

УДК 547.458.83.

DOI: 10.15372/KhUR20170401

Синтез и исследование антимикробного действия гуанидинсодержащих производных пектина и карбоксиметилцеллюлозы

О. Р. АХМЕДОВ

*Институт биоорганической химии АН Республики Узбекистан,
Ташкент, Узбекистан**E-mail: ibchem@uzsci.net*

(Поступила 02.09.16; после доработки 28.02.17)

Аннотация

Полимерные производные гуанидина занимают особое место среди антимикробных соединений. Они хорошо растворяются в воде, обладают широким спектром антимикробного действия и пролонгированным эффектом, не токсичны, а также отвечают требованиям, выдвигаемым современной медициной. Благодаря высокой реакционной способности гуанидина вступать в реакцию с различными функциональными группами, удается провести ряд новых химических модификаций, позволяющих получить новые биологически активные соединения низко- и высокомолекулярной природы.

В настоящей работе получены водорастворимые гуанидинсодержащие производные пектина и карбоксиметилцеллюлозы, соединенные между собой посредством аминной связи. Процесс получения гуанидинсодержащих производных пектина и карбоксиметилцеллюлозы состоит из следующих этапов: периодатное окисление полисахаридов, реакция конденсации гуанидина с окисленным пектином и карбоксиметилцеллюлозой, восстановление связи $-C=N$.

Структуры и составы полученных соединений изучены методами ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа (по содержанию азота).

Установлено, что наибольшее количество гуанидиновых групп в образующихся продуктах достигается при взаимодействии диальдегид-производных пектина и карбоксиметилцеллюлозы с гуанидином в молярном соотношении 1.0 : 2.3.

Изучена антимикробная активность полученного гуанидин пектина и карбоксиметилцеллюлозы в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* и *Streptococcus faecalis*. Установлено, что с повышением концентрации полученных соединений бактериостатический эффект усиливается. Приведены результаты исследования острой токсичности гуанидин пектина и карбоксиметилцеллюлозы, по результатам которых их можно отнести к IV классу опасности – малотоксичные вещества.

Ключевые слова: пектин, карбоксиметилцеллюлоза, гуанидин, периодатное окисление, острая токсичность, антимикробное действие

ВВЕДЕНИЕ

Направление исследовательских работ по созданию новых антимикробных соединений определяется требованиями современной медицины [1]. Полученные новые антибактериальные препараты, в первую очередь, должны обладать широким спектром антимикробного действия, быть нетоксичными, не накап-

ливаться в организме, проявлять пролонгированный эффект и избирательно действовать на бактериальную клетку.

Среди антимикробных соединений этим требованиям, в частности, отвечают полигуанидины – продукты реакции поликонденсации солей гуанидина с гексаметилендиамином. Полигуанидины хорошо растворяются в воде, растворы не имеют запаха, обладают широ-

ким спектром антимикробного действия, проявляют пролонгацию, не накапливаются в организме и относятся к IV классу (малотоксичные вещества) [2]. Антимикробное действие полигуанидинов обусловлено присутствием в макромолекуле повторяющегося гуанидинового фрагмента, придающего макромолекуле положительный заряд. В свою очередь, положительно заряженная макромолекула способна адсорбироваться на поверхности клеточной мембраны бактерий, проникать внутрь клетки и препятствовать репликации нуклеиновых кислот [3]. Благодаря высокой реакционной способности аминогрупп в молекуле гуанидина становится возможной его широкая модификация и получение новых антимикробных полимеров катионной природы.

Перспективными выглядят работы [4, 5], в которых полигуанидины получают путем введения гуанидиновых групп в структуру биополимера, что придает соединениям антимикробные свойства. Синтез гуанидинсодержащих производных полисахаридов осуществляется в два этапа: окисление полисахарида и реакция конденсации окисленных биополимеров с гуанидином. Соединение гуанидина с полисахаридами осуществляется посредством азометиновой связи $C=N$, которая позволяет не только сохранить антимикробную активность гуанидина, но и получить биологически активные соединения пролонгированного действия [6].

