



УДК 547.34:541.64:536.7+579.0+579.6

## Оценка антибактериальной активности некоторых представителей нового семейства фосфор-азотсодержащих ионенов

В. Л. Михайленко<sup>1</sup>, С. И. Верхотурова<sup>2</sup>, О. Ф. Вятчина<sup>1</sup>, М. А. Козик<sup>1</sup>,  
В. Н. Кижняев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

<sup>2</sup>Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Иркутск  
E-mail: [mival63@gmail.com](mailto:mival63@gmail.com)

**Аннотация.** Создание антибактериальных и противовирусных препаратов при использовании полиэлектролитов природного или синтетического происхождения в настоящее время активно развивается. При помощи поликатионов, содержащих в основной цепи атомы азота и фосфора, могут осуществляться интерполимерные взаимодействия с клеточными мембранами или другими биополимерами. Изучение антибактериальной активности впервые синтезированных фосфор-азотсодержащих ионенов проведено по отношению к *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* и показано, что наблюдается подавление роста микроорганизмов при концентрации ионенов 0,01–0,1%. Синтез новых представителей этого класса ионенов реализован реакцией поликонденсации бис[2-(4-пиридил)этил]фенилэтил- и бис[2-(4-пиридил)этил](2-цианоэтил)фосфиноксидов с 1,4-дигалогенбутанами. Получены растворимые в воде ионены линейного строения, содержащие фенилэтильную и фармакофорную 2-цианоэтильную группу. Показано, что природа галогенид-иона влияет на проявление микробиоцидных свойств синтезированных ионенов. Ионен, имеющий в своем составе иодид-анион обладает антибактериальной активностью по отношению к обоим штаммам. При этом условно-патогенная бактерия *S. aureus* оказалась более чувствительной к действию этого полимера, чем *E. coli*.

**Ключевые слова:** антибактериальная активность, фосфор-азотсодержащие ионены, поликонденсация, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

### Введение

Возможность применения заряженных полимеров природного или синтетического происхождения для создания антибактериальных или антивирусных препаратов в последнее время вызывает активный интерес исследователей [3; 11]. Известно, например, что при взаимодействии ионенов (полиамины, содержащие четвертичные аммониевые группы) с отрицательно заряженными участками клеточных мембран и биополимеров (белки, липиды, нуклеиновые кислоты, полисахариды) могут осуществляться сшивки или другие полиэлектролитные взаимодействия, вызывающие снижение функциональной активности клеток [1; 2; 8]. В этом плане перспективны поликатионы, содержащие в основной цепи атомы азота и фосфора, хотя их фармакологическая активность изучена пока недостаточно. Сообщалось [4;

6], что синтезированные на основе *бис*-пиридилфосфиноксидов, полученных по реакции Трофимова – Гусаровой [5; 7; 9; 12], фосфор-азотсодержащие ионены способны образовывать нерастворимые в воде стехиометрические полиэлектролитные комплексы с полианионами синтетического (полиакриловая кислота) и природного (гепарин) происхождения. Физиологическая активность ионенов зависит от плотности распределения положительного заряда четвертичного азота, на которую в свою очередь влияет структура полимерной цепи [1; 2].

Цель настоящей работы – изучение антибактериальной активности впервые синтезированных фосфор-азотсодержащих ионенов различной макромолекулярной структуры и топологии.

### ***Материалы и методы***

В качестве исходных мономеров для получения фосфор-азотсодержащих ионенов послужили *бис*-пиридины с различными мостиковыми фрагментами, относительно легко получаемыми по реакции Трофимова – Гусаровой из элементного фосфора (преимущественно из нетоксичного и дешёвого красного фосфора) и электрофилов в присутствии сверхсильных оснований [5; 7; 9; 12].

На первой стадии синтеза ионенов из красного фосфора и 4-винилпиридина были получены бис[2-(4-пиридил)этил]фосфин и его оксид, который далее реагирует со стиролом в сверхосновной системе КОН-ДМСО (56–58 °С, 8 ч), образуя бис[2-(4-пиридил)этил]фенилэтилфосфиноксид **1** с выходом 52 %. Бис[2-(4-пиридил)этил]фосфин легко присоединяется к акрилонитрилу (ацетонитрил, 50%-ный водный NaOH, 45 °С, 7 ч), давая в присутствии кислорода воздуха неизвестный ранее бис[2-(4-пиридил)этил](2-цианоэтил)фосфиноксид **2** с выходом 50 %.

