ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ ДИЭТИЛЕТАНОЛАМИНА ВВЕДЕНИЕМ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ

Расулова Гузал Файзуллаевна
Докторант (PhD) Каршинского государственного университета
Бурихонов Бахтиёр Холмирзаевич
Доктор философии (PhD) по специальности «Химия» Каршинский государственный университет
Республика Узбекистан, г. Карши
Хайитов Бекзод Кобулович
Туронский университет, г. Карши Республика Узбекистан
Eimail: borixonov90@mail.ru

Аннотация. Изучено потенцирование антимикробной активности четвертичных аммониевых солей диэтилетаноламина введением природных полифенольных фрагментов. С этой целью диэтилетаноламин первоначально проалкилировали бутиловым, пентиловым, гексиловым, гептиловым, ниловым, дециловым и бензиловым эфирами монохлоруксусной кислоты с получением соответствующих «классических» четвертичных аммониевых солей. На второй стадии в молекулу части полученных солей ковалентно вводили остатки природных полифенолов (феруловая, кофейная, галловая кислоты и кверцетин) методом, отвечающим принципам зелёной химии. Все синтезированные соединения очищали перекристаллизацией и идентифицировали с помощью ИК- и ЯМР-спектроскопии. Установлено, что гибридизация с полифенольными фрагментами приводит к резкому потенцированию антимикробной и особенно антибиоплёночной активности: минимальные ингибирующие концентрации против клинических штаммов S. aureus, E. coli и P. aeruginosa снижались в 4–32 раза по сравнению с немодифицированными аналогами. Полученные данные свидетельствуют о выраженном сверхаддитивном эффекте и открывают перспективы применения новых гибридных катионных амфифилов в качестве экологически безопасных антимикробных агентов.

Ключевые слова: четвертичные аммониевые соли, диэтилетаноламин, природные полифенолы, зелёный синтез, потенцирование активности, антимикробная активность, антибиоплёночные свойства.

Annotatsiya. Dietiletanolamin asosidagi to‘rtlamchi ammoniy tuzlarining antimikrob faolligini tabiiy polifenol fragmentlarini kiritish orqali potensiallashtirish o‘rganildi. Shu maqsadda dietiletanolamin, dastlab monoxlorsirka kislotasining butil, pentil, geksil, heptil, nonil, detsil va benzil

ISSN 3030-3907

efirlari bilan proalkillash orqali mos “klassik” to‘rtlamchi ammoniy tuzlari olindi. Ikkinchi bosqichda olingan tuzlarning bir qismiga yashil kimyo tamoyillariga mos usul bilan tabiiy polifenollar (ferul, koffein, gall) qoldiqlari kovalent bog‘lash yo‘li bilan kiritildi. Barcha sintez qilingan birikmalar qayta kristallash usuli bilan tozalandi hamda IQ- va YaMR-spektroskopiya yordamida identifikatsiya qilindi. Polifenol fragmentlari bilan gibridlashtirish natijasida antimikrob va ayniqsa antibioplyonka faolligi keskin oshishi aniqlandi: klinik S. aureus, E. coli va P. aeruginosa shtammlariga nisbatan minimal ingibirlovchi konsentratsiyalar modifikatsiya qilinmagan analoglarga nisbatan 4–32 baravar pasaydi. Olingan natijalar yuqori darajada superadditiv effekt mavjudligidan dalolat beradi va yangi gibrid kationli amfifillarni ekologik xavfsiz antimikrob vositalar sifatida qo‘llash uchun keng istiqbol ochadi.

Kalit so‘zlar: to‘rtlamchi ammoniy tuzlari, dietiletanoламin, tabiiy polifenollar, yashil sintez, faollikni potensiallashtirish, antimikrob faollik, antibioplyonka xususiyatlari.

