

БИОЦИДНЫЕ СОПОЛИМЕРЫ МЕТАКРИЛОИЛГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА С МЕТАКРИЛАМИДОМ И ДИАЛЛИЛДИМЕТИЛАММОНИЙ ХЛОРИДОМ

© 2021 г. Н. А. Сивов^{а,*}, Н. А. Клещева^а, И. Л. Валувев^а, Л. И. Валувев^а

^а Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
11999 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

*e-mail: sivov@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 16.04.2021 г.

После доработки 19.06.2021 г.

Принята к публикации 29.06.2021 г.

Реакцией радикальной полимеризации синтезированы сополимеры метакрилоилгуанидин гидрохлорида с метакриламидом и диаллилдиметиламмоний хлоридом. Определены константы сополимеризации этих мономеров и изучена зависимость биоцидной активности сополимеров от строения цепи макромолекул. Показано, что определяющим в проявлении биоцидной активности является не только состав сополимера, но и характер распределения звеньев метакрилоилгуанидин гидрохлорида по цепи макромолекулы.

DOI: 10.31857/S2308113921050132

В последние годы все большее внимание уделяют синтетическим полиэлектролитам на базе гуанидинсодержащих акрилатных мономеров [1–4]. Интерес к таким полимерам обусловлен в первую очередь тем, что это одни из немногих полимеров, обладающих собственной биологической активностью, что позволяет использовать их в качестве эффективных и безопасных биоцидных и дезинфицирующих средств, флокулянтов, а также композиционных материалов, поверхность которых проявляет бактерицидную и фунгицидную активность [1, 2, 5–9]. В силу особенностей строения гуанидиновой группы ее комплексообразующие свойства, а, следовательно, и биологическая активность, в значительной степени должна определяться полимерным окружением [1, 10–14]. В связи с этим актуальным остается вопрос о взаимосвязи между биоцидной активностью сополимеров и строением полимерной цепи.

Цель настоящей работы – синтез новых гуанидинсодержащих сополимеров метакрилоилгуанидин гидрохлорида (МГГХ) с двумя различающимися по активности в реакции радикальной сополимеризации мономерами: метакриламидом и диаллилдиметиламмоний хлоридом (ДАДМАХ) и изучение зависимости биоцидной активности синтезированных сополимеров от их состава и строения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали метилметакрилат, метакриламид, диаллилдиметиламмоний хлорид, гуанидингидрохлорид, дейтерорастворители, μ -пероксо-*бис*-(тетраоксосульфат) аммония (ПСА) (все фирмы “Aldrich”, США).

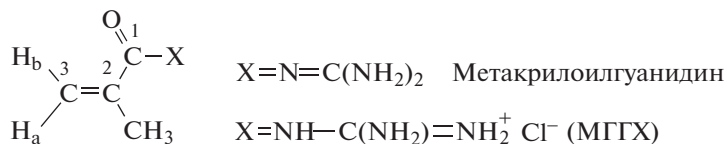
Синтез метакрилоилгуанидина и МГГХ проводили по ранее разработанным нами методикам [15] реакцией гуанидина с метилметакрилатом в ацетоне и последующим взаимодействием образующегося метакрилоилгуанидина с соляной кислотой.

Метакрилоилгуанидин

Получение гуанидина. В полученный раствор метилата натрия (21.6 г, 0.4 моля в 200 мл метанола) в трехгорлую колбу (объемом 0.5 л) при перемешивании порциями добавляли эквимольное количество (38.0 г, 0.4 моля) гуанидингидрохлорида. Реакционный раствор перемешивали в течение 4 ч и оставляли в холодильнике на ночь. На следующий день раствор гуанидина отфильтровывали от выпавшего осадка хлорида натрия, метанол отгоняли на роторном испарителе, остаток сушили в вакуумном шкафу для получения твердого гуанидина.

