

© Коллектив авторов, 2017

С. А. Кедик, Д. О. Шаталов, А. Д. Аскретков, П. М. Исайкина, И. П. Седишев, А. В. Панов, А. С. Евсеева

## ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА — ПОЛУЧЕНИЕ АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ И ИСПЫТАНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» МИТХТ, Министерство образования и науки Российской Федерации, Россия, 119571, Москва, проспект Вернадского, д. 86; тел.: +7 (495) 246-05-55 доб. 8-01; e-mail: shatalov d@mirea.ru

Установлено, что олигогексаметиленгуанидин очень медленно реагирует с неактивированными алкилгалогенидами с высокой молекулярной массой (додецилхлорид), что, возможно, обусловлено стерическими затруднениями и низкой нуклеофильностью гуанидинового фрагмента, поэтому данный алкилгалогенид не может быть использован для модификации олигомера в обычных условиях. Этилированные производные олигомера получают гораздо легче, однако они имеют сильный разброс степени замещения (при одинаковых условиях и соотношении реагентов). Одновременно показано, что при алкилировании антибактериальная активность производных понижается по сравнению с гидрохлоридом исходного олигомера. Бензилхлорид легко реагирует с олигомером и при этом получают производные с желаемой степенью замещения. Установлено, что бензильные производные со степенью замещения 0,2 обладают повышенной активностью в отношении микобактерий по сравнению с исходным гидрохлоридом, при дальнейшем увеличении степени замещения активность постепенно снижается. Возможно, повышение активности связано с оптимальным увеличением гидрофобности и/или пространственной структуры олигомера. Наличие достаточно высокой антибактериальной активности бензильных производных в отношении *Mycobacterium smegmatis* штамм ATCC 607 делает перспективными дальнейшие работы по получению и изучению свойств алкилированных производных олигогексаметиленгуанидина с целью получения еще более активных производных, в т.ч. против *M. smegmatis*. Наиболее очевидными кандидатами могут стать метилкарбоксамещенные производные олигомеров.

**Ключевые слова:** активность; алкильные производные; олигогексаметиленгуанидин.

В настоящее время одним из широко используемых дезинфицирующих средств является гидрохлорид (гх) олигогексаметиленгуанидина (I) (рис. 1). Он обладает высокой активностью в отношении большинства патогенных микроорганизмов, имеет низкую токсичность для теплокровных животных (в том числе человека), пролонгированное действие. Однако существенным недостатком Iгх является отсутствие активности в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [1], возбудителя туберкулеза. По данным ВОЗ, туберкулез является основной инфекционной причиной смертности в мире [2]. Для борьбы с туберкулезной инфекцией и другими патогенными микроорганизмами создано большое количество антибактериальных препаратов различной химической природы [3].

Одним из способов повышения активности средств, содержащих Iгх, против микобактерий туберкулеза является сочетание их с веществами, активными в отношении микобактерий, таких как хлорид бензалкония, пара-аминосалициловая кислота [4] и др. Однако данные вещества достаточно дороги и применение их ог-

раничено [5]. Другим способом решения указанной проблемы является модификация самого Iгх. Считается [3], что низкая активность Iгх обусловлена его высокой полярностью и, как следствие, невозможностью преодолеть гидрофобную клеточную стенку микобактерий [6]. Увеличение гидрофобности молекулы I может помочь решить проблему низкой активности. В данной работе мы планировали алкилировать I различными алкилгалогенидами и провести биологические испытания полученных производных на тест-микроорганизме *Mycobacterium smegmatis* штамм ATCC 607 для контроля изменения активности по сравнению с Iгх.

Имеются патентные данные об алкилировании гх полигексаметиленгуанидина додецилхлоридом [7], однако после 24 ч обработки по данной методике удалось получить производные со степенью замещения не более 0,05. Алкилирование I этилбромидом протекает достаточно легко, но степень замещения производного сложно предсказать ввиду высокой летучести этилбромида и протекания побочных реакций. Алки-

