

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

© В. А. Добыш,^{1*} П. В. Курман,² П. С. Шабуня,² Н. В. Коктыш,¹ В. А. Тарасевич,¹
В. Е. Агабеков,¹ В. Н. Макадун,³ Н. А. Беясова⁴

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

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

³Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

⁴Белорусский 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 агрегацию 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 мольного 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

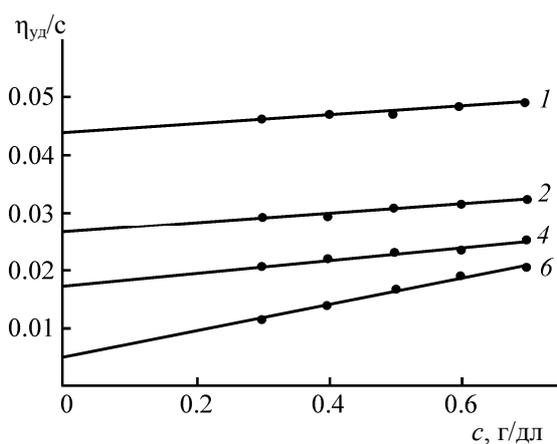


Рис. 1. Концентрационные зависимости приведенной вязкости ($\eta_{уд}/с$) разбавленных растворов полимера (I): 1 – 1:1 моль/моль (гидрохлорид гуанидина:гексаметилендиамин); 2 – 1.1:1; 4 – 1.3:1; 6 – 1.5:1.