Получение метакрилоилгуанидина. К полученному накануне гуанидину в колбе, снабженной мешалкой, термометром, капельной воронкой,

Таблица 1. Характеристики спектров ЯМР ¹H мономеров



Соединение	Растворитель	Химические сдвиги δ, м.д.			
		CH ₃	³ H _a	³ H _b	NH
Метакрилоилгуанидин	DMCO-d ₆	1.83	5.24	5.93	6.62/7.78
	D ₂ O	1.89	5.45	5.83	—
МГГХ	DMCO-d ₆	1.92	5.86	6.34	8.52/8.72/11.72
	D ₂ O	2.05	5.92	6.09	—

добавляли в качестве растворителя ацетон (300 мл) и прикапывали метилметакрилат. В процессе прикапывания метилметакрилата начал образовываться осадок (побочные циклические продукты – циклический аналог метакрилоилгуанидина). Раствор перемешивали определенное время при комнатной температуре. По окончании раствор отфильтровали от осадка, после удаления растворителя получали 37 г метакрилоилгуанидина (выход 70%).

Метакрилоилгуанидин гидрохлорид

МГГХ синтезировали прикапыванием раствора концентрированной соляной кислоты (30 мл, 0.3 моля) к раствору 37 г (0.3 моля) метакрилоилгуанидина в 300 мл ацетона при – 3°С в течение 0.5 ч, после чего перемешивали при комнатной температуре 2.5 ч. Выпавший осадок МГГХ отфильтровывали, промывали сухим ацетоном. Выход МГГХ 39 г (80%). Контроль над процессами проводили с использованием метода ЯМР-спектроскопии.

Спектральные характеристики синтезированных мономеров (табл. 1) полностью подтверждают структуру полученных мономеров (интегральные интенсивности соответствовали количеству протонов: метильная группа – 3Н, протоны при двойной связи – по 1Н, протоны, связанные с азотами в метакрилоилгуанидине – 4Н, аналогичные протоны в МГГХ – 4Н и амидный протон – 1Н [16]).

Реакцию сополимеризации МГГХ и ДАДМАХ, а также МГГХ и метакриламида проводили в воде в атмосфере аргона при 60°С, используя ПСА (5 × 10⁻³ моль/л) в качестве инициатора. Суммарная концентрация сомономеров составила 2 моль/л. Соотношение сомономеров менялось от 90 : 10 до 10 : 90. Время сополимеризации во всех опытах составляло 60 мин, чтобы конверсия не превышала 10–15%.

Реакционную смесь из водного раствора высаживали в ацетон, затем фильтровали и после этого образцы подвергали диализу относительно воды с целью освобождения от низкомолекулярных продуктов. Для диализа использовали мембраны Spectrapor Membrane MWCO 1000–50000. После удаления воды получившиеся сополимеры сушили в вакуумном шкафу над P₂O₅ при 40–60°С до постоянной массы. Образцы получившихся сополимеров анализировали.

Состав сополимеров МГГХ и метакриламида определяли по данным элементного анализа.

Расчет состава сополимеров по данным элементного анализа. По данным элементного анализа для расчета содержания сомономеров определяется параметр R, связывающий соотношение содержания азота и углерода в сополимере. При этом нами принимались во внимание следующие соображения – процентное содержание азота в сополимере складывается из долей каждого из сомономеров (уравнение (1)) и аналогично суммируется содержание углерода (уравнение (2)), при этом учитывается, что x – доля МГГХ в сополимере и (1 – x) – доля метакриламида в сополимере. Для сополимера МГГХ и метакриламида, растворимого, например, в воде, использование метода ЯМР-спектроскопии невозможно, поскольку сигналы протонов метильных и метиленовых групп разных сомономеров перекрываются.

$$N_{\text{сополимер}} = N_{\text{МГГХ}} \times x + N_{\text{ММА}} \times (1 - x) \quad (1)$$

$$C_{\text{сополимер}} = C_{\text{МГГХ}} \times x + C_{\text{ММА}} \times (1 - x), \quad (2)$$

где N_{МГГХ} и C_{МГГХ} – содержание азота и углерода в МГГХ, N_{ММА} и C_{ММА} – содержание азота и углерода в метакриламиде.

После этого подставляем в пропорцию для параметра R значения N_{сополимер} и C_{сополимер} из уравнений (1) и (2), и, получаем выражения для расчета весовой доли МГГХ в сополимере МГГХ и метакриламида:

$$x = \frac{55.79R_{ЭА} - 16.27}{19.08R_{ЭА} + 9.41} \quad (3)$$

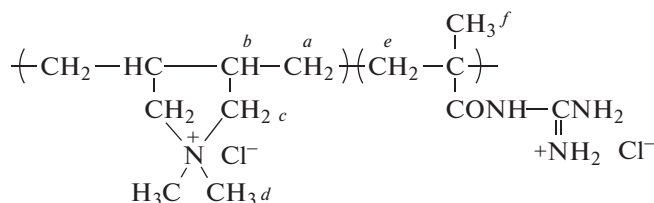
Подставляя значения R , рассчитанное по данным элементного анализа, получаем весовой состав сополимеров МГГХ и метакриламида. Однако, чтобы правильно подсчитать, например, константы сополимеризации данных сомономеров, следует перевести соотношения из весовых про-

центов в мольные проценты (или мольные доли), учитывая молекулярную массу сомономеров.

