

УДК 541.6.69:615.01.

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ГУАНИДИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© *О.Р. Ахмедов**, *Ш.А. Шомуротов*, *А.С. Тураев*

*Институт биоорганической химии АН Республики Узбекистан,
ул. М. Улугбека, 83, Ташкент, 100125 (Узбекистан), e-mail: ibchem@uzsci.net*

В статье представлены данные о синтезе и антимикробных свойствах гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы с различными физико-химическими характеристиками. Исследованы закономерности реакции нуклеофильного замещения альдегидных групп модифицированной Na-карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) с гуанидином в различных условиях. На основании полученных результатов выявлено, что предельное замещение реакционноактивных электрофильных групп нуклеофильным реагентом зависит от величины pH среды, молярного соотношения гуанидина и степени окисления эфира целлюлозы. Варьируя условиями реакции и количеством альдегидных групп в составе окисленной Na-КМЦ, получены азометиновые производные, отличающиеся содержанием азотсодержащих фрагментов в полимерной цепи. Проведено химическое восстановление лабильных азометиновых связей и синтезированы водорастворимые производные, содержащие прочные аминосвязанные гуанидиновые группы. В ходе проведенного исследования показано и обосновано влияние структурных показателей (степени замещения, количественного содержания гуанидина, значения pK_a и природы противоиона) макромолекулярных систем на антибактериальные и противогрибковые свойства. Разработанный подход синтеза открывает перспективы для создания антимикробных производных с регулируемыми физико-химическими характеристиками и заданными биологически активными свойствами.

Ключевые слова: макромолекула, Na-карбоксиметилцеллюлоза, гуанидин, нуклеофильное замещение, азометиновая связь, восстановление, гидролиз, антимикробная активность.

Введение

Химическое присоединение различных лекарственных препаратов или других низкомолекулярных действующих веществ к макромолекулам полисахаридов остается одним из наиболее эффективных методов получения биологически активных полимеров. Обычно в этом методе синтеза химическое связывание указанных соединений удобнее осуществлять через реакционноспособные функциональные группы предварительно модифицированных полисахаридов. В этом плане наиболее простым способом функционализации полисахаридов является периодатное окисление. Модифицируемые путем периодатного окисления полисахариды содержат в звеньях реакционно активные альдегидные группы [1–3], что, соответственно, расширяет возможности проведения различных реакций, не характерных для гидроксильных групп. В частности, диальдегидполисахариды в мягких условиях синтеза вступают в реакцию конденсации с аминами. Благодаря чему в макромолекулярную цепь полисахаридов удается включить аминопроизводные, в последующем отвечающих за биологическую активность [4–7].

Известно, что гуанидин является физиологически активным фрагментом многих антимикробных средств, относится к нетоксичным соединениям, а также имеет в структуре активные аминогруппы, легко вступающие в реакцию конденсации с альдегидами. В

Ахмедов Олий Равшанович – PhD, старший научный сотрудник, e-mail: Oliy86@bk.ru, ibchem@uzsci.net

Шомуротов Шавкат Абдуганиевич – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: shsha@mail.ru

Тураев Аббасхан Сабирханович – доктор химических наук, академик, главный научный сотрудник, e-mail: abbaskhan@mail.ru

общем случае такие особенности гуанидина могут оказаться весьма интересными для изучения его химического взаимодействия с диальдегидполисахаридами. При этом возможность химического связывания гуанидина с окисленными полисахаридами

* Автор, с которым следует вести переписку.

будет определяться наличием в макромолекуле электрофильных альдегидных групп и подобранными условиями реакции нуклеофильного замещения. Выявление условий синтеза, влияющих на прохождение реакции конденсации гуанидина с альдегидными группами модифицированных полисахаридов, может являться определяющим моментом, от которого будут зависеть не только физико-химические характеристики конечных продуктов, но и, вероятно, биологическая активность.

Цель настоящей работы – исследование закономерностей химического взаимодействия гуанидина с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой (ДАКМЦ) и установление физико-химических показателей синтезированных образцов, влияющих на проявление антимикробной активности.

Экспериментальная часть

Для синтеза гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы в работе использована Na-КМЦ со следующими характеристиками: порошок светло-желтого цвета, степень карбоксиметилирования – 85, степень полимеризации – 530; гуанидин углекислый квалификации х.ч.; боргидрид натрия (Sigma-Aldrich) – белый кристаллический порошок с массовой долей основного вещества $\geq 99\%$. Натрий йоднокислый мета (ТУ 6-09-02-54-74) квалификации ч.д.а.

Периодатное окисление Na-КМЦ. В склянку из темного стекла емкостью 500 мл помещали 0.01 моль Na-КМЦ, приливали 200 мл ацетатного буфера с pH 4.25 и оставляли перемешиваться до полного растворения эфира целлюлозы. Далее добавляли 0.2 н раствора NaIO_4 при молярном соотношении Na-КМЦ : $\text{IO}_4^- = 1 : 1.5$. Процесс периодатного окисления Na-КМЦ продолжался 1–4 ч, при температуре 20 °С. По окончании реакции периодатного окисления продукты осаждали ацетоном. Выпавшие осадки собирали на фильтре Шотта, промывали 70% этиловым спиртом 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 . ИК-спектры препаратов ДАКМЦ снимали на спектрометре Vector-22 в области длин волн 400–4000 cm^{-1} в таблетках KBr (3 мг образца/300 мг KBr).