Исходя из вышеизложенного, представляет интерес получение и исследование антимикробной активности водорастворимых гуанидинсодержащих производных пектина и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), в которых гуанидиновый фрагмент связан с макромолекулой посредством аминной связи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходных полисахаридов использованы следующие вещества: цитрусовый пектин очищенный, ММ = 162 000, содержание групп $-OCH_3$ 7.6 %; Na-КМЦ очищенная, СП = 400, $\gamma = 85 \pm 5$; гуанидин гидрокарбонат $((H_2N)_2C=N \cdot 1/2 H_2CO_3)$, квалификации "х. ч."

Периодатное окисление пектина и Na-КМЦ

В стеклянном стакане 1 г Na-КМЦ или пектина залили 100 мл дистиллированной воды и оставили на 1 ч, затем добавили 100 мл ацетатного буферного раствора (рН 4.3) и 0.2 моль/л раствора $NaIO_4$ при молярном соотношении Na-КМЦ, пектин/ $NaIO_4 = 1.0 : 1.5$. Процесс окисления продолжался 2.5–3 ч при температуре 25 °С. По окончании реакции периодатного окисления модифицированные полисахариды осаждали ацетоном, образовавшиеся осадки промывали 70 % этиловым спиртом

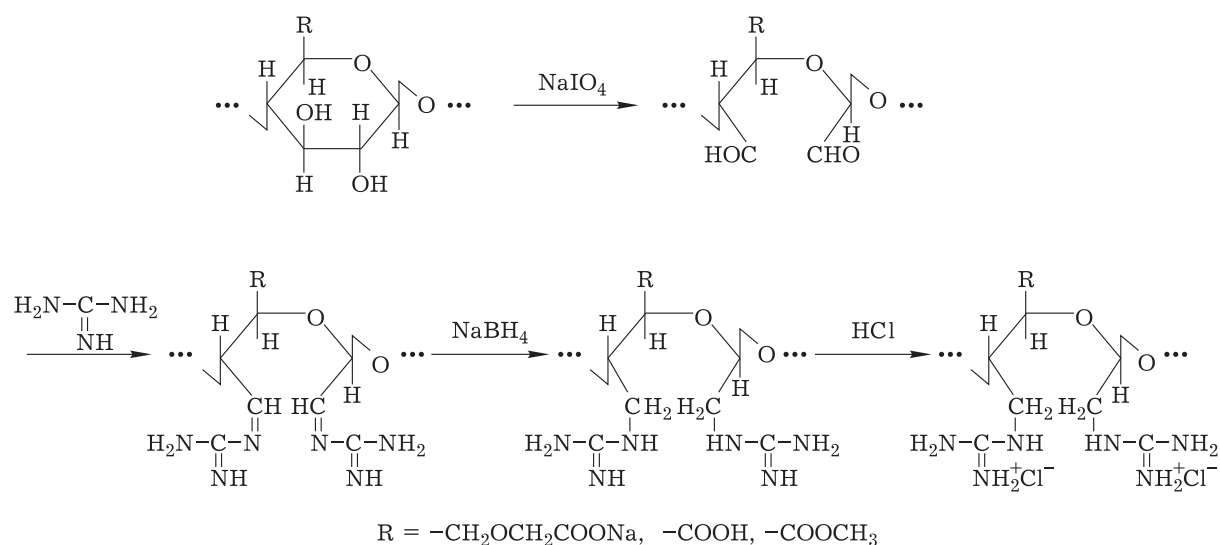


Схема 1. Синтез гуанидин пектина и КМЦ в виде гидрохлорида.

до отрицательной реакции на ионы IO_4^- и IO_3^- (контроль по реакции с раствором азотнокислого серебра) и сушили в темноте под вакуумом над P_2O_5 . Содержание альдегидных групп определяли йодометрическим методом.

