

## ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВЫХ И СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА НА ЕГО БИОЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ

© В. А. Добыш,<sup>1\*</sup> П. В. Курман,<sup>2</sup> П. С. Шабуня,<sup>2</sup> Н. В. Коктыш,<sup>1</sup> В. А. Тарасевич,<sup>1</sup>  
В. Е. Агабеков,<sup>1</sup> В. Н. Макадун,<sup>3</sup> Н. А. Белясова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси  
Беларусь, 220141, Минск, ул. Ф. Скорины, 36; e-mail: dobusch.w@mail.ru

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

<sup>3</sup>Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

<sup>4</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск

*Методами хромато-масс-спектрометрии и капиллярной вискозиметрии установлены молекулярно-массовые характеристики образцов гидрохлоридов полигексаметиленгуанидина. Исследовано влияние структурных характеристик отдельных олигомеров полигексаметиленгуанидина на их антибактериальную активность.*

В биологически активных полимерах, к которым относятся и полигексаметиленгуанидины [1–6] всегда присутствуют отдельные фракции, определяющие эффективность препарата в целом. При биоцидном действии эти вещества взаимодействуют с клеточными мембранами, вызывая распад и агглютинацию клеток. Эффективность такого взаимодействия всецело зависит от химического и конформационного строения полимера.

Целью работы явилось исследование фракционного состава полигексаметиленгуанидингидрохлорида (I), продукта поликонденсации гидрохлорида гуанидина и гексаметилендиамина, установление его структурных характеристик и их связи с антибактериальной активностью.

В работе [7] методами ИК и ЯМР спектроскопии установлено строение отдельных фрагментов полимера (I). Однако полученные данные никак не связаны с его биоцидной активностью. Между тем, знание молекулярно-массового распределения биоактивных полимеров их структурных характеристик в сочетании с данными по биологической активности дает дополнительную информацию о механизмах взаимодействия полимеров с клеточными мембранами. Для получения таких данных в настоящей работе использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-детектором [8, 9].

Предварительно было установлено, что ИК спектры синтезированных образцов гидрохлорида (I) соответствуют известным спектральным данным, приведенным в работах [10, 11].

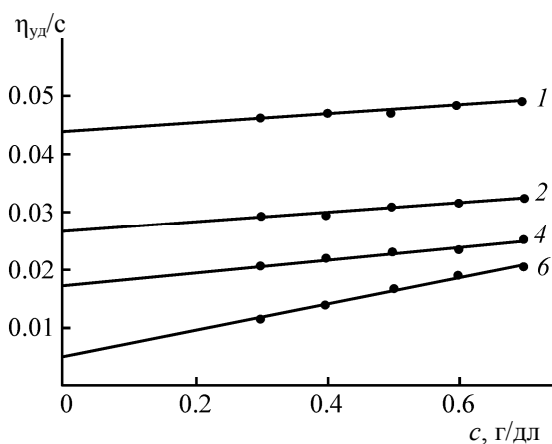
Зависимость приведенной вязкости разбавленных растворов полимера (I) от его концентраций носит линейный характер (рис. 1) и подчиняется уравнению Хаггинса [12, 13].

$$\eta_{уд}/c = [\eta] + k'[\eta]^2 c$$

Здесь  $\eta_{уд}$  и  $[\eta]$  – соответственно удельная и характеристическая вязкости разбавленного раствора,  $c$  – концентрация раствора (г/дл),  $k'$  – вискозиметрическая константа Хаггинса, характеризующая взаимодействие макромолекул с растворителем [13, 14].

С увеличением молярного соотношения взятых в реакцию гидрохлорида гуанидина и гексаметилендиамина (табл. 1) наблюдается уменьшение характеристической вязкости ( $[\eta]$ ) продукта и рост вискозиметрической константы Хаггинса ( $k'$ ), указывающие на взаимодействие олигомеров (I) и растворителя при переходе от одного образца к другому. Такое взаимодействие может быть обусловлено сольватационными эффектами, отличающимися для различных конформационных структур полимера.

Анализ хроматограмм (рис. 2, а) указывает на отклонения от нормального гауссова распределения



**Рис. 1.** Концентрационные зависимости приведенной вязкости ( $\eta_{уд}/с$ ) разбавленных растворов полимера (I): 1 – 1:1 моль/моль (гидрохлорид гуанидина:гексаметилендиамин); 2 – 1.1:1; 4 – 1.3:1; 6 – 1.5:1.