Степень окисления ($\gamma_{\text{ок}}$) ДАКМЦ, вычисленная методом обратного йодометрического титрования [8], составила 14–31 моль%. Однако в ИК-спектрах ДАКМЦ вне зависимости от степени окисления отсутствовали характеристические полосы поглощения в области 1720–1740 cm^{-1} , относящиеся к альдегидным группам (рис. 1).

Синтез гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы. В стакан объемом 500 мл помещали 0.01 моль ДАКМЦ с различной степенью окисления, затем добавляли 100–200 мл воды, после полного растворения ДАКМЦ, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, вливали раствор, содержащий 0.2–0.35 моль $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2\text{H}_2\text{CO}_3$ (добавлением 0.1 н раствора HCl в щелочной раствор гуанидина изменяли величину pH в пределах 11–6). Реакция протекала при 20 °С в течение 2 ч. По окончании реакции целевые продукты осаждали и промывали ацетоном. Полученные осадки растворяли в воде, образовавшийся прозрачный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч, используя диализные мешки с пределом пропускания по белку 5000 Да. Конечные продукты выделяли путем сублимации воды из предварительно замороженного водного раствора. Содержание азота (N, %) в образцах определяли на элементном анализаторе марки Eura EA (Italy). Затем по содержанию азота вычисляли степень замещения (СЗ) каждого образца. Количество гуанидина в образцах найдено методом ацидиметрического титрования [9]. Исследование химического строения азометиновых производных карбоксиметилцеллюлозы проводили с помощью инфракрасной спектроскопии.

Химическое восстановление азометиновых связей в гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы проводили следующим образом: 0.5 г образца растворяли в 100 мл боратного буфера (pH 8.5). После полного растворения образца, добавляли водный раствор NaBH_4 . Восстанавливающего реагента брали в 2-кратном мольном избытке в расчете на 1 моль гуанидинсодержащего элементарного звена карбоксиметилцеллюлозы. При добавлении боргидрида натрия в раствор восстановитель гидролизировался, вызывая защелачивание, поэтому поддерживали необходимую величину pH среды добавлением буферной системы (pH 8.5). Реакция восстановления продолжалась 10 ч, при $t=20$ °С и постоянном перемешивании. В конце добавляли 0.5 М раствор HCl (или HNO_3 , HI, HF, CH_3COOH , $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CHOH})_4-\text{COOH}$) и доводили pH раствора до 6–6.5. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч (с трехкратной сменой диализной воды). Диализат подвергали сублимационной сушке.

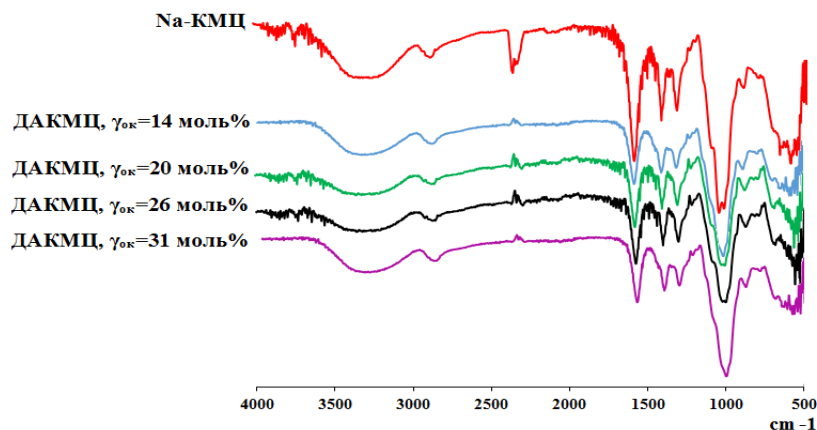


Рис. 1. ИК-спектры Na-КМЦ и ДАКМЦ с различной степенью окисления

Для обоснования прохождения реакции восстановления азометиновых связей образцы растворяли в воде, образовавшиеся растворы заливали в диализные мешки (с пределом пропускания по белку 5000 Да) и помещали их в емкость, содержащую буферный раствор (рН 8.5), продолжительность гидролиза составляла 24 ч. Через сутки отбирали определенное количество раствора из диализного мешка и осаждали ацетоном. Образовавшиеся осадки промывали 75%-ным этиловым спиртом, высушивали под вакуумом над P_2O_5 и по содержанию азота вычисляли конечную степень замещения. Методом УФ-спектроскопии подтверждали строение гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы. Спектры поглощения водных растворов образцов снимали на спектрофотометре «UV 1280» (Shimadzu, Japan), в диапазоне длин волн 180–350 нм.

Значения pK_a в конечных продуктах реакции определяли методом титрования: 50 мг образца растворяли в воде, затем к образовавшемуся раствору добавляли 0.1 н HCl и доводили рН до 3. После этого при постоянном перемешивании проводили титрование, добавляя аликвоты 0.1 н раствора NaOH. Значение рН раствора контролировали с помощью рН-метра (SevenCompact S220-Basic, Mettler Toledo, Germany). Значение pK_a установлено по величине рН, при котором находилась середина плато на кривой титрования, как описано в работе [10].

При исследовании антимикробной активности синтезированных производных в условиях *in vitro* были взяты (24-часовые) культуры *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Антимикробная активность образцов изучена при концентрации 200 мкг/мл, показатели эффективности оценивали по зоне задержки роста микроорганизмов (мм). Диаметр зон задержки роста микроорганизмов меньше 10 мм оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10–15 мм – слабая активность, 15–20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная активность. Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах.