Получение гидрохлоридов гуанидин пектина и карбоксиметилцеллюлозы

В стеклянный стакан, снабженный мешалкой, наливали 50 мл растворов с содержанием гуанидина гидрокарбоната 0.015–0.025/л моль, затем добавляли 0.01 моль/л диальдегидов пектина (ДАП) или карбоксиметилцеллюлозы (ДАКМЦ). Реакция продолжалась 30 мин при температуре 25 °С, образовавшуюся азометиную связь ($-\text{C}=\text{N}-$) восстанавливали с помощью боргидрида натрия. Для этого 0.02 моль NaBH_4 растворяли в 5 мл раствора 0.1 М NaOH и порциями добавляли в реакционные смеси. Реакция восстановления связи $-\text{C}=\text{N}-$ продолжалась 1.5–2.5 ч при комнатной температуре (схема 1). Конец реакции восстановления определяли по изменению интенсивности окраски реакционной смеси (с ярко-желтого цвета до бесцветной). Затем в реакционную смесь по каплям добавляли 5 % раствор HCl и доводили реакцию среды до рН 6.0–6.2. Продукты реакции осаждали и промывали ацетоном. Образовавшиеся осадки растворяли в воде, очищали от примесей методом

диализа в течение 20 ч и высушивали лиофилизацией.

ИК-спектры полученных соединений записаны на Фурье ИК-спектрометре Vector-22 в области длин волн 400–4000 cm^{-1} в таблетках KBr (3 мг образца/300 мг KBr). Физическую структуру исследовали на порошковом дифрактометре XRD-6100 (Shimadzu, Япония).

Количество азота определяли по методу Кьельдаля [7]. Степень замещения и количество гуанидина в полученных продуктах вычисляли по методикам, приведенным в [8, 9]. Антимикробную активность гуанидин пектина и КМЦ изучали в условиях *in vitro* диско-диффузионным методом [10]; острая токсичность определена по методу Литчфилда и Уилкоксона [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ИК-спектре гуанидинсодержащих производных пектина и КМЦ присутствовали характерные полосы поглощения в областях: 3180–3423 cm^{-1} ($-\text{OH}$); 2921–2923 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$); 1605–1615 cm^{-1} ($-\text{NH}-$); 1660–1680 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{N}-$).

Состав продуктов взаимодействия ДАП и ДАКМЦ с гуанидином приведен в табл. 1, 2. Видно, при молярном соотношении ДАП, ДАКМЦ/ $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$ = 1.0 : (1.5–2.2) не про-

ТАБЛИЦА 1

Состав продуктов взаимодействия ДАП с $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$ (время 30 мин, $T = 25$ °С)

Степень окисления пектина, моль%	Соотношение ДАП/ $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$	Содержание азота, %	Степень замещения (СЗ) по альдегидным группам, моль %	Количество гуанидина, %
30.0	1 : 1.5	6.2	42.0	26.0
33.0	1 : 2.0	8.5	58.0	35.8
33.0	1 : 2.2	8.8	63.0	37.0
35.0	1 : 2.3	9.7	70.0	40.8
35.0	1 : 2.5	9.9	70.0	41.0

ТАБЛИЦА 2

Состав продуктов взаимодействия ДАКМЦ с $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$ (время 30 мин, $T = 25$ °С)

Степень окисления Na-КМЦ, моль%	Соотношение ДАКМЦ/ $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$	Содержание азота, %	Степень замещения (СЗ) по альдегидным группам, моль %	Количество гуанидина, %
29.0	1 : 2.0	5.8	52.0	24.5
30.0	1 : 2.2	6.4	58.0	27.0
31.0	1 : 2.3	6.9	62.0	30.0
31.0	1 : 2.5	7.0	62.5	30.3

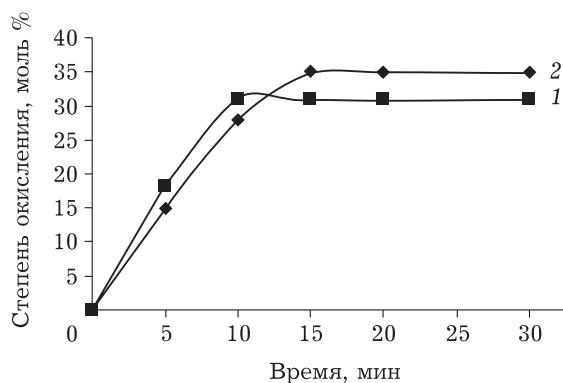


Рис. 1. Зависимость скорости взаимодействия гуанидина с ДАКМЦ (1) и ДАП (2) при молярном соотношении ДАКМЦ, ДАП/ $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N}$ = 1.0 : 2.3 от продолжительности реакции. Степень окисления, мол. %: 31.0 (1), 35.0 (2).