По аналогичной схеме можно вывести уравнение для сополимера МГГХ (x) и ДАДМАХ ($1 - x$):

$$x = \frac{59.43R_{ЭА} - 8.66}{22.72R_{ЭА} + 17.02} \quad (4)$$

Расчет состава сополимеров МГГХ и ДАДМАХ по данным ЯМР. Для сополимеров МГГХ и ДАДМАХ использовали метод ЯМР ^1H .



Реперным сигналом может служить интеграл сигналов десяти протонов сомономера ДАДМАХ, связанных с соседними с азотом углеродными атомами, проявляющиеся в области 3.0–4.3 м.д. (протоны c и d). По приведенной ниже формуле можно рассчитать мольную долю сомономера ДАДМАХ.

$$I_{\text{ДАДМАХ}} = \frac{[\Sigma I (10 \text{ протонов}) "H_{\text{ДАДМАХ}}"]}{10} \quad (5)$$

Интегральные интенсивности сигналов, проявляющихся в сильном поле 1.0–3.0 м.д. соответствуют 4 протонам групп CH_2 (a) и 2 протонам групп CH (b) диаллильного сомономера ДАДМАХ и 5 протонам CH_2 (e) и CH_3 (f) в случае МГГХ. Следовательно, по уравнению (6) мы можем определить мольную долю МГГХ – $I_{\text{МГГХ}}$:

$$I_{\text{МГГХ}} = \frac{[\Sigma I_{\text{МГГХ}} + N_{\text{ДАДМАХ}}] - (I_{\text{ДАДМАХ}} \times 6)}{5} \quad (6)$$

где $\Sigma I (10 \text{ протонов}) N_{\text{ДАДМАХ}}$ – интеграл 10 протонов групп CH_2 и CH , связанных с атомом азота,

$\Sigma I_{\text{МГГХ}} + N_{\text{ДАДМАХ}}$ – сумма интегралов 5 протонов сомономера МГГХ и 6 протонов сомономера ДАДМАХ.

Исходя из полученных величин мольных долей (уравнения (5) и (6)), можно рассчитать содержание сомономеров в сополимере в мольных процентах или долях.

Элементный анализ проводили методом пиролической хроматографии на CHNS-анализаторе “Flash 2000 (Thermo Scientific)” (США); газ-носитель гелий, образец 1–4 мг, сжигание при 2000°C.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре “Bruker DRX–500” (500.13 МГц для ^1H и 125.76 МГц для ^{13}C) в D_2O и DMCO-d_6 при 25°C.

Спектры ЯМР ^1H сополимеров измеряли также на спектрометре “Bruker MDS–300” (300 МГц) в D_2O при 20°C, химические сдвиги определяли относительно остаточных протонов растворителя.

Методики биоцидных испытаний приведены в работе [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения зависимости биоцидных свойств гуанидинсодержащих полимеров от состава и строения полимерной цепи в работе были синтезированы сополимеры МГГХ с двумя различающимися по активности в радикальной полимеризации мономерами – ДАДМАХ и метакриламидом. Сополимеризацию проводили при суммарной концентрации сомономеров 2 моль/л под действием ПСА (5×10^{-3} моль/л) в воде при 60°C до конверсии 10–15%. В табл. 2 приведены зависимости содержания звеньев МГГХ в синтезированных сополимерах от состава исходной мономерной смеси.

Видно, что во всем интервале составов сополимер с ДАДМАХ обогащен звеньями более активного МГГХ. Константы сополимеризации для этой мономерной пары, определенные по методу Майо–Льюиса, равны r_1 (МГГХ) = 2.7 ± 0.6 и r_2 (ДАДМАХ) = 0.6 ± 0.1 .