Следует отметить, что на основе выбранных условий синтеза, во-первых, будут исследованы закономерности химического взаимодействия ДАКМЦ с гуанидином; во-вторых, получены производные, отличающиеся содержанием группировок, составом и природой противоиона; в-третьих, исследовано влияние структурных показателей макромолекул на антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы.

Результаты и обсуждение

Важным фактором, оказывающим влияние на степень конверсии альдегидных групп (в азометиновые связи) окисленных полисахаридов нуклеофильным реагентом, является величина рН среды [11, 12]. Для такого типа реакций существует оптимальное значение рН, т.е. такая зона рН, при которой реакция протекает с максимальной скоростью и получаемые продукты отличаются наибольшей степенью замещения. С целью установления оптимальной рН среды исследовано взаимодействие гуанидина с ДАКМЦ при различных значениях рН. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

Приведенные данные на рисунке 2 показывают, что значение степени замещения конечных продуктов зависит от рН среды, в которой протекает взаимодействие между аминогруппами гуанидина и ДАКМЦ. Продукты реакции, получаемые при величине рН менее или более 9, имеют относительно низкую степень

замещения. Такое отличие в степенях замещения синтезируемых продуктов несомненно связано с изменением реакционной способности аминогрупп гуанидина и -СНО групп ДАКМЦ. Если уменьшение степени замещения в продуктах реакции синтезируемых при величине рН более 9, объясняется переходом -СНО групп в карбоксильные или гидроксильные согласно реакции Канницаро, то в случае гуанидина это можно объяснить увеличением доли протонированных аминогрупп. Для подтверждения сказанного представим результаты титрования $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2\text{H}_2\text{CO}_3$ 0.1 н раствором НСІ (рис. 3).

Как видно на рисунке 3, при нейтрализации $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{N} \times 1/2\text{H}_2\text{CO}_3$ 0.1 н раствором НСІ наблюдается постепенное уменьшение величины рН от 11 до 9. Далее происходит резкое падение рН и образование волнообразного участка на кривой титрования, что доказывает нейтрализацию аминогруппы, придающей молекуле гуанидина свойства сильного однокислотного основания. Отсюда можно сделать заключение, что при значении рН менее 9 начинает постепенно уменьшаться реакционная активность гуанидина. При рН 9 реакция нуклеофильного замещения проходит через максимум и продукт реакции отличается высокой степенью замещения. Это доказывает об установлении оптимальной рН среды, в которой аминогруппы гуанидина еще не полностью протонированы и альдегидные группы ДАКМЦ не переходят в карбоксильные или гидроксильные.

Прежде установлено [12–14], что количество молекул нуклеофила, приходящихся на одно окисленное звено полисахарида, зависит от молярного соотношения реагирующих компонентов и нуклеофильности соединения со структурой $\text{R}-\text{NH}_2$. Например, гидроксиламин за счет большой нуклеофильности $\text{pK}_b=5.88$ вступает в реакцию с двумя альдегидными группами окисленных полисахаридов, а также реагирует с полуацетальной, гемиацетальной и гемдиольной формами активированной целлюлозы и ее эфиров. Тогда как 4-амино-фенол ($\text{pK}_b=8.7$), анилин ($\text{pK}_b=9.4$), гидразид изоникотиновой кислоты ($\text{pK}_b=10.2$), а также ряд антимикробных препаратов даже при большом молярном избытке в отношении окисленного звена полисахаридов, не взаимодействуют с двумя альдегидными группами.

Если исходить из вышесказанного, то вследствие высокой нуклеофильности гуанидина ($\text{pK}_b=0.4$), при оптимальном молярном соотношении низкомолекулярного реагента и значении рН среды замещаться должны две -СНО группы, присутствующие в звеньях ДАКМЦ. Для подтверждения нашего предположения и выявления предельного количества молекул, приходящихся на элементарное звено ДАКМЦ, целесообразным являлось проведение реакций при различных соотношениях гуанидина (табл. 1).

Как следует из таблицы 1, степень замещения продуктов реакции продолжает возрастать при увеличении молярного соотношения гуанидина от 2 до 2.5 моль. Дальнейшее увеличение количества гуанидина в реакционной среде незначительно влияет на степень замещения продуктов реакции, что указывает на исчерпание реакционноспособных функциональных групп, содержащихся в макромолекуле ДАКМЦ. Также следует заметить, что для получения азотсодержащих производных ДАКМЦ с предельным содержанием гуанидиновых групп соотношение нуклеофильного реагента составляет более 2 моль. Вместе с тем по значению предельной степени замещения можно легко вычислить, что на каждое элементарное звено ДАКМЦ приходится более двух молекул гуанидина (максимальная конверсия альдегидных групп ДАКМЦ равна 70 моль%, тогда как степень окисления всего 31 моль%). Это свидетельствует о том, что в полученных производных ДАКМЦ кроме азотметинового звена образуется дополнительная солевая связь в результате взаимодействия гуанидина с карбоксильными группами ДАКМЦ. Образование наряду с азотметинового ионной связи между аминогруппами гуанидина и ДАКМЦ объясняется частичным переходом нейтральных - CH_2COONa групп в кислые - CH_2COOH группы (в случае полного перехода ДАКМЦ терял бы растворимость) при периодатном окислении эфира целлюлозы, которое протекало при рН 4.25. По этим причинам количество гуанидина, приходящееся на одно элементарное звено макромолекулы ДАКМЦ, составляет более двух молекул.

