

УДК. 547.458.83

DOI: 10.15372/KhUR20170204

Синтез и исследование антимикробной активности сульфаминовых производных пектина

О. Р. АХМЕДОВ¹, Ш. А. ШОМУРАТОВ¹, А. С. ТУРАЕВ¹, А. ВАИЛИ^{2,3}¹Институт биоорганической химии им. А. С. Садыкова АН РУз,
Ташкент, Узбекистан

E-mail: info@biochem.uz

²Синьцзянский технический институт физики и химии,
Синьцзян, Китай³Университет Академии Наук Китая,
Пекин, Китай

(Поступила 17.11.15; после доработки 20.05.16)

Аннотация

Получение новых производных полисахаридов, обладающих биологической активностью, а именно антимикробными свойствами, остается приоритетной задачей не только в химии высокомолекулярных соединений, но и в фармацевтике и медицине. Некоторые антимикробные соединения, полученные на основе природных полимеров, по некоторым критериям превосходят синтетические противомикробные соединения низкомолекулярной природы.

В настоящей работе взаимодействием сульфаминовой кислоты с альдегидными группами полисахарида получены новые водорастворимые производные пектина, содержащие в структуре сульфаминовые группы. Структура и состав полученных соединений изучены методами ИК-спектроскопии, элементного (азот, сера) и рентгеноструктурного анализа. Путем изменения концентрации сульфаминовой кислоты в отношении диальдегид-производных пектина получены сульфаминовые производные пектина с различным содержанием сульфаминовых групп. Определены оптимальное соотношение реагирующих компонентов $-CHO/NH_2SO_3H$ (1.0 : 2.5) и время проведения реакции (45 мин). Приведены результаты исследований антимикробного действия синтезированных сульфаминовых производных пектина. Биологическая активность полученных соединений исследована дискодиффузионным методом в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Установлена прямая зависимость антимикробной активности исследованных препаратов от количественного содержания сульфаминовых групп в пектине. Определено, что сульфаминовые производные пектина со степенью замещения, равной 35.0, при концентрации 50 мкг/мл обладают антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. С уменьшением количества сульфаминовых групп в пектине антимикробное действие слабеет. По результатам исследований острой токсичности сульфаминовые производные пектина можно отнести к V классу – практически нетоксичные вещества.

Ключевые слова: полисахариды, пектин, сульфаминовая кислота, периодатное окисление, антимикробная активность

ВВЕДЕНИЕ

В химии высокомолекулярных соединений большое развитие получили исследования, посвященные синтезу производных полисахаридов с антимикробной активностью. Известно,

что путем введения в структуру полисахаридов различных функциональных групп (SO_3^- , COO^-), ионов металлов (Ag^+ , Hg^+ , Cu^+) или бактерицидных веществ можно получить соединения с антимикробной активностью [1–4].

Окисленные полисахариды, содержащие альдегидные группы, могут использоваться для получения новых антимикробных соединений, поскольку они вступают в реакцию конденсации с веществами структуры $\text{NH}_2\text{-R}$. Таким путем на основе диальдегидполисахаридов, после введения в структуру полимера различных антимикробных препаратов или низкомолекулярных веществ получен ряд соединений с антибактериальной активностью [5–8].

В настоящей работе для синтеза новых антимикробных соединений нами использован диальдегид цитрусового пектина, полученный избирательным окислением с помощью периодата натрия. В качестве нуклеофильного реагента выбрана сульфаминовая кислота ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$), содержащая первичную аминогруппу и входящая в состав дезинфицирующих средств.

Производные пектина, содержащие сульфаминовые группы, получены по следующей схеме, приведенной на рис. 1.