Иная картина наблюдается для пары МГГХ с метакриламидом. В этом случае сополимер обогащается звеньями метакриламида. Константы сополимеризации для этой пары составляют r_1 = 0.8 ± 0.1 (МГГХ) и r_2 = 1.4 ± 0.4 (метакриламид).

Синтезированные сополимеры различаются характером распределения мономерных звеньев по цепи (табл. 2). Средняя длина последовательностей звеньев МГГХ в сополимерах МГГХ и

Таблица 2. Зависимость составов сополимеров и средней длины последовательности звеньев МГГХ в сополимере с ДАДМАХ и в сополимере с метакриламидом от состава исходной мономерной смеси

МГГХ в исходной смеси, мол. %	МГГХ в сополимере с ДАДМАХ, мол. %	Средняя длина последовательности звеньев МГГХ в сополимере с ДАДМАХ (± 0.2)	МГГХ в сополимере с метакриламидом, мол. %	Средняя длина последовательности звеньев МГГХ в сополимере с метакриламидом (± 0.2)
20	31	1.7	16	1.2
40	58	2.7	36	1.5
50	69	3.7	43	1.8
60	76	5.0	57	2.2
80	91	11.1	77	4.2

Таблица 3. Данные по бактерицидности сополимерных производных МГГХ, метакрилоилгуанидина и ДАДМАХ и ряда других полимерных соединений

Соединение	$M_1 : M_2^*$	E. coli	St. aureus	МПК**
МГГХ–ДАДМАХ	67 : 33	+++	+++	21
	77 : 23	-++	+++	23
	93 : 7	-+	-++	24
МГГХ–метакрилоилгуанидин	38 : 62	-++	-++	46
	76 : 24	-++	-++	42
	92 : 8	-++	-++	39
ПолиМГГХ	100	-+	-++	58
ПГМГ ГХ	—	—	—	6

* Состав сополимеров по данным спектроскопии ЯМР 1H и элементного анализа, M_1 – МГГХ или метакрилат гуанидина, M_2 – метакриламид или ДАДМАХ. Escherichia coli – кишечная палочка, представитель грамотрицательных бактерий и Staphylococcus Aureus 906 – золотистый стафилококк, представитель грамположительных бактерий; (+++) – сплошной лизис бактериальных клеток, полностью задерживает рост данного штамма, (-++) – частичный лизис клеток, наблюдаются зоны подавления роста через 48 ч (-+) – частичный лизис клеток, наблюдаются зоны подавления роста через 72 ч.

**Минимальная подавляющая концентрация в мкг/мл по отношению Staphylococcus Aureus 906.

ДАДМАХ в зависимости от состава сополимера изменялась от 2 до 11 звеньев, а сополимера МГГХ и метакриламида – от 1 до 4.

Исследования бактерицидной активности синтезированных сополимеров показали, что все сополимеры весьма активны и обладают биоцидным действием по отношению к грамположительным (St. Aureus) и грамотрицательным (E. coli) микроорганизмам (табл. 3).

Видно, что большую бактерицидную активность проявляют сополимеры МГГХ с ДАДМАХ, причем определяющим в проявлении активности является не только содержание МГГХ в сополимере, но и характер распределения его звеньев по цепи, а также необходимость разделения блоков МГГХ звеньями второго сомомера – гомополимеры МГГХ имеют невысокую бактерицидную активность (предпоследняя строка табл. 3).

Большая бактерицидная активность в отношении тестируемых микроорганизмов характерна для сополимеров МГГХ и ДАДМАХ (67 : 33 и 77 : 23).

Сополимер МГГХ и метакриламида (38 : 62) проявляет выраженный бактерицидный эффект в отношении грамположительной культуры золотистого стафилококка. Похожий эффект наблюдается и для сополимера МГГХ и ДАДМАХ (93 : 7). Полученные значения активности для синтезированных сополимеров близки к результатам измерения активности сополимеров метакрилат гуанидина и ДАДМАХ схожего сомономерного состава [1, 14]. Если сравнивать с известным биоцидным соединением полигексаметиленгуанидин гидрохлоридом (ПГМГ ГХ) [7], то его активность оказалась значительно выше (последняя строка табл. 3). При этом следует отметить, что данный полимер, получаемый поликонденсацией, имеет невысокую молекулярную массу и фактически является сополимером, что важно.