На рисунке 4 наблюдается закономерное возрастание содержания гуанидиновых групп в продуктах реакции при увеличении степени окисления ДАКМЦ от 14 до 31 моль%. Эта особенность доказывает возможность получения гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы с различным составом и содержанием физиологически активных азотсодержащих группировок в макромолекулярной цепи.

В ИК-спектрах гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы были обнаружены характерные полосы поглощения в области $1655\text{--}1665\text{ см}^{-1}$, доказывающие наличие $-\text{C}=\text{N}-$ связи [15, 16] (рис. 5).

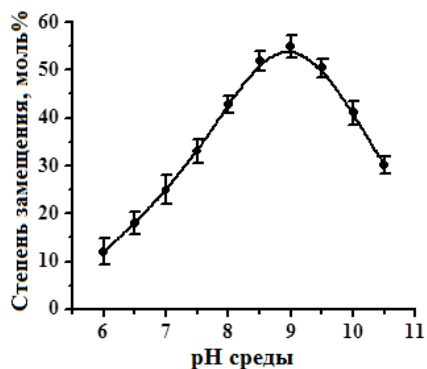


Рис. 2. Зависимость степени замещения ДАКМЦ ($\gamma_{\text{ок}}=31$ моль%) от значения pH раствора гуанидина (молярное соотношение -CHO : гуанидин=1 : 2)

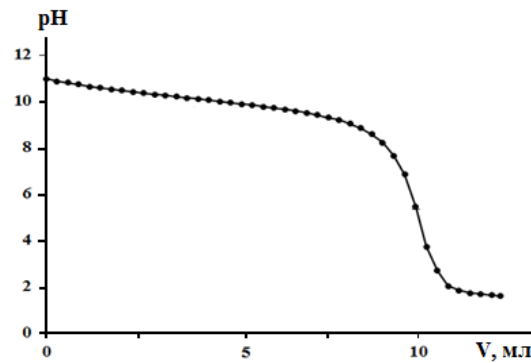


Рис. 3. Титрование $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2\text{H}_2\text{CO}_3$ 0.1 н раствором HCl

Таблица 1. Влияние молярного соотношения гуанидина на степень замещения и состав продуктов реакции (ДАКМЦ $\gamma_{\text{ок}}=31$ моль%; $t=20$ °C; pH 9; $\tau=2$ ч)

№	Соотношение -CHO : гуанидин	N, %	Степень замещения, моль%	Содержание гуанидина, %	моль/моль окисленное звено
1	1 : 2	9.4	55	14.7	1.8
2	1 : 2.5	10.9	67	19.0	2.2
3	1 : 3	11.5	70	19.5	2.25
4	1 : 3.5	11.5	19.5	2.25	

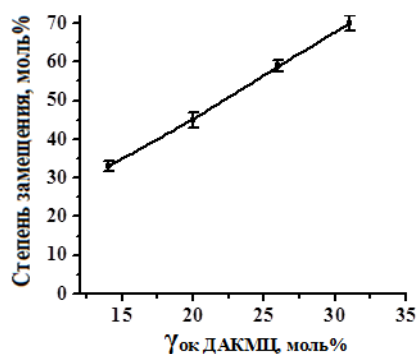


Рис. 4. Влияние степени окисления ДАКМЦ на состав продуктов реакции ($t=20$ °C; pH 9; $\tau=2$ ч; -CHO : гуанидин=1 : 3)

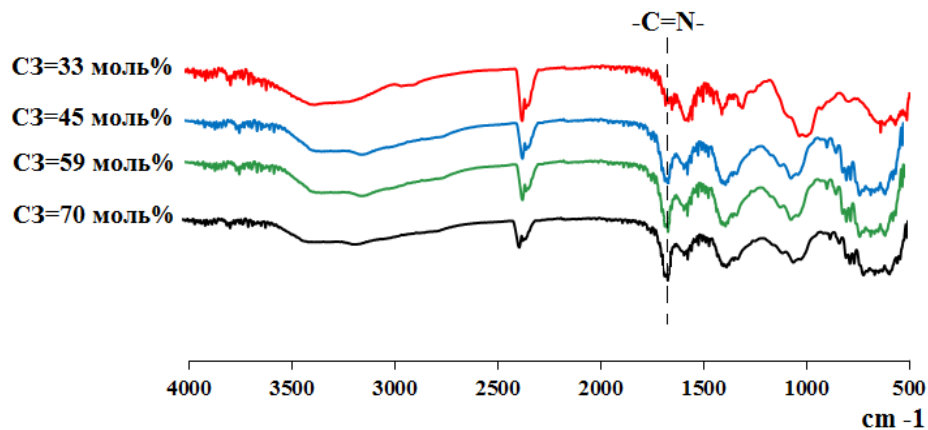


Рис. 5. ИК-спектры азетиновых производных карбоксиметилцеллюлозы

Таким образом, в результате исследований найдено оптимальное значение pH, при которой происходит предельное замещение альдегидных групп ДАКМЦ нуклеофильным реагентом. Установлена прямая зависимость степени замещения продуктов реакции от содержания альдегидных групп в окисленной карбоксиметилцеллюлозе.