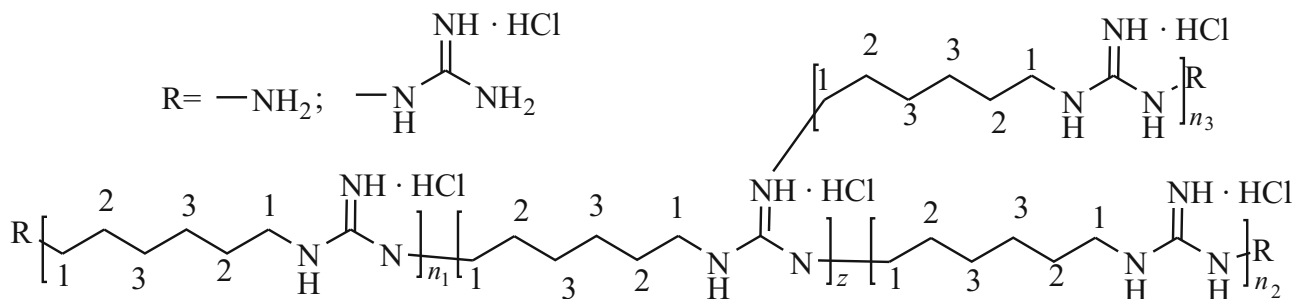


Рис. 1. Разветвленный олигогексаметиленгуанидин гидрохлорид ( $n_1 + n_2 + n_3 + z = 4 - 20$ ).

лирование **I** бензилхлоридом в спиртовом растворе щелочи протекает легко, но оказалось, что степень замещения производного намного меньше теоретически рассчитанной из-за побочной реакции бензилхлорида с щелочью и спиртом. Для получения алкильных производных **I**, в том числе бензильных, разработана оригинальная методика, которая включала 2 стадии. На первой стадии получали основание **I**, на второй — алкилировали его бензилхлоридом в растворе диметилсульфоксида (ДМСО). Бензильные производные получают с достаточно высоким выходом и с желаемой степенью замещения.

Структура полученных производных **I** подтверждена ИК, ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  спектроскопией. В ИК-спектре полученных производных полосы поглощения в области  $3320$  и  $1590\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям  $-\text{NH}$  и  $\text{C}=\text{N}$  групп, поглощение в области  $1610\text{ см}^{-1}$  соответствует колебаниям связей  $\text{C}-\text{C}$  в ароматическом ядре (бензильные производные). Во всех спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  имеются 3 уширенных сигнала в области 1,33, 1,55, 3,16 м.д., относящиеся к протонам 3,2,1 метиленовых групп **I**, соответственно (рис. 1). Для этильных производных **I** характерны сигналы в области 1,02, 3,00 м.д., соответствующие этильной группе, для додецильных производных характерны сигналы в области 0,86, 1,27, 2,70 м.д., соответствующие  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$ -группам додецильного остатка. Для бензильных производных характерен набор сигналов в области 4,32 – 4,46 м.д., относящихся к протонам метиленовой группы бензильного остатка (разные химические сдвиги обусловлены различным положением бензильного остатка в гуанидиновом фрагменте [8]), сигналы

в области 7,25 – 7,40 м.д. соответствуют ароматическим протонам. Степень замещения полученных бензильных производных определяли методом ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопии по формуле:

$$X = \frac{S_a}{S_b} \cdot \frac{4}{5}, \quad (1)$$

где  $S_a$  — суммарная площадь сигналов протонов в диапазоне 7,05 – 7,52 м.д.;  $S_b$  — усредненная площадь сигналов с хим. сдвигом 1,30, 1,43, 3,14 м.д.; 4 — количество протонов у метиленовых групп **I**; 5 — количество протонов в ароматическом кольце.

Для остальных производных, так как они имеют метильную группу в введенной части, степень замещения рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_c}{S_b} \cdot \frac{4}{3}, \quad (2)$$

где  $S_c$  — площадь сигнала метильной группы (0,87 – 1,05 м.д.);  $S_b$  — площадь сигналов с химическим сдвигом 3,14 м.д.; 3 — количество протонов метильной группы; 4 — количество протонов у метиленовых групп **I**.

Так как наиболее успешно получились бензильные производные, то для них рассчитали значения средней молекулярной массы ( $M_n$ ) с использованием ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектроскопии. Запись спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  препарата проводили в режиме Inverse Gate. Сигналы

Таблица 1  
Сигналы ЯМР  $^{13}\text{C}$  бенз.гх и обозначение их площадей

Номер пика	Химический сдвиг, м.д.	Обозначение площади пика
I	25,55	$S_I$
II'	28,37	$S_{II'}$
II	30,78	$S_{II}$
III'	40,64	$S_{III'}$
III	40,82	$S_{III}$
IV''	155,90	$S_{IV''}$
IV	156,02	$S_{IV}$
IV'	157,22	$S_{IV'}$