По имеющимся к настоящему времени данным механизм биоцидного действия катионных полимерных биоцидных веществ, и, в частности, гуанидинсодержащих, подробно рассмотрен в ра-

ботах [7, 13]. Поскольку микроорганизмы обычно обладают отрицательным суммарным электрическим зарядом, они субстантивны к катиону бактерицидного препарата, который, соприкасаясь с микроорганизмом, адсорбируется на клеточной мембране, вызывает ее лизис и проникает внутрь клетки, перемещая туда же присоединенные вещества или полимерные звенья, отвечающие за усиление биоцидной активности. В своей совокупности этот комплекс воздействий препарата приводит к гибели микроорганизма. Следовательно, сополимеры МГГХ и ДАДМАХ проявляют большую антибактериальную активность, чем сополимеры МГГХ и метакриламида, которые имеют меньший заряд цепи.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что определяющим в проявлении биоцидной активности сополимерами МГГХ является характер распределения звеньев МГГХ по цепи, необходимость разделения последовательности звеньев МГГХ звеньями другого мономера, а также плотность заряда на цепи сополимеров. В связи с этим стратегия создания сополимеров с высокой биоцидной активностью должна включать сополимеризацию МГГХ с другими заряженными сомономерами.

Авторы выражают благодарность М.В. Журиной (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского) за помощь в проведении изучения биоцидной активности сополимеров.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sivov N.A.* Biocide Guanidine Containing Polymers: Synthesis, Structure and Properties. Leiden, the Netherlands: Brill Acad. Publ., 2006.
2. *Sivov N.A., Martynenko A.I., Popova N.I.* Handbook of Condensed Phase Chemistry. New York: Nova Science Publ. Inc., 2011. P. 287. Ch. 27–32.
3. *Мартыненко А.И., Хаширова С.Ю., Малкандуев Ю.А., Сивов Н.А.* Гунидинсодержащие мономеры и полимеры: синтез, структура и свойства. Нальчик: Изд-во М. и В. Котляровых, 2008.
4. *Сивов Н.А.* Азотсодержащие соединения. Синтез, структура, свойства, биологическая активность. Saarbrücken, Deutschland: LAP Lambert Acad. Pub., 2014.
5. *Меняшев М.Р., Сивов Н.А., Мартыненко А.И., Герасин В.А.* // 26 Симпозиум по реологии. Программа и тезисы. Тверь: Изд-во ИНХС РАН им. А.В. Топчиева. 2012. С. 103.
6. *Frommeyer M., Bergander K., Steinbuechel A.* // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. № 8. P. 2381.
7. *Воицьева И.И., Гембицкий П.А.* Полигуанидины – дезинфицирующие средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс. 2009.
8. *Duhwan Lee, Yeong Mi Lee, Cherlhyun Jeong, Jun Lee, Won Jong Kim* // Chem. Med. Chem. 2014. V. 9. P. 2718.
9. *Menyashev M.R., Gerasin V.A., Guseva M.A., Merekalova N.D., Martynenko A.I., Sivov N.A.* // Polymer Science B. 2016. V. 58. № 2. P. 226.
10. *Платэ Н.А., Васильев А.Е.* Физиологически активные полимеры. М., Химия. 1986.
11. *Сивов Н.А., Мартыненко А.И., Бондаренко Г.Н., Филатова М.П., Кабанова Е.Ю., Попова Н.И., Сивов А.Н., Крутько Е.Б.* // Нефтехимия. 2006. Т. 46. № 1. С. 44.
12. *Martynenko A.I., Popova N.I., Kabanova E.Yu., Lachinov M.B., Sivov N.A.* // Polymer Science A. 2008. V. 50. № 7. P. 771.
13. *Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф.* Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ, 1993.
14. *Малкандуев Ю.А., Хаширова С.Ю., Сарбашева А.И., Байдаева М.Х., Мартыненко А.И., Попова Н.И., Сивов Н.А., Балаева С.М.* // Изв. вузов. Северо-кавказский регион. 2012. № 2. С. 71.
15. *Жанситов А.А., Мартыненко А.И., Попова Н.И., Сивов Н.А.* // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2012. Т. 55. № 9. С. 46.
16. *Menyashev M.R., Martynenko A.I., Popova N.I., Kleshcheva N.A., Sivov N.A.* // Polymer Science B. 2016. V. 58. № 5. P. 556.