Самым простым способом повышения прочности азометиновой связи является трансформация их во вторичные аминные (-CH₂-NH-) связи путем химического восстановления. Среди применяемых восстановителей азометиновой связи специфическим является NaBH₄. Очевидно, что степень и скорость восстановления -C=N- связей боргидридом натрия возрастает, если реакция происходит в гомогенной щелочной среде, в которой замедляется гидролиз NaBH₄. В то же время надо учитывать легкую гидролизуемость азометиновых связей в щелочных условиях реакционной среды [17, 18]. Отсюда вытекает еще одна задача, а именно, сохранение исходного количества азотсодержащих группировок при восстановлении азометиновых связей.

Для химической стабилизации азометиновых связей первоначально требовалось выяснить скорость отщепления гуанидиновых групп в щелочной среде при различных значениях pH и продолжительности времени гидролиза.

Результаты, приведенные в таблице 2, показывают, что скорость отщепления гуанидиновых групп различна и определяется величиной основности pH среды. Так, в щелочной среде со значением pH 10 в течение 2–15 ч уменьшение гуанидиновых групп в азометиновых производных карбоксиметилцеллюлозы составляет 18–84%, а при pH 8.5 – всего 10.5–60%. На основе этих результатов можно полагать, что более подходящей pH средой для проведения восстановления -C=N- связей гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы с участием боргидрида натрия является pH 8.5.

В нашем случае еще одной из важных особенностей процесса восстановления являлось определение продолжительности времени реакции, в течение которой будет осуществлена максимальная трансформация легкорасщепляемых -C=N- связей в более стабильные -CH₂-NH- связи. Предварительно проведенными исследованиями выявлено, что проведение химического восстановления образцов в течение 5 часов не приводит к значительному переходу азометиновых связей в аминные. Вследствие чего далее химическое восстановление азометиновых связей проводили в течение 10 ч (табл. 3).

Сопоставляя параметры гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы (табл. 3) до и после химического восстановления при участии NaBH₄, можно убедиться, что при следующих условиях реакции ($\tau=10$ ч и pH 8.5) происходит практически полная трансформация -C=N- связей, при этом уменьшение степени замещения в образцах имеет минимальное значение. Также следует обратить внимание на тот факт, что скорость отщепления гуанидиновых групп в щелочной среде в присутствии боргидрида натрия немного замедляется и не совпадает с данными таблицы 2, хотя реакция протекает при pH 8.5. По-видимому, это связано с тем, что в гомогенной среде скорость восстановления азометиновых связей превосходит их расщепление, в результате чего стабилизированные -CH₂-NH- связи перестают гидролизироваться в данных условиях реакционной среды.

Известно, что в УФ-области гуанидиновая группа имеет интенсивную полосу поглощения при 195 нм [19]. Это обстоятельство позволяет использовать метод УФ-спектроскопии для доказательства присутствия гуанидиновых фрагментов в синтезированных образцах. При изучении водного раствора гуанидина и производных карбоксиметилцеллюлозы, содержащих аминосвязанные гуанидиновые группы, также наблюдался максимум поглощения при 195 нм (рис. 6).

Таблица 2. Устойчивость азометиновых производных ДАКМЦ в щелочной среде при различных значениях pH ($t=20$ °C)

Образец гуанидина карбоксиметилцеллюлозы (N,%=11,4 и C3=70 моль%)						
pH 10				pH 8.5		
τ , ч	N,%	C3, моль%	Уменьшение содержания гуанидиновых групп, %	N,%	C3, моль%	Уменьшение содержания гуанидиновых групп, %
2	8.8	52	18	10.0	60	10.5
5	6.4	37	42	8.5	51	24
10	4.5	25	55	6.7	39	42
15	2.0	11	84	4.8	27	60

Таблица 3. Результаты химического восстановления азотметинных связей гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы

№	СЗ ₁ *, моль%	N, %	СЗ ₂ *, моль%	N, %	СЗ ₃ *, моль%	N, %
1	33	5.7	21	3.6	19	3.4
2	45	7.6	30	5.2	27	4.8
3	59	9.8	41	7.0	39	6.7
4	70	11.4	56	9.0	50	8.5

В целях определения зависимости антимикробной активности от физико-химических характеристик синтезированных производных были выбраны образцы, отличающиеся степенью замещения, содержанием гуанидина и значением рКа.

Данные, представленные в таблице 4, позволяют сделать вывод, что антимикробная активность синтезированных производных различна и зависит от количественного содержания гуанидиновых групп, расположенных в макромолекулярной цепи. С увеличением степени замещения значения рКа и содержания гуанидина в исследованных образцах происходит возрастание активности в отношении микроорганизмов. Эти данные не только подчеркивают необходимость присутствия гуанидиновых группировок для проявления антимикробных свойств, но и доказывают влияние структурных показателей на проявление активности.

При сравнении антимикробной активности синтезированных производных с $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH}\times 1/2\text{H}_2\text{CO}_3$ можно прийти к следующему заключению: несмотря на то, что значение рКа низкомолекулярного гуанидина равно 13.5, по активности он уступает синтезированным образцам. Это обобщение свидетельствует о том, что при ковалентном связывании гуанидина с ДАКМЦ макромолекула приобретает способность взаимодействовать с отрицательно заряженной мембраной микроорганизмов, происходящее по принципу «полимер-поверхность». В таком случае вполне возможно, что степень повреждения мембраны микроорганизма определяется количеством взаимодействующих участков, точнее, общим числом гуанидиновых групп, расположенных в макромолекулярной цепи. Тогда как низкомолекулярный гуанидин не способен к такому взаимодействию с поверхностью микроорганизмов. Наши предположения вытекают из сведений, представленных в работе [20], где доказано, что низкомолекулярный аналог полигуанидина диаминогексилбигуанидин не способен связываться с отрицательно заряженной фосфолипидной мембраной.