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-

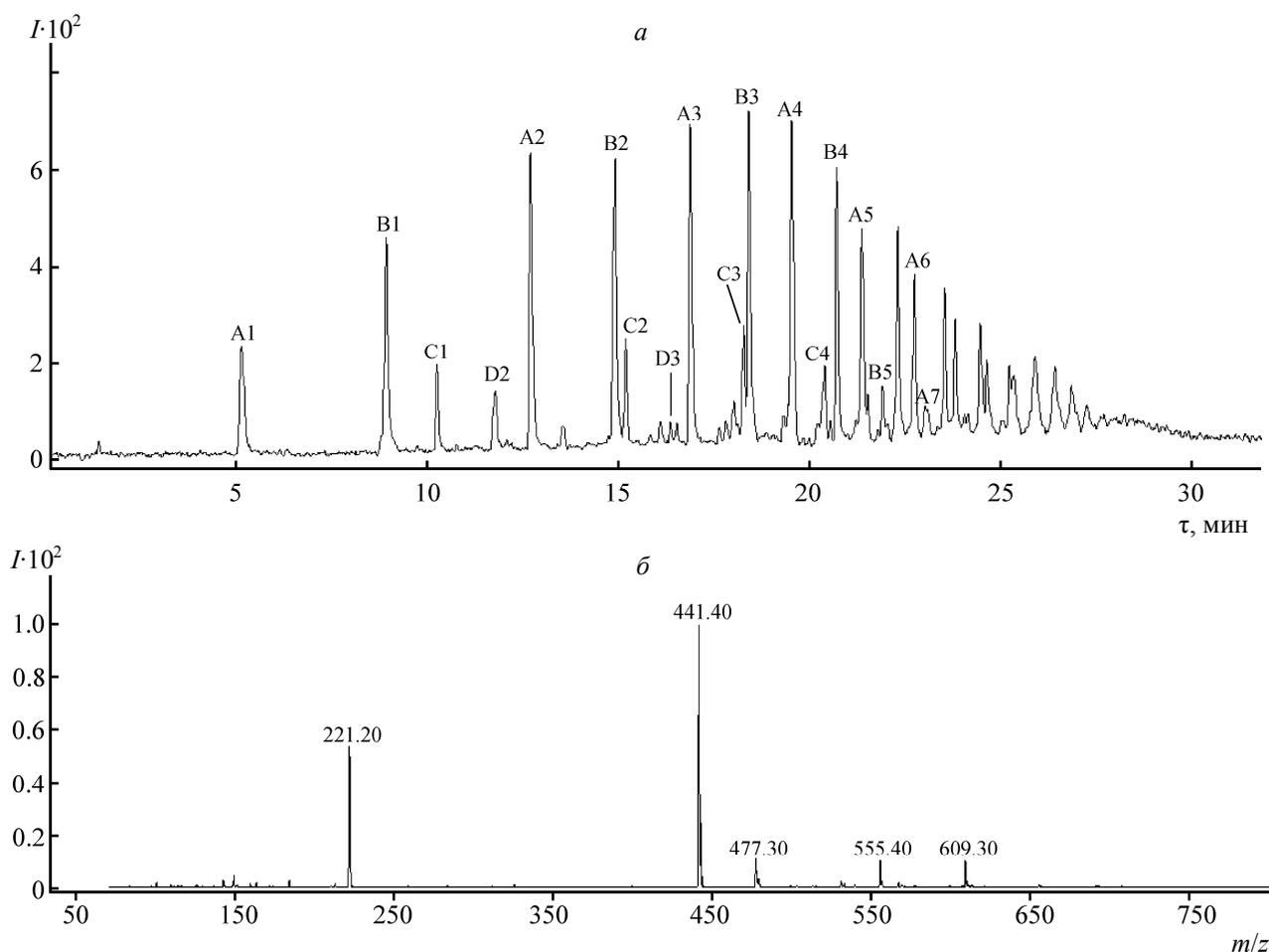
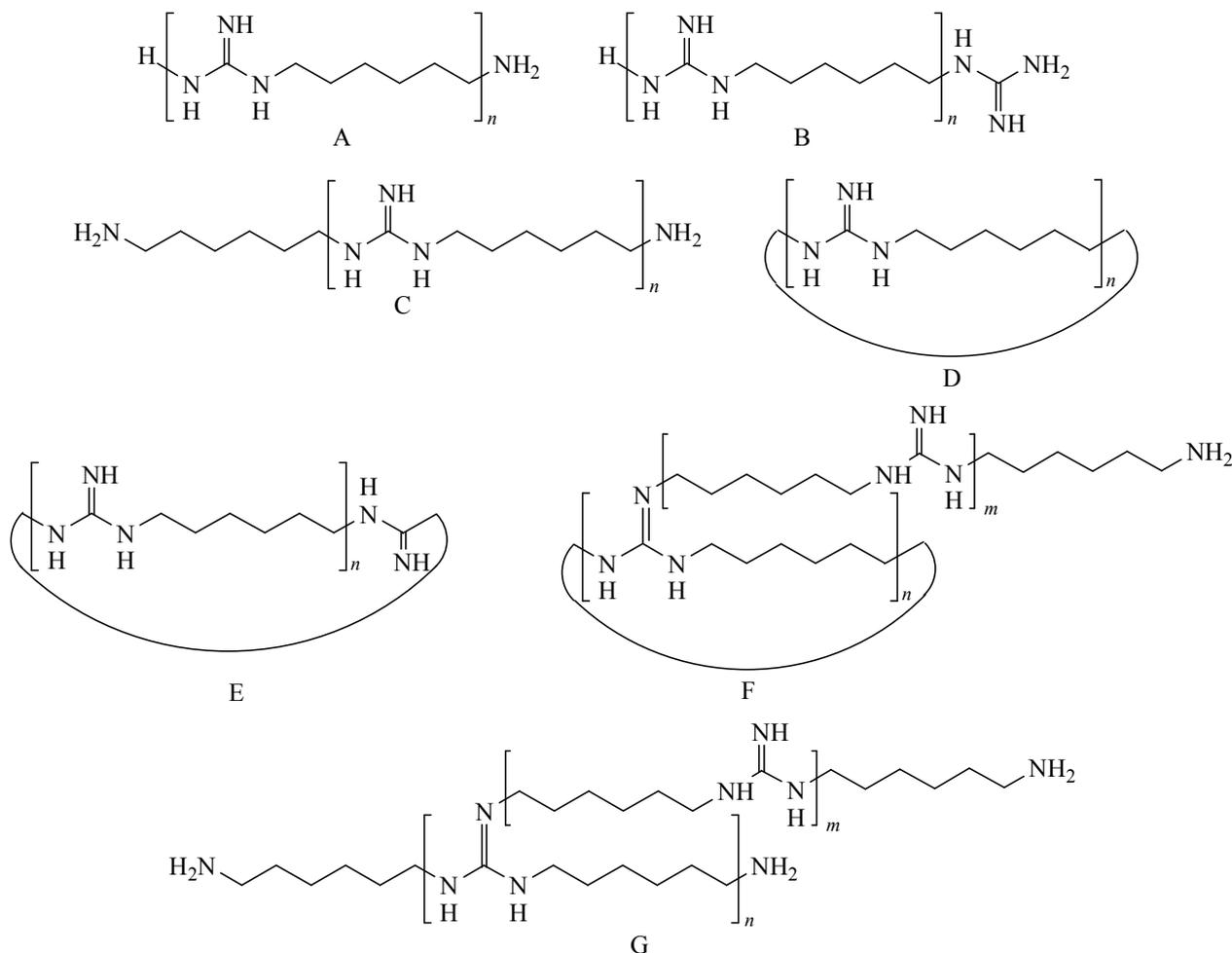


Рис. 2. Хроматограмма водного раствора полимера (I) (гуанидина гидрохлорид:гексаметилендиамин = 1:1 моль/моль) (а), масс-спектр олигомера типа А3 (б).

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 А₃, (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°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 B и E, при одновременном уменьшении олигомеров A, C 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* В22. 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.