олигомеров по времени их удержания, которое характерно для соответствующих материалов одной конформации. Это свидетельствует о том, что в

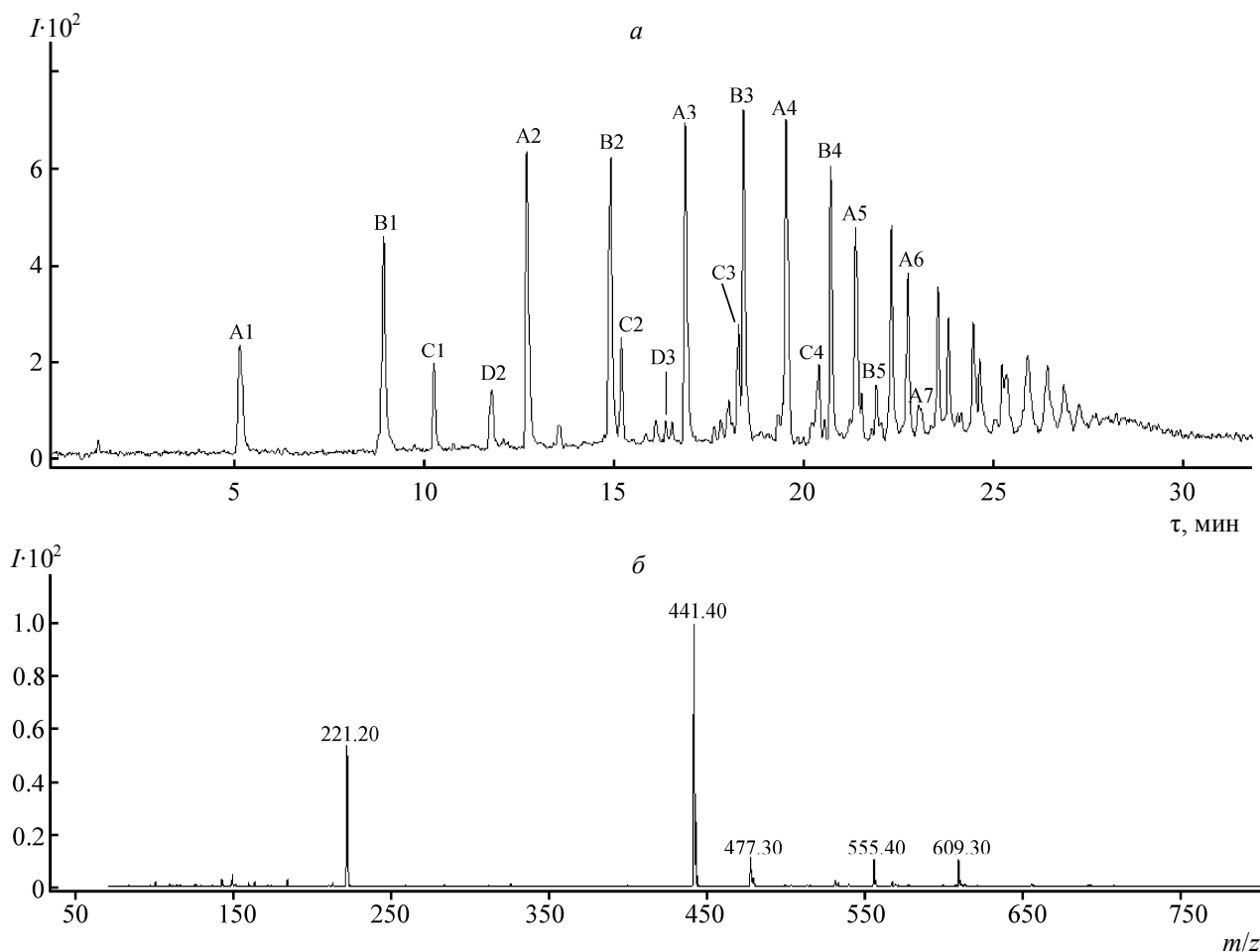
**Таблица 1**

Вискозиметрические характеристики образцов полимера (I)

Образец	Мольное соотношение гидрохлорид гуанидина–гексаметилендиамин	$[\eta], дл/г$	$k'$
1	1:1	0.044	0.05
2	1.1:1	0.026	0.15
4	1.3:1	0.017	0.20
6	1.5:1	0.005	0.46

продуктах синтеза, кроме линейных олиго-меров, присутствуют и разветвленные, замкнутые (циклические) структуры.