В исследованиях также было обнаружено, что природа противоиона существенно влияет на антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы. Полимерные соли исследуемых образцов, полученные нейтрализацией гуанидиновых групп сильными неорганическими кислотами, показывали практически одинаковый уровень антимикробной активности. Однако протонирование гуанидиновых фрагментов карбоксилат-анионами органических кислот приводило к уменьшению эффективности антимикробного действия (табл. 5).

Видимо, такая закономерность обусловлена донорно-акцепторными свойствами противоионов, впоследствии оказывающих влияние на перераспределение электронной плотности в гуанидиновых группировках, расположенных вдоль основной цепи ДАКМЦ.

Рис. 6. УФ-спектры гуанидина (1) и продуктов реакции со степенью замещения 50 (2), 39 (3), 27 (4) и 19 моль% (5); $c=100$ мкг/мл

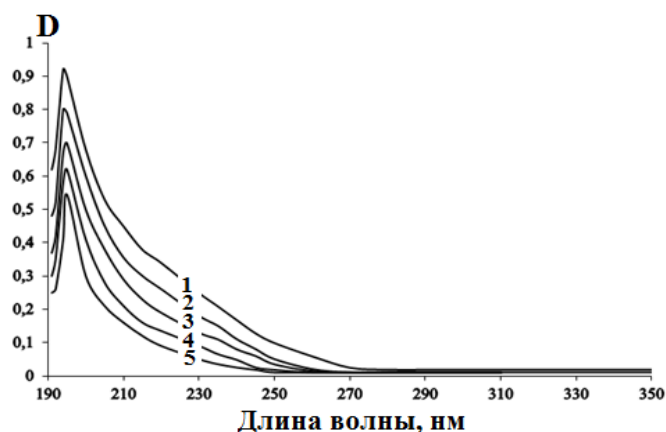


Таблица 4. Физико-химические характеристики и антимикробная активность гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы (в виде гидрохлоридов)

СЗ ₃ , моль%	N, %	Содержание гуанидина, %	pKa	Зона задержки роста <i>S.aureus</i> , мм	Зона задержки роста <i>C.albicans</i> , мм
19	3.4	9.1	8.0±0.1	12±0.6	10±0.5
27	4.8	15.0	8.2±0.1	16±0.8	13±1.0
39	6.7	19.8	8.5±0.1	20±1.0	15±0.6
50	8.5	28.5	8.8±0.1	23±0.5	20±1.4

Примечание: зона подавления *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* солью гуанидина при концентрации 200 мкг/мл составила 10±0.6 и 8±0.5 мм.

Таблица 5. Чувствительность микроорганизмов к различным солям гуанидина карбоксиметилцеллюлозы (СЗ=50 моль%)

Микроорганизмы	Противоионы				
	NO ₃ ⁻	I ⁻	F ⁻	⁻ OCOCH ₃	⁻ OCOC ₅ H ₁₁ O ₅
<i>Candida albicans</i>	22±0.8	20±0.6	20±1.0	13±0.7	15±0.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	21±1.2	25±1.0	23±1.0	15±0.8	10±0.4

Таким образом, представленные сведения о синтезе и установленные некоторые структурные показатели, влияющие на физиологические свойства гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы, не только подтверждают правильность выбранного подхода химического конструирования антимикробных производных, но и позволяют существенно приблизиться к созданию новых макромолекулярных систем с регулируемыми физико-химическими характеристиками и заданным уровнем активности.

Выводы

1. Проведена и изучена реакция нуклеофильного замещения диальдегидов карбоксиметилцеллюлозы с гуанидином в различных условиях. На основании результатов исследования обосновано, что предельная конверсия альдегидных групп зависит от величины pH среды, молярного соотношения гуанидина и степени окисления эфира целлюлозы.

2. Найдены условия, позволяющие провести восстановление азометиновых связей с минимальным уменьшением гуанидиновых групп в макромолекулярной цепи. При оптимальных условиях ($\tau=10$ ч и pH 8.5) химического восстановления, осуществлена практически полная трансформация азометиновых связей и получены водорастворимые производные карбоксиметилцеллюлозы, содержащие аминоксвязанные гуанидиновые группы. Степень замещения конечных продуктов составила 19–50 моль%, содержание гуанидина 9.1–28.5% и значение pKa=8.0–8.8±0.1.

3. Установлена зависимость антибактериальной и противогрибковой активности синтезированных производных от количества гуанидиновых групп, значения pKa и природы противоиона. Согласно полученным данным, среди исследованных образцов наиболее выраженной активностью обладает гуанидин карбоксиметилцеллюлозы со степенью замещения 50 моль% и значением pKa 8.8±0.1. Гидрохлориды, нитраты, йодиды и фториды гуанидина карбоксиметилцеллюлозы в отличие от ацетата и глюконата оказались более эффективными в отношении микроорганизмов.