исходит полного взаимодействия альдегидных групп пектина и КМЦ с гуанидином. Увеличение молярного соотношения гуанидина до 2.3 обеспечивает полное взаимодействие альдегидных групп полисахаридов с гуанидином. Исходя из количественного содержания азота, на каждое элементарное звено окисленного пектина и КМЦ приходится два гуанидиновых фрагмента.

Из данных рис. 1 следует, что взаимодействие гуанидина с ДАП и ДАКМЦ происходит интенсивно в течение первых 5 мин. Полное взаимодействие гуанидина с ДАП наблюдается при продолжительности реакции 15 мин, а с ДАКМЦ – 10 мин. Дальнейшее увеличение времени реакции не приводит к повышению содержания гуанидиновых групп в конечных продуктах.

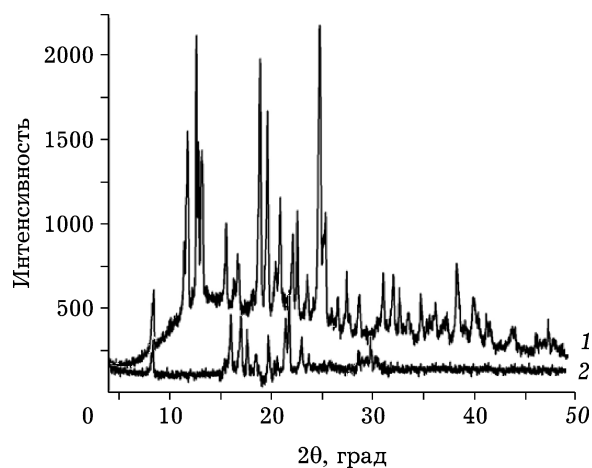


Рис. 2. Рентгенограммы пектина (1) и гуанидин пектина (2).

Проведенные исследования по изучению физической структуры гуанидинсодержащих производных пектина и КМЦ (аморфное или кристаллическое состояние) показали, что данные соединения являются аморфными веществами (рис. 2 и 3). Аморфизация пектина и КМЦ обусловлена уменьшением количества ОН-групп, разрушением упорядоченных упаковок полисахаридов в процессе периодатного окисления и введением гуанидиновых групп в макромолекулы.

С целью изучения биологической активности полученных гуанидинсодержащих производных пектина и КМЦ проведены исследования в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, при концентрации препаратов 50 мкг/мл (табл. 3). Видно, что в данной концентрации гуанидин пектина проявляет слабую активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* и *Streptococcus faecalis*. Гуанидин КМЦ демонстрирует умеренно выраженную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Escherichia coli*.

Следует отметить, что антимикробная активность исследуемых агентов зависит от концентрации препаратов (рис. 4). Так, при концентрации агентов 10–25 мкг/мл антимикробная активность отсутствует. Повышение концентрации исследуемых соединений до 50 мкг/мл приводит к резкому увеличению зоны задержки роста *Staphylococcus aureus*. Дальнейшее повышение концентрации до 75–

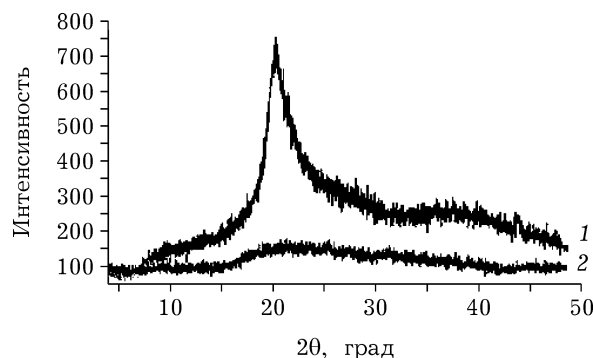


Рис. 3. Рентгенограммы Na-КМЦ (1) и гуанидин КМЦ (2).