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

Состав полученных сульфаминовых производных пектина изучали по содержанию серы и азота. Содержание серы определяли на элементном анализаторе EA 1108 фирмы Carlo Erba (Италия), количество азота – по методу Кьельдаля [9]. Степень замещения сульфа-

миновых производных пектина определяли по содержанию азота [10]. Антимикробную активность сульфаминовых производных изучали в условиях *in vitro* дискодиффузионным методом [11], токсичность исследована по методу К. В. Прозорского.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Периодатное окисление пектина

Цитрусовый пектин в количестве 3 г растворили в 50 мл воды, добавили 100 мл ацетатного буферного раствора с pH 4.3 и перемешали в течение 2 ч. Далее к раствору при 25°C добавили 127 мл раствора 0.1 M NaIO_4 при молярном соотношении компонентов пектин/ $\text{NaIO}_4 = 1.0 : 1.5$ [12, 13]. Реакции проводили в течение 1–3 ч. Продукты реакций осаждали ацетоном. Осадки промывали 75 % этанолом до отрицательной реакции на ионы IO_4^- и IO_3^- (контроль по йодкрахмальной бумаге). Содержание альдегидных групп определили йодометрическим методом. Продукты реакций сушили в темноте под вакуумом над P_2O_5 . Полученные образцы имели степень окисления 20–42 %.

Конденсация сульфаминовой кислоты с диальдегидом пектина

К раствору сульфаминовой кислоты 0.01–0.04 моль (0.97–3.88 г) при температуре 25°C добавили 0.01 моль (1.74 г) диальдегида пек-

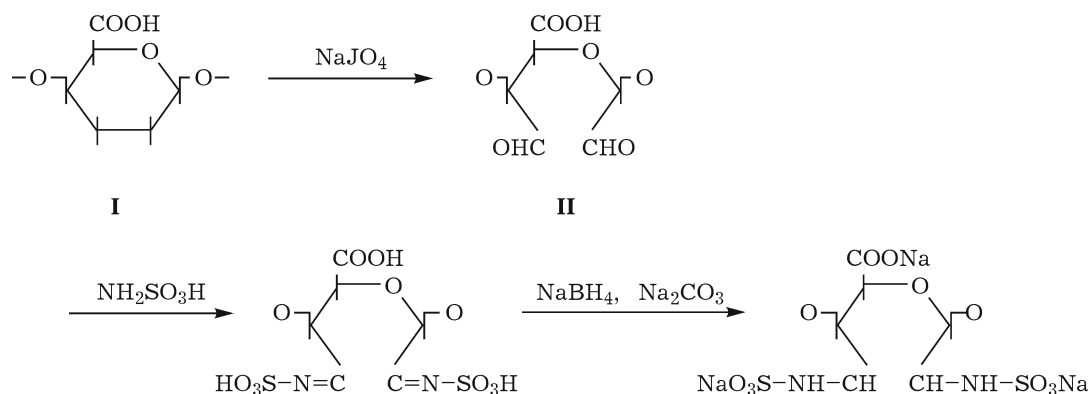


Рис. 1. Схема синтеза сульфаминовых производных пектина.

тина (ДАП) со степенью окисления 20–42 %, из расчета 1 моль диальдегидных звеньев на 1.0–4.0 моль $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$, перемешивали в течение 2 ч.

Реакция восстановления азометиновой связи

В реакционную смесь, содержащую продукт **III**, по каплям добавляли 10 % раствор Na_2CO_3 и доводили pH до 8.0–8.5. Далее 0.004–0.01 моль (0.16–0.35 г) NaBH_4 растворяли в необходимом объеме раствора 0.1 н Na_2CO_3 и медленно добавляли в реакционную смесь (боргидрид натрия брали в двукратном избытке по отношению к количеству альдегидных групп пектина). Реакция восстановления связи $\text{C}=\text{N}$ продолжалась 3 ч. Продукты реакции осаждали и промывали ацетоном. Образовавшиеся осадки растворяли в воде, очищали от примесей методом диализа в течение 18 ч и высушивали лиофилизацией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных рис. 1 видно, что после реакции конденсации $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ с альдегидными группами пектина формируется связь $\text{C}=\text{N}$. В составе ИК-спектра соединения **III** имеются полосы поглощения в областях, cm^{-1} : 3475 ($-\text{OH}$), 1747 ($-\text{CHO}$), 1630 ($\text{C}=\text{N}$), 1242 (SO_2), 803 (SO).

После восстановления азометиновой связи в ИК-спектре соединения **IV** появляется полоса поглощения в области 1570 cm^{-1} (NH), ис-

чезают полосы поглощения 1747 и 1630 cm^{-1} , характерные для группы $-\text{CHO}$ и связи $-\text{C}=\text{N}$.