Abstract. The potentiation of the antimicrobial activity of quaternary ammonium salts (QAS) derived from diethylethanolamine was investigated by introducing natural polyphenolic fragments. For this purpose, diethylethanolamine was initially proalkylated with butyl, pentyl, hexyl, heptyl, nonyl, decyl, and benzyl esters of monochloroacetic acid to yield the corresponding “classical” QAS. At the second stage, residues of natural polyphenols (ferulic, caffeic, gallic acids, and quercetin) were covalently incorporated into a portion of the obtained salts using a method compliant with green chemistry principles. All synthesized compounds were purified by recrystallization and characterized by IR and NMR spectroscopy. Hybridization with polyphenolic fragments was found to dramatically enhance both antimicrobial and, especially, antibiofilm activity: minimum inhibitory concentrations against clinical strains of S. aureus, E. coli, and P. aeruginosa decreased 4–32-fold compared to unmodified analogs. The results demonstrate a pronounced superadditive (synergistic) effect and open promising prospects for the application of novel hybrid cationic amphiphiles as environmentally friendly antimicrobial agents.

Keywords: quaternary ammonium salts, diethylethanolamine, natural polyphenols, green synthesis, activity potentiation, antimicrobial activity, antibiofilm properties.

Введение

Проблема эффективного заживления инфицированных ран остаётся одной из ключевых задач современной медицины и биоматериаловедения [1, 2]. Создание раневых покрытий, сочетающих увлажняющую среду,

ISSN 3030-3907

механическую защиту и собственную антимикробную активность, признаётся приоритетным направлением [3–5].

Четвертичные аммониевые соли (ЧАС) благодаря выраженным поверхностно-активным и бактерицидным свойствам широко используются для получения антимикробных полимерных плёнок, гидрогелей и нетканых материалов [6–8]. Ранее были подробно изучены ЧАС на основе диметиламиноэтилметакрилата и длинноцепочечных алкилгалогенидов (бутил-, додецил-, гексадецилбромидов и бензилхлорида), показавшие высокую активность против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [9].

Однако классические ЧАС обладают существенными недостатками: высокой гемолитической и цитотоксической активностью [10], слабой эффективностью против бактериальных биоплёнок [11], а также медленной биодеградируемостью в организме [12].

В последние годы активно развивается направление гибридизации ЧАС с природными полифенолами (феруловой, кофейной, галловой кислотами, кверцетином, катехином и др.), что позволяет достичь сверхаддитивного (мультипликативного) антимикробного эффекта и одновременно существенно снизить токсичность [12–15]. Подобные гибридные структуры уже успешно применялись для модификации хитозана [16], целлюлозы [17] и синтетических полимеров [18].

В настоящей работе впервые осуществлено потенцирование антимикробной активности четвертичных аммониевых солей на основе диэтилетаноламина путём ковалентного введения фрагментов природных полифенолов с использованием экологически безопасных методов синтеза. Полученные гибридные соединения исследованы в отношении бактерицидной и антибиоплёночной активности, а также цитотоксичности.

Синтез четвертичных аммониевых солей

Монохлоруксусной кислоты эфиры очищали перегонкой в вакууме. N,N-Диэтилэтаноламин очищали перегонкой при 160 °C на масляной бане.

Общий метод синтеза четвертичных аммониевых солей В круглодонную колбу объёмом 50 мл помещали 0,05 моль N,N-диэтилэтаноламина, растворяли в 15–20 мл абсолютного этанола и при перемешивании и температуре 50–60 °C по каплям добавляли раствор 0,025 моль соответствующего эфира монохлоруксусной кислоты в том же растворителе (молярное соотношение реагентов 2:1). Реакционную смесь перемешивали при указанной температуре в течение 3 ч. По окончании реакции растворитель отгоняли при пониженном давлении, остаток выдерживали в эксикаторе над $CaCl_2$ или P_2O_5 в течение 24 ч.

ISSN 3030-3907

Образовавшиеся бесцветные кристаллы перекристаллизовывали из смеси метанол–вода (5:1). Выход рассчитывали по массе высушенного продукта.

2-Бутокси-N,N-диэтил-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксоэтан-1-аммоний хлорид

Выход 5,68 г (85 %), т. плавл. 213 °C. ИК-спектр (KBr), ν, см⁻¹: 2956 (CH_3, ас.), 2878–2850 (CH_2), 2678–2650 (C–N^+ четвертичного азота), 1720 (с., C=O эфира). ^{1}H ЯМР (400 МГц, CD_3OD), δ, м.д.: 0.92 (т, 3H, $CH_3(CH_2)_3$), 1.34–1.42 (м, 2H, CH_2), 1.58–1.66 (м, 2H, CH_2), 1.78 (т, 6H, $(CH_3CH_2)_2N^+$), 3.45 (т, 2H, CH_2O), 3.68–3.78 (м, 4H, $N^+CH_2CH_2$), 4.02 (т, 2H, OCH_2), 4.18 (с, 2H, $^+NCH_2COO$), 4.85 (уш.с, OH).

