол.*, **3**(2), 179–183 (1987).
2. Ю. Э. Кириш, И. Ю. Галаев, Т. М. Карапутадзе и др., *Биотехнол.*, **3**(2), 184–189 (1987).
3. И. Ф. Кузькина, И. И. Пашкин, Е. А. Марквичеева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **30**(1), 39–41 (1996).
4. Г. Я. Левин, *Хим.-фарм. журн.*, **30**(4), 54–64 (1996).
5. *Bronopol — Boots, a Broad Spectrum Antibacterial Agent*, Technical Bulletin, Issue 5, The Boots Co, Nottingham (1986).
6. Т. И. Давиденко, Ю. Е. Шапиро, И. А. Кравченко и др., *Изв. АН., Сер. хим.*, № 9, 2251–2255 (1996).
7. Т. Д. Заец, С. К. Завьялов, *Изв. АМН СССР*, **8**, 12–16 (1961).
8. И. К. Ядияров, Х. Р. Рустамов, *Узбекский хим. журн.*, **4**, 18–19 (1971).
9. И. С. Петрова, М. М. Винцогонайте, *Прикл. биохим. и микробиол.*, **2**(3), 322–327 (1966).

Поступила 19.02.02