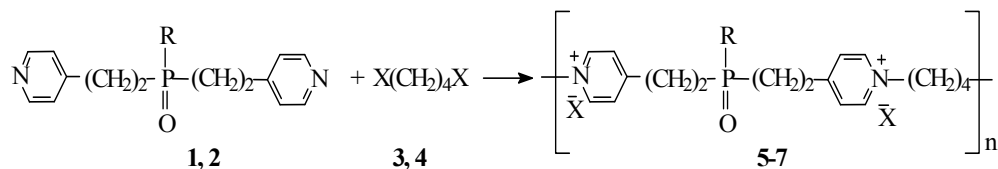
Исследованные в настоящей работе ионены были синтезированы посредством реакции поликонденсации *бис*-пиридинов **1** и **2** с 1,4-дигалогенбутанами. Вязкость целевых ионенов определяли в 0,4М водном растворе KBr с использованием вискозиметра Уббелюде при 25 °С. Молекулярная масса (ММ) ионенов оценена на основании характеристической вязкости водно-солевых растворов ионенов.

В качестве тест-культур использовали штаммы *Escherichia coli* ATCC 35218 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, предоставленные В. А. Чхенкели (ИрГАУ им. А. А. Ежевского, Иркутск).

Антибактериальную активность ионенов определяли по подавлению роста тест-культур. Для этого готовили рыбо-пептонный агар (РПА) в пробирках и стерилизовали при давлении 1 атм. После стерилизации в пробирки с расплавленным РПА добавляли ионен в концентрации 0,1 и 0,01 %. Среду в пробирках закаливали, посев тест-культур (*E. coli* и *S. aureus*) проводили штрихом. Контролем служила среда РПА без добавления ионенов. Посевы культивировали в течение 7 сут. при температуре 30 °С, интенсивность роста оценивали визуально, сравнивая с контролем.

**Результаты и обсуждение**

Реакция поликонденсации с участием бис-пиридилфосфиноксидов **1, 2** и 1,4-дигалогенбутанов **3, 4** протекает при нагревании (60 °С, 24–48 ч) в среде органического растворителя (этанол) и приводит к формированию фосфор-азотсодержащих ионенов линейного строения **5–7**:

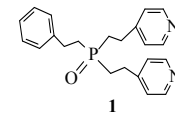
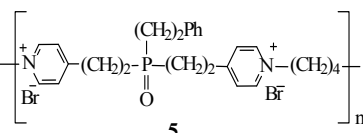
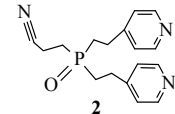
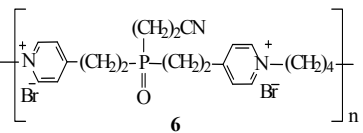
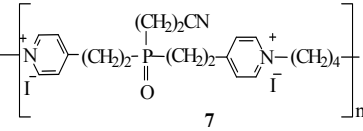


R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph (**1, 5**), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN (**2**); X = Br (**3, 5, 6**), I (**4, 7**)

Выход полученных соединений, а также их молекулярная масса и вязкость зависят от природы радикала R и галогена X. Все приведённые характеристики ионенов увеличиваются с уменьшением размеров заместителя и замене атома брома на атом йода (табл. 1).

Таблица 1

Схема синтеза и основные характеристики фосфор-азотсодержащих ионенов

№	Пиридил-фосфин-оксид <b>1, 2</b>	Дигалогенбутан <b>3, 4</b>	Ионен <b>5-7</b>	Выход, %	[η], дл/г	ММ
1		Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> Br <b>3</b>		51	0,07	5000
2		<b>3</b>		88	0,11	9500
3	<b>2</b>	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> I <b>4</b>		99	0,22	15 000

*Примечание* Реагенты и условия: пиридилфосфиноксид **1, 2** (0,6 ммоль), дигалогенбутан **3, 4** (0,6 ммоль), этанол (2 мл), 60 °С, 24 ч (ионены **5, 6**), 48 ч (ионен **7**).

Ионогенная природа продуктов поликонденсации обуславливает проявление ими водорастворимости и полиэлектролитных свойств. Водные растворы линейных ионенов обладают удельной электропроводностью в интервале (1÷3)×10<sup>-3</sup> см/см. Сопоставление характеристических вязкостей, измеренных в идентичных условиях, для фосфор-азотсодержащих ионенов и описанных в литературе ионенов с известной молекулярной массой позволило ориентировочно оценить молекулярные массы полученных в работе поликатионов. При этом наибольшее значение ММ, как и конверсия, отмечено при использовании в качестве галогенсодержащего мономера 1,4-дийодбутана.