ТАБЛИЦА 2

Чувствительность микроорганизмов к гуанидин пектину (СЗ = 70 мол. %, количество гуанидина 40.8 %) и гуанидин КМЦ (СЗ = 62 мол. %, количество гуанидина 30 %) при концентрации 50 мкг/мл

Препараты	Зона задержки роста, мм				
	Микроорганизмы				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
Гуанидин пектина	14.0±0.1	13.0±0.2	12.0±0.2	12.0±0.1	11.0±0.1
Гуанидин КМЦ	16.0±0.1	15.0±0.1	13.0±0.1	16.0±0.1	12.0±0.1

Примечание. Диаметры зон задержки роста меньше 10 мм – отсутствие антибактериальной активности; 10–15 мм – слабая активность; 15–20 мм – умеренно выраженная активность; свыше 20 мм – выраженная активность.

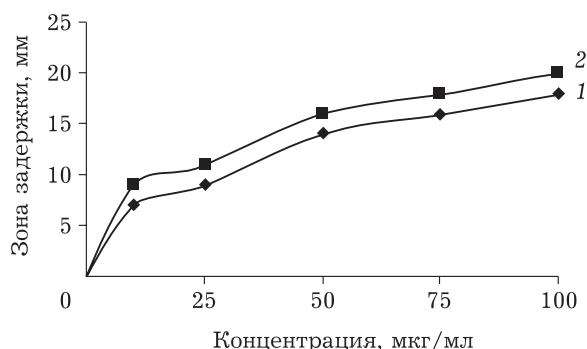


Рис. 4. Зависимость бактериостатического эффекта гуанидин пектина (1) и гуанидин КМЦ (2) в отношении *Staphylococcus aureus* от концентрации препарата.

100 мкг/мл агентов способствует усилению бактериостатического эффекта в отношении *Staphylococcus aureus*.

Определено, что для гуанидинсодержащих производных пектина LD₅₀ составляет 3000 мг/кг, а для соединений КМЦ – 1800 мг/кг, что позволяет отнести их к IV классу (малотоксичные вещества).

Таким образом, проведенные микробиологические исследования показали, что полученные соединения, в которых гуанидиновый фрагмент связан с макромолекулой пектина и КМЦ посредством аминной связи, обладают антимикробными свойствами и являются малотоксичными соединениями.

ВЫВОДЫ

1. Получены водорастворимые производные пектина и карбоксиметилцеллюлозы с различным содержанием гуанидина и степенью за-

мещения. Структуры и составы полученных соединений исследованы методами ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа (по содержанию азота). Найдено, что при молярном соотношении ДАКМЦ, ДАП/(H₂N)₂C=N = 1.0 : 2.3 происходит полное взаимодействие альдегидных групп пектина и карбоксиметилцеллюлозы с гуанидином.

2. Установлено, что гуанидин пектина и карбоксиметилцеллюлозы при концентрации 50 мкг/мл обладает антимикробным действием в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* и *Streptococcus faecalis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Покровский В. И. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР, 2002. 765 с.
- 2 Гембицкий П. А., Волынцева И. И. Полимерный биоцидный препарат полигексаметиленгуанидин. Запорожье: Полиграф, 1988. 44 с.
- 3 Афиногенов Г. Е., Панарин Е. Ф. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ, 1993. 264 с.
- 4 Глупова З. А. Новые композиционные материалы на основе диальдегидцеллюлозы и гуанидинсодержащих соединений: дис... канд. хим. наук. Нальчик, 2013.
- 5 Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С. // Современные актуальные проблемы естественных наук. Актобе. 2014. Т. 1. С. 99–102.
- 6 Соловский М. В., Никольская Н. В., Заикина Н. А. // Хим.-фарм. журн. 2002. Т. 36, № 2. С. 9–13.
- 7 Цитович И. К. Курс аналитической химии. М.: Высш. шк., 1977. 346 с.
- 8 Liu K., Xu Y., Lin X., Chen L., Huang L., Cao Sh., Li J. // Carbohydr. Polym. 2014. Vol. 110. P. 382–387.
- 9 Ding W., Zhao P., Li R. // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 83. P. 802–807.
- 10 Воробьев А. А., Кривошеин А. И., Ширококов В. П. Медицинская и санитарная микробиология. М.: ACADEMIA, 2003. 44 с.
- 11 Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1961. 152 с.