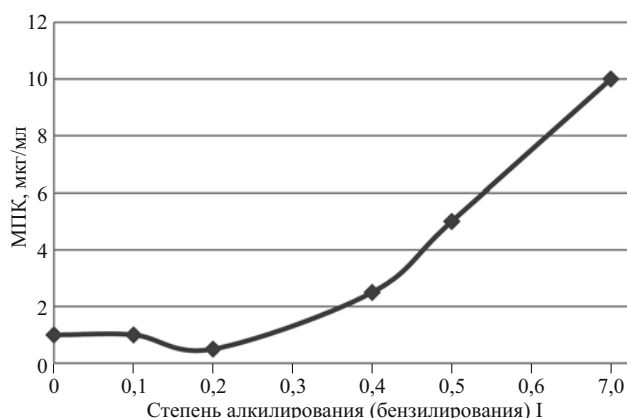


Рис. 2. Зависимость МПК бензильных производных от степени алкилирования **I**.

Соотношения реагентов и характеристики синтезированных производных

Образец	Мольное соотношение R-X/I	Полученная степень замещения	$M_n$ , Да	Растворимость в воде
Ибенз.гх 0,9	1	0,91	1384	Нерастворим
Ибенз.гх 0,7	0,75	0,72	1293	Мало растворим
Ибенз.гх 0,5	0,54	0,51	1186	Мало растворим
Ибенз.гх 0,4	0,43	0,40	1137	Растворим
Ибенз.гх 0,2	0,23	0,20	1041	Хорошо растворим
Ибенз.гх 0,1	0,13	0,10	990	Хорошо растворим
Эт.гб 0,2	1	0,2	-	Хорошо растворим
Эт.гб 0,5	2,5	0,5	-	Хорошо растворим
Идц.гх	1	0,05	-	Хорошо растворим

спектра и обозначение их площадей приведены в табл. 1. Расчеты проводились по формулам, приведенным в работе [9].

В табл. 1 не показаны химические сдвиги бензильного остатка (сигналы в области 126 – 153 м.д.), так как они не используются для расчета среднечисловой молекулярной массы. По интегральным интенсивностям пиков, указанных в таблице, рассчитывается среднечисловая молекулярная масса ( $M_n$ ) по формулам:

$$a = \frac{S_{III'}}{S_{IV'}}, \quad (3)$$

где  $a$  — отношение концевых фрагментов остатка гексаметилендиамина и гуанидина.

$$b = \frac{S_{III'} + S_{IV'}}{S_{IV}}, \quad (4)$$

где  $b$  — отношение концевых и неконцевых фрагментов.

$$d = \frac{S_{IV''}}{S_{IV}}, \quad (5)$$

где  $d$  — отношение мольного количества разветвленных и неразветвленных фрагментов.

$$z = \frac{2 - \frac{2b}{a+1}}{\frac{2b}{d} + 3b + \frac{b}{a+1} - 1}, \quad (6)$$

где  $z$  — мольное количество неконцевых звеньев.

$$[гуан]_{конц} = \frac{2+z}{a+1}, \quad (7)$$

где  $[гуан]_{конц}$  — мольное количество концевых гуанидиновых групп.

$$[эмда]_{конц} = a \frac{2+z}{a+1}, \quad (8)$$

где  $[эмда]_{конц}$  — мольное количество концевых гуанидиновых групп.

$$M_n = \left(\frac{z}{d} \cdot 141 + z \cdot 182 + [гуан]_{конц} \cdot 100 + [эмда]_{конц} \cdot 58\right) \cdot \frac{177,5 \cdot X \cdot 91}{141}, \quad (9)$$

где  $X$  — степень замещения полимера I бензильными остатками.

Значения  $M_n$  для различных бензильных производных приведены в табл. 2.

#### Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР сняты в растворителе ДМСО- $d_6$  на приборе AVANCE Bruker DPX-300 с рабочей частотой 300 МГц. Химические сдвиги приведены относительно ТМС. Концентрация образца — 10 %. ИК-спектры получены на приборе EQUINOX 55 в таблетках бромида калия в концентрации 1:200 мг.