Как отмечено выше, получаемые ионены склонны к реакциям поли-электролитного взаимодействия с полимерами, несущими отрицательный заряд (полианионами), что предполагает перспективность использования синтезированных ионенов в медицинской практике в качестве антагонистов гепарина [4]. Наряду с этим в литературе имеются сведения о том, что ионены, как и другие азотсодержащие полимеры, подавляют в водных растворах рост многих бактерий и грибов при концентрации 0,1–1,0 % [1; 2; 10; 11].

Была оценена антимикробная активность синтезированных фосфор-азотсодержащих ионенов **5–7** по подавлению роста штаммов *E. coli* и *S. aureus* (табл. 2).

Таблица 2

Рост тест-культур на среде РПА с добавлением 0,1 и 0,01 % ионенов 5–7

Культура	Оценка интенсивности роста						Контроль
	Среда РПА с добавлением ионена <b>5</b> , %		Среда РПА с добавлением ионена <b>6</b> , %		Среда РПА с добавлением ионена <b>7</b> , %		
	0,1	0,01	0,1	0,01	0,1	0,01	
<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
<i>E. coli</i>	+++	+++	+	++	++	+++	+++

Примечание: «+++» - хороший рост; «++» - умеренный рост; «+» - скудный рост

Проведённые исследования показали, что ионен **7** обладает антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* и *S. aureus*. Этот ионен подавлял рост обеих исследуемых бактерий в концентрации 0,1 %. При этом условно-патогенная бактерия *S. aureus* была более чувствительной к действию этого полимера, чем *E. coli*. Достаточно высокая бактерицидная активность ионена **7** по сравнению с ионенами **5** и **6**, вероятно, связана с присутствием в его структуре иодид-аниона, обладающим более выраженными антибактериальными свойствами, чем анион брома. Полученные нами результаты подтвердились и согласуются с литературными данными [10].

Вместе с тем ионен **6**, содержащий бромид-ион, подавлял рост *E. coli* уже при концентрации 0,01 %, в то время как *S. aureus* был устойчив к этому соединению.

Ионен **5** не проявил антибактериальной активности по отношению к *E. coli* и *S. aureus*. Данный эффект может быть связан с тем, что соединение **5** содержит фенилэтильную группу в отличие от ионенов **6** и **7**, имеющих в своём составе фармакофорную 2-цианоэтильную группу.

### Заключение

Впервые синтезированные новые представители класса фосфор-азотсодержащих ионенов получены на основе промышленно доступных соединений (красный фосфор, стирол, акрилонитрил, 4-винилпиридин и 1,4-дигалогенбутаны) удобным, эффективным, экологически приемлемым методом. Результаты исследования микробицидных свойств этих соединений показали, что два ионена (**6** и **7**) обладают антибактериальной активностью. К ионену **6** (концентрация 0,1; 0,01 %) чувствительной оказалась

*E. coli*. Ионен 7 в концентрации 0,1 % подавлял рост *E. coli* и *S. aureus*. Этот поликатион представляет интерес с целью дальнейшего его изучения в качестве антибактериального агента против *S. aureus*.