Из данных табл. 1 видно, что с увеличением степени окисления пектина и соотношения $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ повышается степень замещения (СЗ) конечных продуктов. Увеличение концентрации сульфаминовой кислоты в реакционной среде до 2.5 моль приводит к увеличению содержания сульфаминовых групп в полисахариде. Дальнейшее увеличение концентрации $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ не влияет на изменение количества сульфаминовых групп. Судя по данным ИК-спектра и табл. 1, после взаимодействия окисленного пектина с сульфаминовой кислотой в структуре полисахарида присутствует группа $-\text{CHO}$ (соединение **III**), даже при соотношении ДАП/ $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ = 1.0 : 4.0. По-видимому, это обусловлено возникновением электростатического эффекта отталкивания одноименно заряженных групп сульфаминовой кислоты, что не позволяет ей полностью прореагировать с ДАП. Установлено, что взаимодействие ДАП с сульфаминовой кислотой протекает интенсивно в течение первого часа, практически полностью завершается за 45 мин и далее содержание сульфаминовой кислоты не изменяется.

Известно, что рентгенографический метод позволяет изучить физическую структуру (аморфное или кристаллическое состояние) полисахаридов и их производных. С этой целью исследована физическая структура синтезированных соединений. Установлено, что это аморфные вещества (рис. 2). Амор-

ТАБЛИЦА 1

Состав продуктов взаимодействия ДАП с сульфаминовой кислотой

Номер опыта	Степень окисления пектина, %	Соотношение ДАП/ $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$	Содержание, %		Степень замещения (СЗ)
			Азот	Сера	
1	20	1 : 1.0	1.1	1.2	7.0
2	23	1 : 2.0	2.4	2.7	16.0
3	23	1 : 2.5	3.2	3.6	20.0
4	30	1 : 1.5	2.8	3.2	19.0
5	33	1 : 2.0	3.6	4.1	25.0
6	34	1 : 2.5	4.3	4.8	30.0
7	34	1 : 3.0	4.8	5.5	31.0
8	38	1 : 4.0	4.8	5.5	34.0
9	42	1 : 4.0	5.1	5.8	35.0

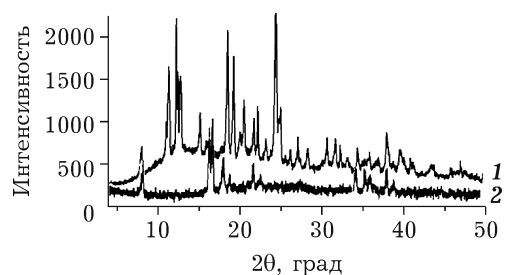


Рис. 2. Рентгенограммы пектина (I) и конечного продукта (IV).

физация пектина происходит в результате уменьшения количества групп $-OH$ и разрушения упорядоченных упаковок полисахарида в процессе периодатного окисления и реакции конденсации с NH_2SO_3H [14, 15]. Так, видно (см. рис. 2), что максимальный дифракционный пик у пектина наблюдается в областях 11–12.7, 18–19.5 и 24.8°, что, вероятно, связано с образованием меж- и внутримолекулярных водородных связей гидроксильных и карбоксильных групп пектина. На рентгенограмме продукта IV эти пики исчезают.

Антимикробную активность сульфаминовых производных пектина изучали в условиях *in vitro* методом бумажных дисков в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов. Для исследования выбраны образцы с СЗ = 20.0–35.0.

Антимикробную активность исследуемых соединений оценивали по диаметру зон задержки роста микроорганизмов. Диаметр зоны

менее 10 мм оценивали как отсутствие антимикробной активности, 10–15 мм – слабая активность, 15–20 мм – умеренно выраженная, свыше 20 мм – ярко выраженная активность.

Согласно данным табл. 2, антимикробная активность сульфаминовых производных пектина зависит от их СЗ. Так, соединение с СЗ = 35.0 при концентрации 50 мкг/мл обладает выраженной антимикробной активностью в отношении *Proteus vulgaris* и умеренно выраженной активностью в отношении *Streptococcus pyogenes*. В отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* и *Pseudomonas aeruginosa* антимикробная активность слабая.