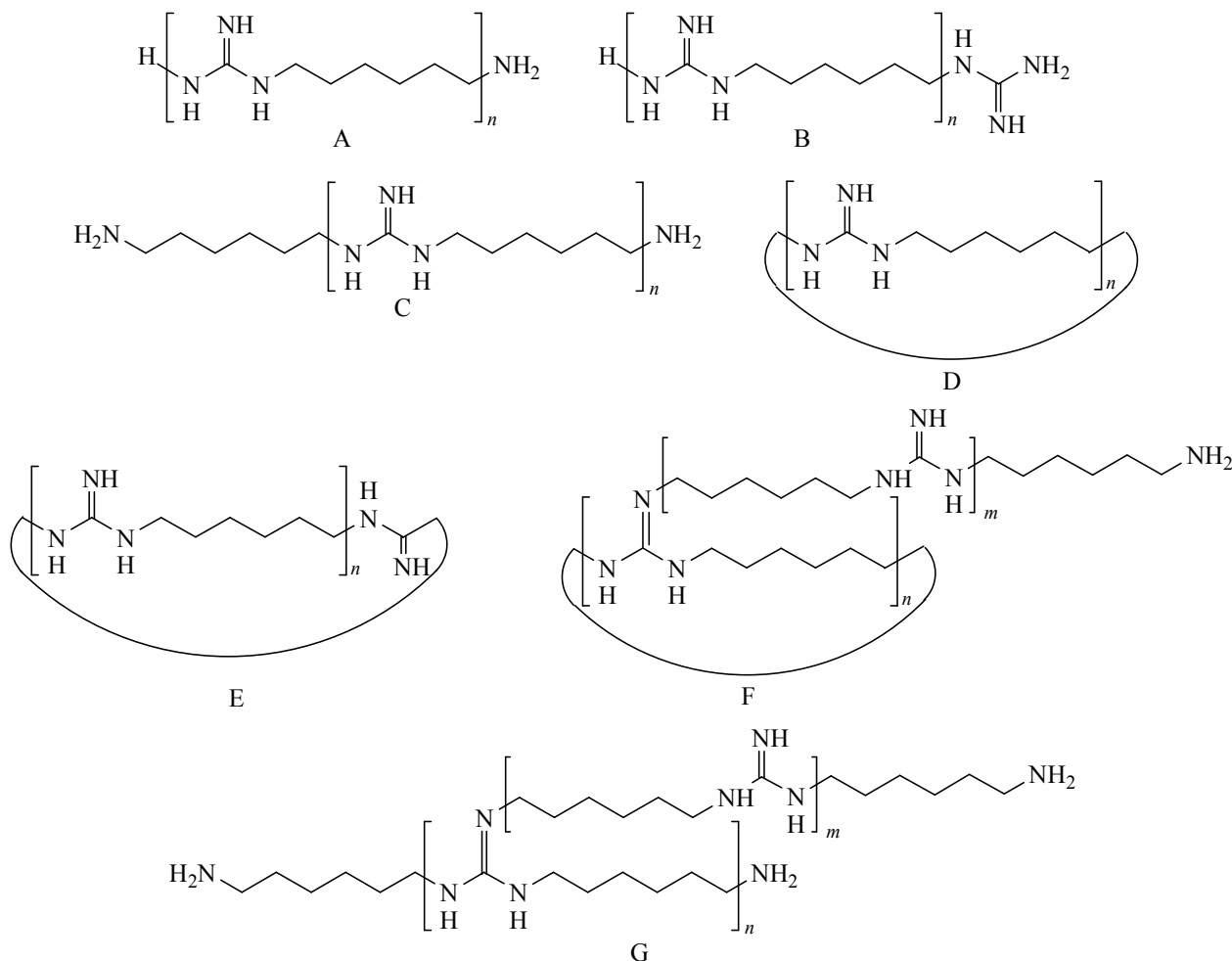
По данным хромато-масс-спектрометрии всех исследованных образцов водных растворов полиме-



**Рис. 2.** Хроматограмма водного раствора полимера (I) (гуанидина гидрохлорид:гексаметилендиамин = 1:1 моль/моль) (а), масс-спектр олигомера типа А3 (б).

ра (I) по методике [9], можно установить семь типов структур, отличающихся для линейных олигомеров строением концевых групп и структурой

самого скелета (разветвленные и циклические олигомеры).