#### Список литературы

1. Афиногенов Г. Е. Антимикробные полимеры / Г. Е. Афиногенов, Е. Ф. Панарин. – СПб. : Гиппократ, 1993. – 264 с.
2. Платэ Н. А. Физиологически активные полимеры / Н. А. Платэ, А. Е. Васильев // М. : Химия, 1986. – 296 с.
3. Полимеры в биологии и медицине / ред. М. Дж. Дженкинс. – М. : Науч. мир, 2011. – 247 с.
4. Синтез и свойства нового семейства фосфор-азотсодержащих ионенов / В. Л. Михайленко [и др.] // ДАН. – 2015. – Т. 465, № 4. – С. 446–450. DOI: 10.7868/S0869565215340150
5. 3,3,5-Триметил-2-хлор-1,2-оксафосфолен-2-оксид - прекурсор в новом методе синтеза диалкил(диарил)(2-метил-4-оксопент-2-ил)фосфиноксидов / Д. А. Татаринев [и др.] // Журн. орг. химии. – 2013. – Т. 49, вып. 4. – С. 534–542. DOI: 10.1134/S1070428013040040.
6. Фосфорсодержащие ионены / В. Л. Михайленко [и др.] // Фундаментальные научные исследования: теоретические и практические аспекты : сб. материалов II Междунар. науч.-практ. конф. 29 сент. 2016 г. – Кемерово, 2016. – Т. 2. – С. 83–86.
7. Caporali M. Benign Chlorine-Free Approaches to Organophosphorus Compounds / M. Caporali, M. Serrano-Ruiz, M. Peruzzini // Chemistry Beyond Chlorine. – Springer, 2016. – 97 p. DOI: 10.1007/978-3-319-30073-3.
8. Carmona-Ribeiro A. M. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies / A. M. Carmona-Ribeiro, L. D. de Melo Carrasco // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14, N 5. – P. 9906–9946.
9. Gusarova N. K. Novel general halogen-free methodology for the synthesis of organophosphorus compounds / N. K. Gusarova, S. N. Arbuzova, B. A. Trofimov // Pure Appl. Chem. – 2012. – Vol. 84, N 3. – P. 439–459.
10. Hollis C. G. Ionene polymers as microbicides / C. G. Hollis, P. A. Jacquess // Buckman Lab. International, Inc. – № 27097, Патент 5681862 США, МКИ А 01 N 33/12. заявл. 05.03.1993; опубл. 28.10.1997.
11. Mattheis C. Closing One of the Last Gaps in Polyionene Compositions: Alkylammonium Ionenes as Fast-Acting Biocides / C. Mattheis, M. Zheng, S. Agarwal // Macromolecular bioscience. – 2012. – Vol. 12, N 3. – P. 341–349.
12. Trofimov B. A. Elemental phosphorus in strongly basic media as phosphorylating reagent: a dawn of halogen-free 'green' organophosphorus chemistry / B. A. Trofimov, N. K. Gusarova // Mendeleev Commun. – 2009. – Vol. 19, N 6. – P. 295–302.

## Estimation of Antibacterial Activity of some Representatives of a New Family of Phosphorus-Nitrogen Containing Ionenes

V. L. Mikhailenko<sup>1</sup>, S. I. Verkhoturova<sup>2</sup>, O. F. Vyatchina<sup>1</sup>, M. A. Kozik<sup>1</sup>, V. N. Kizhnyayev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Irkutsk State University, Irkutsk

<sup>2</sup>A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk

**Abstract.** The synthesis of antibacterial and antiviral drugs using of polyelectrolytes of natural or synthetic origin is being actively developed. Polycations containing nitrogen and phosphorus atoms in the main chain can be used for interpolymer interactions with cell membranes or

other biopolymers. The antibacterial activity of the first synthesized phosphorus-nitrogen-containing ionenes was studied towards to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The growth of microorganisms has been suppressed at an ionene concentration of 0.01-0.1%. Synthesis of new objects of this ionenes class was realized by the polycondensation reaction of bis[2-(4-pyridyl)ethyl]phenylethyl- and bis[2-(4-pyridyl)ethyl](2-cyanoethyl)phosphinoxides with 1,4-dihalobutanes. Water-soluble ionenes of linear structure bearing a phenylethyl and pharmacophoric 2-cyanoethyl group were prepared. It was shown that the nature of the halide ion influences on exhibition of microbicidal properties of synthesized ionenes. Ionene containing iodide anion, possesses antibacterial activity against both strains. In this case, the opportunistic bacterium *Staphylococcus aureus* was more sensitive to the impact of this polymer than *Escherichia coli*.

**Keywords:** antibacterial activity, phosphorus-nitrogen-containing ionenes, polycondensation, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