Список литературы

1. Dang X., Liu P., Yang M., Deng H., Shan Z., Zhen W. Production and characterization of dialdehyde cellulose through green and sustainable approach // *Cellulose*. 2019. Vol. 26. Pp. 9503–9515. DOI: 10.1007/s10570-019-02747-9.
2. Asere T.G., Mincke S., Folens K. Dialdehyde carboxymethyl cellulose cross-linked chitosan for the recovery of palladium and platinum from aqueous solution // *Reactive and Functional Polymers*. 2019. Vol. 141. Pp. 145–154. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.05.008.
3. Ахмедов О.Р., Шомуротов Ш.А., Тураев А.С. Особенности синтеза диальдегид производных полисахаридов // *Узбекский химический журнал*. 2013. №1. С. 30–33.
4. Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Rakhmanova G.G., Turaev A.S. Synthesis and study of biological activity of sulfamic polysaccharide derivatives // *Russ. J. of Bioorg. Chem.* 2017. N7. Pp. 718–721. DOI: 10.1134/S1068162017070020.
5. Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Turaev A.S., Vaili A. Synthesis and study of antimicrobial activity of sulphamic pectin derivatives // *Chemistry for Sustainable Development*. 2017. Vol. 25. Pp. 139–143.

6. Сюткин В.Н., Николаев А.Г., Сажин С.А., Попов В.М., Заморянский А.А. Азотсодержащие производные диальдегидцеллюлозы. 2. Синтез производных диальдегидцеллюлозы с азотистыми гетероциклами // Химия растительного сырья. 2000. №1. С. 5–25.
7. Медушева Е.О., Филатов В.Н., Рыльцев В.В., Белов А.А., Кулагина А.С. и др. Производные диальдегидцеллюлозы, модифицированные биологически активными веществами // Фармация. 2016. №1. С. 52–56.
8. Гумникова В.И. Синтез диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и их химические превращения: дисс. ... канд. хим. наук. М., 2014. 137 с.
9. Губен-Вейль. Методы органической химии. М., 1967. Т. 2. 1032 с.
10. Rawlinson L.B., Ryan S.M., Mantovani G., Syrett J.A, Haddleton D.M., Brayden D.J. Antibacterial Effects of Poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against Selected Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria // Biomacromolecules. 2010. Vol. 11(2). Pp. 443–453. DOI: 10.1021/bm901166y.
11. Tishchenko E.V., Iozep A.A., Ivin B.A. Reaction of Dextran Polyaldehyde with Aminohydroxypyrimidines // Russ. J. of Appl. Chem. 2002. Vol. 75. N4. Pp. 680–682.
12. Снежко В.А., Комар В.П., Хомяков К.П., Вирник А.Д., Жбанков Р.Г., Розенберг Г.Я., Роговин З.А. Синтез водорастворимых производных декстрана, содержащих химически связанные антибиотики // Высокомолекулярные соединения. 1974. Т. 16. №10. С. 2233–2239.
13. Сарымсаков А.А., Наджимутдинов Ш., Ташпулатов Ю.Т. Химические превращения в цепи диальдегидов целлюлозы и ее эфиров // Химия природных соединений. 1998. №2. С. 212–217.
14. Шомуратов Ш.А., Муродов Э.А., Тураев А.С. Синтез и исследование комбинированного противотуберкулезного препарата на основе карбоксиметилцеллюлозы // Химия растительного сырья. 2006. №2. С. 25–28.
15. Keshk S.M.A.S., Ramadan A.M., Bondock S. Physicochemical characterization of novel Schiff bases derived from developed bacterial cellulose 2,3-dialdehyde // Carbohydrate Polymers. 2015. Vol. 127. Pp. 246–251. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.03.038.
16. Wang P., He H., Cai R., Tao G., Yang M., Zuo H., Wang Y. Cross-linking of dialdehyde carboxymethyl cellulose with silk sericin to reinforce sericin film for potential biomedical application // Carbohydrate Polymers. 2019. Vol. 212. Pp. 403–411. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.02.069.
17. Тищенко Е.В. Взаимодействие amino- и гидрокси(оксо)производных гетероциклов с полисахаридами – новый путь синтеза БАВ: автореф. дис. ... канд. хим. наук. СПб., 2003. 26 с.
18. Козлова Ю.С., Роговин З.А. Синтез новых производных целлюлозы и других полисахаридов // Высокомолекулярные соединения. 1960. Т. 2. №4. С. 614–618.
19. Шаталов Д.О. Разработка и стандартизация методов контроля качества, разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида: дисс. ... канд. фарм. наук. М., 2015. 137 с.
20. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ, 1993. 264 с.

Поступила в редакцию 14 октября 2020 г.

После переработки 24 февраля 2021 г.

Принята к публикации 18 мая 2021 г.

Для цитирования: Ахмедов О.Р., Шомуратов Ш.А., Тураев А.С. Особенности синтеза и антимикробные свойства гуанидинсодержащих производных карбоксиметилцеллюлозы // Химия растительного сырья. 2021. №3. С. 73–82. DOI: 10.14258/jcrpm.2021038705.

*Akhmedov O.R.**, Shomurotov Sh.A., Turaev A.S. PECULIARITIES OF SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF GUANIDINE-CONTAINING CARBOXYMETHYLCELLULOSE DERIVATIVES

Institute of Bioorganic Chemistry of the Uzbek Academy of Sciences, ul. M. Ulugbeka, 83, Tashkent, 100125 (Uzbekistan), e-mail: ibchem@uzsci.net

The article presents data on the synthesis and antimicrobial properties of guanidine-containing carboxymethylcellulose derivatives with different physical and chemical characteristics. The regularities of the reaction of nucleophilic substitution of aldehyde groups of modified Na-carboxymethylcellulose (Na-CMC) by guanidine under different conditions are studied. Based on the results obtained, it was found that the limit replacement of reactive electrophilic groups with nucleophilic reagent depends on the pH value of the medium, molar ratio of guanidine and the degree of oxidation of cellulose ester. By varying the reaction conditions and the number of aldehyde groups in the oxidized Na-CMC composition, the azometin derivatives differing in the content of nitrogen-containing fragments in the polymer chain were obtained. Chemical restoration of labile azomethine bonds was performed and water-soluble derivatives containing strong amino-bound guanidine groups were synthesized. The study shows and substantiates the influence of structural indices (degree of substitution, quantitative guanidine content, pKa values and nature of counterion) of macromolecular systems on antibacterial and antifungal properties. The developed approach of synthesis opens prospects for creation of antimicrobial derivatives with regulated physical and chemical characteristics and set biologically active properties.