**Додецильное производное I (Идц.гх).** К 5 г Igx (28 экв) прибавляли 10 мл 70 % спирта и размешивали до растворения, далее прибавляли 7 мл 4 М раствора гидроксида калия в 70 % спирте и 5,73 г (28 ммоль) додецилхлорида. Кипятили с обратным холодильником в течение 24 ч. После охлаждения реакционной смеси прибавляли 50 мл ацетона, образовавшуюся суспензию отстаивали в течение 2 ч, далее декантировали жидкость, а к твердому осадку прибавляли 20 мл 70 % спирта, размешивали до растворения и осаждали олигомер 35 мл ацетона, декантировали жидкость, осадок сушили в вакууме при температуре 80 °С в течение 5 ч.

**Гидробромид этильного производного (Эт.гб)** получали аналогично получению додецильных произ-

Таблица 3

#### МПК полученных производных

Образец	МПК образца, мкг/мл
Ибенз.гх 0,7	10
Ибенз.гх 0,5	5
Ибенз.гх 0,4	2,5
Ибенз.гх 0,2	0,5
Ибенз.гх 0,1	1
Iгх	1
Эт.гб 0,5	5
Эт.гб 0,2	2,5
Идц.гх	1

водных. Загрузки 5 г Iгх, 3 – 7,6 г (28 – 70 ммоль) этилбромид, время кипячения — 6 ч.

**Основание I.** К 10 г (56 экв) Iгх прибавляли 30 мл 70 % этилового спирта и размешивали до растворения. Отдельно готовили раствор 0,32 – 3,15 г (5,6 – 56 ммоль) гидроксида калия в 15 мл 70 % этилового спирта. К раствору Iгх добавляли раствор гидроксида калия и перемешивали. Выпавший осадок хлорида калия отфильтровывали, а маточник с основанием I упаривали под вакуумом при температуре 50 °С (температуру выше поднимать не рекомендуется из-за возможности гидролиза основания I остатками воды). Далее сушили при температуре 50 °С в вакууме в течение 1 сут.

**Бензильные производные I (Iбенз.гх).** В колбу помещали 8 г основания I, далее прибавляли 20 мл ДМСО и перемешивали до растворения всего I. Далее прибавляли 0,71 – 7,12 г (5,6 – 56 ммоль) хлористого бензила и выдерживали 4 ч на водяной бане при температуре 60 °С. Когда температура реакционной смеси снижалась до комнатной, прибавляли 60 мл ацетона, отстаивали 1 ч и декантировали жидкость с осадка. Осадок растворяли в 15 мл 70 % этилового спирта и пересаждали 60 мл ацетона. Сушили в вакууме при 80 °С в течение 5 ч. Значения соотношения реагентов приведены в табл. 2. Растворимость производных в воде определяли по ОФС “Растворимость” ГФ XIII.

#### Экспериментальная биологическая часть

Антибактериальную активность бензильных производных изучали методом серийных разведений в мясопептонном бульоне (МПБ) на тест-микроорганизме *M. smegmatis* штамм АТСС 607. Из растворов производных I (5 мг на 1 мл очищенной воды) готовили последовательные двукратные разведения в МПБ в объеме 2 мл. В приготовленные разбавления вносили суспензию тест-микроорганизма в изотоническом растворе с концентрацией  $3 \cdot 10^7$  микробных клеток на 1 мл среды, одновременно готовили контрольный посев, не содержащий какого-либо антибактериального средства. Посевы инкубировали при  $(37 \pm 2)$  °С в течение 48 ч. По истечении срока инкубации проводили подсчет концентрации микробных клеток методом турбидиметрии. За значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) принимали минимальную концентрацию образца, при которой происходило уменьшение концентрации клеток на 25 % по сравнению с контрольным посевом. Описанный выше эксперимент воспроизводили 3 раза, полученные результаты МПК для производных I были практически одинаковы во всех повторениях, усредненные значения приведены в табл. 3.

Биологические испытания образца Iбенз.гх 0,9 не были проведены из-за очень низкой растворимости в воде. Этильные производные I с увеличением степени алкилирования теряют антибактериальную активность в отношении *M. smegmatis* штамм АТСС 607 (увеличивается МПК). Антибактериальная активность

додецильного производного I в отношении *M. smegmatis* штамм АТСС 607 почти не изменилась по сравнению с Iгх из-за малой степени алкилирования. Зависимость антибактериальной активности бензильных производных от степени алкилирования представлена на (рис. 2).

Данная зависимость имеет минимум МПК, соответствующий степени алкилирования (бензилирования) I — 0,2, при дальнейшем возрастании степени алкилирования I активность производных сильно снижается. Следует отметить, что гх бензильного производного I со степенью замещения 0,2 в 2 раза активнее Iгх в отношении тест микроорганизма *M. smegmatis* штамм АТСС 607.