### References

1. Afinogenov G.E. *Antimikrobnye polimery* [Antimicrobial polymers]. St.-Petersburg, Gippokrat Publ., 1993, 264 p. (in Russian).
2. Plate N.A. *Fiziologicheski aktivnye polimery* [Physiologically Active Polymers]. Moscow, Khimiya Publ., 1986, 296 p. (in Russian).
3. *Polimery v biologii i meditsine* [Polymers in Biology and Medicine]. Moscow, Nauchnyi mir Publ., 2011, 247 p. (in Russian).
4. Mikhailenko V.L., Kizhnyaev V.N., Verkhoturva S.I., Apartsin K.A., Gusarova N.K., Grigor'ev E.G., Trofimov B.A. Sintez i svoystva novogo semeystva fosforazotsoderzhashchikh ionenov [Synthesis and Properties of New Family of Phosphorous-containing ionenes]. *Doklady Akademii nauk* [Doklady Chemistry], 2015, vol. 465, no. 4, pp. 446-450. (in Russian). DOI: 10.7868/S0869565215340150
5. Tatarinov D.A., Kostin A.A., Baronova T.A., Dobrynin A.B., Mironova E.V., Krivolapov D.B., Buzykin B.I., Mironov V.F. 3,3,5-Trimetil-2-khlor-1,2-oksafosfolen-2-oksidi – prekursor v novom metode sinteza dialkil(diaryl)(2-metil-4-oksopent-2-il)fosfinoksidov [3,3,5-Trimethyl-2-Chlor-1,2-Oksafosfolene-2-oxide – Prekursor to New Dialkil(diaryl)(2-methyl-4-oxopent-2-yl)fosfinoxydes Synthesis Method]. *Zhurnal Organicheskoi Khimii* [Russian Journal of Organic Chemistry], 2013, vol. 49, no. 4, pp. 534-542. (in Russian). DOI: 10.1134/S1070428013040040.
6. Mikhailenko V.L., Kizhnyaev V.N., Verkhoturva S.I., Apartsin K.A., Gusarova N.K., Grigor'ev E.G., Trofimov B.A. Fosforsoderzhashchie ioneny [Phosphorous-containing ionenes]. *Fundamental'nye nauchnye issledovaniya: teoreticheskie i prakticheskie aspekty* [Fundamental Research: Theoretical and Practical Aspects]. Abstract of Paper. II Int. conf. 29.09.2016. Kemerovo, 2016, vol. II, pp. 83-86. (in Russian).
7. Caporali M., Serrano-Ruiz M., Peruzzini M. Benign Chlorine-Free Approaches to Organophosphorus Compounds. *Chemistry Beyond Chlorine*, Springer Publ., 2016, 97 p. DOI: 10.1007/978-3-319-30073-3.
8. Carmona-Ribeiro A.M., de Melo Carrasco L.D. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 5, pp. 9906–9946.
9. Gusarova N.K., Arbuzova S.N., Trofimov B.A. Novel general halogen-free methodology for the synthesis of organophosphorus compounds. *Pure Appl. Chem.*, 2012, vol. 84, no. 3, pp. 439-459.
10. Hollis C.G., Jacquess P.A. *Ionene polymers as microbicides*. Buckman Lab. International, Inc., U.S. Pat. No. 5681862 A, MKI A 01 N 33/12, 1997.
11. Mattheis C., Zheng M., Agarwal S. Closing One of the Last Gaps in Polyionene Compositions: Alkyloxyethylammonium Ionenes as Fast-Acting Biocides. *Macromolecular bioscience*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 341-349.

12. Trofimov V.A., Gusarova N.K. Elemental phosphorus in strongly basic media as phosphorylating reagent: a dawn of halogen-free 'green' organophosphorus chemistry. *Mendeleev Commun.*, 2009, vol. 19, no. 6, pp. 295-302.

*Михайленко Валентина Львовна*  
кандидат химических наук, доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел. (3952) 24–18–55  
e-mail: mival63@gmail.com

*Mikhailenko Valentina Lvovna*  
Candidate of Science (Chemistry),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel. : (3952) 24–18–55  
e-mail: mival63@gmail.com

*Верхотурова Светлана Ильясовна*  
кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
Иркутский институт химии им.  
А. Е. Фаворского СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Фаворского, 1  
тел.: (3952) 42–59–31  
e-mail: verkhoturova@irioch.irk.ru

*Verkhoturova Svetlana Ilyasovna*  
Senior Research Scientist  
A. E. Favorsky Irkutsk Institute  
of Chemistry SB RAS  
1, Favorsky st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
tel.: (3952) 42–59–31  
e-mail: verkhoturova@irioch.irk.ru

*Вятчина Ольга Федоровна*  
кандидат биологических наук, доцент,  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–18–55  
e-mail: olgairk3@rambler.ru

*Vyatchina Ol'ga Fedorovna*  
Candidate of Science (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
tel.: (3952) 24–18–55  
e-mail: olgairk3@rambler.ru

*Козик Мария Александровна*  
магистрант  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–18–55  
e-mail: kozik@rambler.ru

*Kozik Maria Aleksandrovna*  
Undergraduate  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
tel. : (3952) 24–18–55  
e-mail: kozik@rambler.ru

*Кижняев Валерий Николаевич*  
доктор химических наук, профессор  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 42–59–35

*Kizhnyaev Valery Nikolaevitch*  
Doctor of Science (Chemistry), Professor,  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: (3952) 42–59–35