Keywords: macromolecule, Na-carboxymethylcellulose, guanidine, nucleophilic substitution, azomethine bond, reduction, hydrolysis, antimicrobial activity.

References

- Dang X., Liu P., Yang M., Deng H., Shan Z., Zhen W. *Cellulose*, 2019, vol. 26, pp. 9503–9515. DOI: 10.1007/s10570-019-02747-9.
- Asere T.G., Mincke S., Folens K. *Reactive and Functional Polymers*, 2019, vol. 141, pp. 145–154. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.05.008.
- Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Turayev A.S. *Uzbekskiy khimicheskij zhurnal*, 2013, no. 1, pp. 30–33. (in Russ.).
- Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Rakhmanova G.G., Turaev A.S. *Russ. J. of Bioorg. Chem.*, 2017, no. 7, pp. 718–721. DOI: 10.1134/S1068162017070020.
- Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Turaev A.S., Vaili A. *Chemistry for Sustainable Development*, 2017, vol. 25, pp. 139–143.
- Syutkin V.N., Nikolayev A.G., Sazhin S.A., Popov V.M., Zamoryanskiy A.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2000, no. 1, pp. 5–25. (in Russ.).
- Medusheva Ye.O., Filatov V.N., Ryl'tsev V.V., Belov A.A., Kulagina A.S. i dr. *Farmatsiya*, 2016, no. 1, pp. 52–56. (in Russ.).
- Gumnikova V.I. *Sintez dial'degiddeksrana i dial'degidkarboksimitiltsellyulozy i ikh khimicheskiye pre-vrashcheniya: diss. ... kand. khim. nauk.* [Synthesis of dialdehyde dextran and dialdehyde carboxymethyl cellulose and their chemical transformations: diss. ... Cand. chem. sciences]. Moscow, 2014, 137 p. (in Russ.).
- Guben-Veyl'. *Metody organicheskoy khimii.* [Organic chemistry methods]. Moscow, 1967, vol. 2, 1032 p. (in Russ.).
- Rawlinson L.B., Ryan S.M., Mantovani G., Syrett J.A., Haddleton D.M., Brayden D.J. *Biomacromolecules*, 2010, vol. 11(2), pp. 443–453. DOI: 10.1021/bm901166y.
- Tishchenko E.V., Iozep A.A., Ivin B.A. *Russ. J. of Appl. Chem.*, 2002, vol. 75, no. 4, pp. 680–682.
- Snezhko V.A., Komar V.P., Khomyakov K.P., Virnik A.D., Zhibankov R.G., Rozenberg G.Ya., Rogovin Z.A. *Vysokomolekulyarnyye soyedineniya*, 1974, vol. 16, no. 10, pp. 2233–2239. (in Russ.).
- Sarymsakov A.A., Nadzhimutdinov Sh., Tashpulatov Yu.T. *Khimiya prirodnykh soyedineniy*, 1998, no. 2, pp. 212–217. (in Russ.).
- Shomuratov Sh.A., Murodov E.A., Turayev A.S. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2006, no. 2, pp. 25–28. (in Russ.).
- Keshk S.M.A.S., Ramadan A.M., Bondock S. *Carbohydrate Polymers*, 2015, vol. 127, pp. 246–251. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.03.038.
- Wang P., He H., Cai R., Tao G., Yang M., Zuo H., Wang Y. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 212, pp. 403–411. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.02.069.
- Tishchenko Ye.V. *Vzaimodeystviye amino- i gidroksi(okso)proizvodnykh geterotsiklov s polisakharidami – novyy put' sinteza BAV: avtoref. dis. ... kand. khim. nauk.* [The interaction of amino and hydroxy (oxo) derivatives of heterocycles with polysaccharides - a new way of synthesis of biologically active substances: author. dis. ... Cand. chem. sciences]. St.-Petersburg, 2003, 26 p. (in Russ.).
- Kozlova Yu.S., Rogovin Z.A. *Vysokomolekulyarnyye soyedineniya*, 1960, vol. 2, no. 4, pp. 614–618. (in Russ.).
- Shatalov D.O. *Razrabotka i standartizatsiya metodov kontrolya kachestva, razvetvlennogo oligogeksametilenguanidin gidrokhlorida: diss. ... kand. farm. nauk.* [Development and standardization of quality control methods for branched oligohexamethylene guanidine hydrochloride: diss. ... Cand. farm. sciences]. Moscow, 2015, 137 p. (in Russ.).
- Afinogenov G.Ye., Panarin Ye.F. *Antimikrobnyye polimery.* [Antimicrobial polymers]. St.-Petersburg, 1993, 264 p. (in Russ.).

Received October 14, 2020

Revised February 24, 2021

Accepted May 18, 2021

For citing: Akhmedov O.R., Shomurotov Sh.A., Turaev A.S. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 3, pp. 73–82. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021038705.

* Corresponding author.