Сульфаминовые производные с СЗ = 20.0 и 30.0 обладают слабой и умеренно выраженной антимикробной активностью в отношении *Proteus vulgaris*. В отношении других микробов сульфаминовые производные обладают слабой антимикробной активностью.

Исследование острой токсичности проведено по методу К. В. Прозорского на белых мышцах обоих полов (масса особи 18–21 г). Испытуемые препараты вводили внутривентрикулярно, однократно, специальным зондом в дозах 1000–8000 мг/мл. Результаты показали, что LD_{50} сульфаминовых производных пектина составляет 7000 мг/кг, что дает основание отнести их к V классу – практически нетоксичные вещества.

ТАБЛИЦА 2

Чувствительность микробов к производным пектина, содержащим сульфаминовые группы (СЗ = 20.0–35.0), в условиях *in vitro*

Микроорганизмы	Чувствительность, мм зоны задержки роста микробов		
	СЗ = 20.0	СЗ = 30.0	СЗ = 35.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.0±0.1	10.0±0.2	12.0±0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9.0±0.1	10.0±0.1	12.0±0.1
<i>Escherichia coli</i> (лактозопозитивная)	8.0±0.1	10.0±0.1	10.0±0.2
<i>Escherichia coli</i> (лактозонегативная)	10.0±0.2	11.0±0.1	
<i>Proteus vulgaris</i>	13.0±0.1	16.0±0.1	20.0±0.2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	11.0±0.1	15.0±0.2	16.0±0.1
<i>Streptococcus faecalis</i>	10.0±0.1	11.0±0.1	12.0±0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.0±0.1	10.0±0.1	12.0±0.2

Примечание. Концентрация препаратов 50 мкг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Взаимодействием сульфаминовой кислоты с ДАП получены производные пектина, содержащие сульфаминовые группы. С привлечением ИК-спектроскопии, элементного и рентгеноструктурного анализа и антимикробных исследований определены состав, структура и эффективность бактерицидного действия полученных образцов. Установлено, что сульфаминовые производные пектина обладают антимикробной активностью и относятся к V классу – практически нетоксичные вещества.

В данный момент исследуются антикоагулянтные свойства полученных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Вирник А. Д. // Усп. химии. 1973. Т. 42. С. 547–565.
- 2 Хомяков К. П., Вирник А. Д., Ушаков С. Н., Роговин З. А. // Высокомолекулярные соединения. 1965. Т. 7, № 6. С. 1035–1039.
- 3 Krichen F., Karoud W., Sila A., Ghorbel R., Ellouz-Chaabouni S. // Int. J. of Biol. Macromol. 2015. Vol.75 P. 283–289.
- 4 Снежко В. А., Комар В. П., Хомяков К. П., Вирник А. Д., Жбанков Р. Г., Розенберг Г. Я., Роговин З. А. // Высокомолекулярные соединения. 1974. Т. 16 (А), № 10. С. 2233–2238.
- 5 Liu K., Xu Ya., Lin X., Chen L. // Carbohydr. Polym. 2014. Vol. 110. P. 382–387.
- 6 Abdullah F., Kumar S., Basu S., Mukherjee A. // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 134. P. 30–37.
- 7 Шомуратов Ш. А., Муродов Э. А., Тураев. А. С. // Химия раст. сырья. 2006. № 2. С. 25–28.
- 8 Ахмедов. О. Р., Шомуратов Ш. А., Тураев. А. С. // Узбекский хим. журнал. 2015. № 3. С. 47–51.
- 9 Цитович И. К. Курс аналитической химии. М.: Высш. шк., 1977. С. 346.
- 10 Wen D., Ping Z., Rong Li. // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 110. P. 802–807.
- 11 Воробьев А. А., Кривошеин А. И., Ширококов В. П. Медицинская и санитарная микробиология. М.: Academia, 2003. С. 44.
- 12 Li H., Wu B., Mu Ch., Lin W. // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 84. P. 881–886.
- 13 Ахмедов О. Р., Шомуратов Ш. А., Тураев А. С. // Узбекский хим. журн. 2013. № 1. С. 30–33.
- 14 Yu J., Chang R., Ma X. // Carbohydr. Polym. 2010. Vol.79. P. 296–300.
- 15 Gong H., Liu M., Chen J., Han F., Gao Ch., Zhang B. // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 88. P. 1015–1022.