Структуры А–С линейны, их концевые группы представлены первичной аминогруппой и одной гуанидиновой группой (А), двумя гуанидиновыми группами (В) и двумя аминогруппами (С). Остальные четыре типа являются разветвленными (G) или циклическими (D–F). Например, структуре АЗ, (рис. 2, б) с  $m/z$  441 Да соответствует протонированный олигомер  $\text{H}[\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_6]_3\text{NH}_2$ , что подтверждается регистрацией двухзарядных ионов  $[M + 2\text{H}]^{2+}$  с  $m/z$  221 Да, а также аддуктов  $[M + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  (477 Да),  $[M + \text{TFA} + \text{H}]^+$  (555 Да) и  $[M + \text{TFA} + 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  (609 Да).

Увеличение температуры и времени реакции, отмеченное в работах [9, 15], способствует появлению разветвленных структур при синтезе полимера (I). В этих работах постулировалась возможность увеличения числа внутримолекулярных реакции между двумя концевыми аминогруппами с ростом длины олигомерной цепи.

В наших условиях образцы полимера (I) получены при более высоких температурах реакции ( $180^\circ\text{C}$ ). При этом ожидалось увеличение содержания разветвленных и циклических структур. Однако, их количество не увеличилось, а уменьшилось (табл. 2). Массовая доля линейных продуктов составила около 90 мас%, содержание циклических структур D – не более 8 мас%, а суммарное содержание продуктов E–G не превышало 2.76 мас%. Такое соотношение олигомеров, вероятно, обусловлено более высокими температурами реакции, приводящими к перестройке структур E–G и увеличению доли линейных продуктов. При увеличении мольного соотношения гидрохлорид гуанидина–гексаметилендиамин растет количество олигомеров В и Е, при одновременном уменьшении олигомеров А, С и D. Массовая доля продуктов F и G практически не изменяется и составляет не более 1 мас%.

Таблица 2

Олигомерный состав образцов полимера (I)

Образец	Мольное соотношение гидрохлорид гуанидина– гексаметилендиамин	Массовая доля олигомеров, мас%						
		A	B	C	D	E	F	G
1	1:1	42.33	38.16	10.36	7.42	1.16	0.22	1.35
2	1.1:1	37.44	52.06	6.02	1.74	1.29	0.13	1.32
3	1.2:1	30.74	60.39	3.48	2.95	1.68	0.16	0.73
4	1.3:1	21.28	72.67	1.07	2.22	2.17	0.2	0.39
5	1.4:1	20.42	74.33	0.92	1.69	2.31	0.16	0.18
6	1.5:1	21.01	73.67	0.85	1.58	2.31	0.33	0.05

В составе исследуемого полимера присутствуют относительно низкомолекулярные «дендритные» структуры (G), узлом ветвления которых является гуанидиновый фрагмент, однако их содержание мало.

**Антибактериальная активность образцов полимера (I).** В методе диффузии в агар наиболее выраженное ингибирующее действие на бактерии *P. fluorescens* B22 оказывают продукты, полученные при мольном соотношении исходных реагентов, равном 1–(1.2:1) (образцы 1, 2). Образцы 5 и 6 не проявляют способность задерживать рост клеток *P. fluorescens* B22 (табл. 3).

Таблица 3

Антибактериальная активность образцов полимера (I)

Образец	Мольное соотношение гидрохлорид гуанидина– гексаметилендиамин	Ширина зон задержки роста бактерий, мм	Скорость потребления молекулярного кислорода мг/(л·мин)
1	1:1	15.2	0.05
2	1.1:1	15.3	0.07
3	1.2:1	15.0	0.11
4	1.3:1	12.1	0.12
5	1.4:1	0	0.15
6	1.5:1	0	0.15
Контроль		0	0.29

Методом регистрации дыхательной активности бактерий установлено, что все исследованные образцы ограничивают метаболическую активность бактерий *P. fluorescens* B22 и их антибактериальная активность снижается в ряду 1, 2 → 3, 4 → 5, 6.

Установлено, что продукты поликонденсации гидрохлорида гуанидина и гексаметилендиамина представляют собой смесь линейных, циклических и разветвленных молекулярных структур, средняя молекулярная масса которых зависит от соотношения взятых в реакцию исходных соединений.