Таким образом, синтезированы этильные, додецильные, бензильные производные разветвленного I и испытана их антибактериальная активность в отношении тест микроорганизма *M. smegmatis* штамм АТСС 607. Предварительно проведенные исследования алкилирования I показали, что алкилгалогениды (октилбромид, додецилхлорид, цетилхлорид) практически не алкилируют I ввиду своей малой реакционной способности [10]. Активированные алкилгалогениды (бензилхлорид, производные хлоруксусной кислоты) достаточно легко алкилируют основание I. Так как бензилхлорид легче реагировал с I, чем производные хлоруксусной кислоты, именно он был выбран для дальнейшей химической модификации I. Проведенные микробиологические испытания показали, что бензильные производные I со степенью замещения 0,2 обладают повышенной активностью против микобактерий по сравнению с Iгх, при дальнейшем увеличении степени замещения активность постепенно снижается.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, государственный контракт от 17 марта 2014 г. № 14, N08,12,0026.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. И. И. Воинцева, П. А. Гембицкий, *Полигуанидины — дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композитные материалы*, ЛКМ-пресс, Москва (2009).
2. Fact sheets on tuberculosis № 104, World health organisation, Geneva, Switzerland (2016), p. 7.
3. А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов, *Медицинская и санитарная микробиология*, Академия, Москва (2003).
4. С. А. Кедик, П. М. Исаякина, А. Д. Аскретков, А. В. Панов, *Приоритетные направления развития науки и технологий: тезисы докладов XVII международной научно-технической конференции*, Инновационные технологии, Тула (2015), сс. 46 – 48.
5. T. Pauloina, M. Dutota, J. Warneta, P. Rata, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**, 4 – 5 (2008).
6. М. И. Перельман, Н. М. Корякин, *Туберкулез: Учебник*, Медицина, Москва (1990).
7. Патент России 2142452; *РЖ Химия*, **117**, 137670х (2001).
8. Э. Преч, Ф. Бюльман, К. Афельтер, *Определение строения органических соединений*, Мир, Москва (2006).
9. С. А. Кедик, О. А. Бочарова, Ха Кам Ань и др., *Хим.-фарм. журн.*, **44**(10), 40 – 45 (2010); *Pharm.-Chem J.*, **44**(10), 568 – 573 (2010).

**CHEMICAL MODIFICATION OF OLIGO(HEXAMETHYLENE GUANIDINE):  
SYNTHESIS OF ALKYLATED DERIVATIVES AND ESTIMATION  
OF THEIR ACTIVITY AGAINST *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS***

S. A. Kedik, D. O. Shatalov\*, A. D. Askretkov, P. M. Isaikina, I. P. Sedishev,  
A. V. Panov, and A. S. Evseeva

Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, Moscow State University of Fine Chemical Technology (MITKhT),  
Moscow Technological University, Moscow, 119571 Russia

\* e-mail: shatalov d@mirea.ru

It is established that oligo(hexamethylene guanidine) (OHMG) reacts very slowly with inactivated alkyl halides having high molecular masses (e.g., dodecyl chloride), probably because of steric hindrances and low nucleophilicity of the guanidine fragment, so that these alkyl halides cannot be used to modify OHMG under conventional conditions. Ethylated derivatives of OHMG can be obtained much easier, but these derivatives exhibit strong scatter of the degree of substitution (for the same conditions and molar ratios of reactants). In addition, the antibacterial activity of these derivatives upon alkylation significantly decreases as compared to that of the initial OHMG hydrochloride. It is shown that benzyl chloride reacts readily with OHMG and the obtained derivatives possess a desired degree of substitution. Biological tests showed that the benzyl derivatives of OHMG with 0.2 degree of substitution possessed higher activity against mycobacteria as compared to that of OHMG hydrochloride, while a further increase in the degree of substitution leads to gradual decrease in the activity. Probably, the increase in activity is associated with an optimal increase in hydrophobicity of the OHMG molecule and/or with specific spatial structure of the oligomer. The rather high antibacterial activity against *Mycobacterium smegmatis* strain ATCC 607 shows good prospects for further work on obtaining alkylated OHMG derivatives and studying of their properties in order to find even more active antibacterial agents. The most obvious candidates can be carboxymethyl substituted OHMG derivatives.

**Keywords:** activity; alkyl derivatives; oligo(hexamethylene guanidine).