Наиболее выраженное ингибирующее действие на тест-бактерии *P. fluorescens* B22 проявляют образцы полимера (I), содержащие относительно более высокие концентрации циклических олигомеров. Такая активность, возможно, связана не только с химической природой действующих веществ, но и зависит от величин их гидрофильно-липофильного баланса.

### Экспериментальная часть

ИК спектры регистрировали на спектрофотометре TENSOR 27. Образцы соединений таблетировали с KBr.

Анализ структуры и состава синтезированного полимера проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 RRLC с масс-детектором Agilent 6410 Triple Quad («тройной квадруполь») и диодно-матричным детектором (195.4 нм) в режиме электроспрей-ионизации (ESI) с регистрацией полного ионного тока в интервале  $m/z$  80–1950 Да. Колонка – XDB-C18 (4.6×50 мм, 1.8 мкм). Использовали

две подвижные фазы: А – 0.1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, Б – 0.1%-ный раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле.

Характеристическую вязкость ( $[\eta]$ ) разбавленных растворов полимера (I) в 0.5 М. растворе хлорида натрия определяли на вискозиметре Уббелоде с диаметром капилляра 0.34 мм при 25°C. Исходный раствор полимера с концентрацией 1 г/дл последовательно разбавляли до концентраций 0.7, 0.6, 0.5, 0.4 и 0.3 г/дл и по времени истечения их рассчитывали величины приведенной вязкости ( $\eta_{уд}/c$ ), а экстраполяцией этих значений на нулевую концентрацию определяли характеристическую вязкость.

В реакцию поликонденсации гидрохлорид гуанидина и гексаметилендиамин вводили в различных мольных соотношениях.

**Синтез полимера (I).** К 47.75 г (0.5 моль) гидрохлорида гуанидина небольшими порциями при 160°C добавляли 58 г (0.5 моль) расплава гексаметилендиамина. Реакционную смесь интенсивно перемешивали 5 ч. Затем поднимали температуру до 180°C и дополнительно перемешивали реакционную массу 4 ч. Получали выходом 95% полимер светло-коричневого цвета с температурой размягчения 102°C.

**Антибактериальная активность.** Тест-бактериями служили широко распространенные в окружающей среде *Pseudomonas fluorescens* B22. Антибактериальные свойства образцов полимера (I) определяли с помощью регистрации дыхательной активности клеток [16] и диффузионным методом, в котором показателем антибактериальных свойств образцов служила ширина зон задержки роста кле-

ток, формируемых вокруг лунок (диаметр 10 мм), заполненных 0.1 мл 1%-ного раствора испытуемого образца.

### Список литературы

- [1] Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. СПб: Гиппократ, 1993. 264 с.
- [2] Матюшина Г.П. // Фармация. 2004. № 6. С. 32.
- [3] Kim B.R., Anderson J.E., Mueller S.A. // Water Res. 2002. Vol. 36. P. 4433.
- [4] Kramer A., Behrens-Baumann W. // Ophthalmologica. 1997. Vol. 211. P. 68.
- [5] Larkin D., Kilvington S., Dart J. // Ophthalmology. 1992. Vol. 99. P. 185.
- [6] Пат. 2329286 (2008). РФ // Б. И. 2008. № 20.
- [7] Кедик С.А., Бочарова О.А. // Хим.-фарм. ж. 2010. Т. 44. № 10. С. 40.
- [8] Buchberger W., Hattinger I., Himmelsbach M. // J. Chromatogr. (A). 2009. Vol. 1216. P. 113.
- [9] Wie D., Ma Q. // Mat. Sci. Eng. (C). 2009. Vol. 29. P. 1776.
- [10] Zhang Y., Jiang J., Chen Y. // Polymer. 1999. Vol. 40. P. 6189.
- [11] Zhang L., Yao S., Guan Y. // Proc. Biochem. 2005. Vol. 40. P. 189.
- [12] Фролова Ю.Г., Гродский А.С. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии. М.: Химия, 1986. 216 с.
- [13] Рабек Я. Экспериментальные методы в химии полимеров. М.: Химия, 1983. Ч. 1. 384 с.
- [14] Тагер А.А. Физико-химия полимеров. М.: Химия, 1968. 539 с.
- [15] Albert M., Feiertag P. // Biomacromolecules. 2003. Vol. 4. P. 1811.
- [16] Шевеленко С.В., Кучко А.А., Белясова Н.А. // Труды БГТУ. 2010. Сер. IV. Вып. 18. С. 290.