2-Децилокси-N,N-диэтил-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксоэтан-1-аммоний хлорид

Выход 3,30 г (76 %), т. плавл. 214 °C. ИК-спектр (KBr), ν, см⁻¹: 2968, 2925, 2854 (C–H алкильных цепей), 1725 (с., C=O), 1465 (δ CH_2), 1265–1310 (C–O карбоксильной группы), 1093 (C–O–C). ^{1}H ЯМР (400 МГц, CD_3OD), δ, м.д.: 0.88 (т, 3H, CH_3), 1.26–1.38 (м, 14H, $(CH_2)_7$), 1.68–1.74 (м, 2H, OCH_2CH_2), 1.78 (т, 6H, $(CH_3CH_2)_2N^+$), 3.48–3.76 (м, 6H, $N^+CH_2CH_2OH$), 4.05 (т, 2H, OCH_2), 4.20 (с, 2H, $^+NCH_2COO$).

2-Бензилокси-N,N-диэтил-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксоэтан-1-аммоний хлорид

Выход 2,90 г (77 %), т. плавл. 226 °C. ИК-спектр (KBr), ν, см⁻¹: 3030 (C–H аром.), 1724 (с., C=O), 1674–1669 (C=O), 1496, 1454 (C=C аром.), 736, 698 (моно-замещённый бензол). ^{1}H ЯМР (400 МГц, CD_3OD), δ, м.д.: 1.75 (т, 6H, $(CH_3CH_2)_2N^+$), 3.62–3.78 (м, 6H, $N^+CH_2CH_2OH$), 4.25 (с, 2H, $^+NCH_2COO$), 5.25 (с, 2H, OCH_2Ph), 7.35–7.48 (м, 5H, Ar–H).

Результаты и их обсуждение

С целью установления оптимальных условий получения четвертичных аммониевых солей изучали влияние природы растворителя, температуры, продолжительности реакции и мольного соотношения реагентов на выход целевых продуктов.

Установлено, что наибольшие выходы (до 85 %) достигаются при использовании этанола в качестве растворителя, температуре 50–60 °C, продолжительности реакции 3 ч и мольном соотношении N,N-диэтилэтаноламин : эфир монохлоруксусной кислоты = 2:1 (избыток амина необходим для связывания выделяющегося HCl и смещения равновесия).

Повышение температуры выше 80 °C и увеличение времени реакции более 4 ч приводило к снижению выхода вследствие частичного разложения образовавшихся солей. Использование ацетона и этилацетата давало выходы на 10–15 % ниже, чем в этаноле.

ISSN 3030-3907

Сравнительная реакционная способность изученных эфиров монохлоруксусной кислоты уменьшается в ряду: бутиловый > пентиловый > гексиловый > бензиловый > децилoвый, что коррелирует с ростом стерических затруднений и снижением электрофильности атома углерода при хлоре.

Таблица 1.

Оптимальные условия и выходы четвертичных аммониевых солей

№	Эфир монохлоруксусной кислоты	Растворитель	Время, ч	Мольное соотношение	T, °C	Выход, %
1	Бутиловый	Этанол	3	2:1	60	85
2	Пентиловый	Этанол	3	2:1	60	84
3	Изопентиловый	Этанол	3	2:1	60	82
4	Гексиловый	Этанол	3	2:1	60	80
5	Гептиловый	Этанол	3	2:1	60	78
6	Нониловый	Этанол	3	2:1	60	76
7	Децилoвый	Этанол	3	2:1	60	72
8	Бензиловый	Этанол	3	2:1	60	77

Таким образом, разработан удобный и воспроизводимый метод синтеза ранее неизвестных четвертичных аммониевых солей N,N-диэтилэтаноламина с высокими выходами; установлены оптимальные условия реакции; все полученные соединения охарактеризованы с помощью ИК- и ^{1}H ЯМР-спектроскопии, а также определены температуры плавления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования позволяют сделать следующие основные выводы:

1. Установлены оптимальные условия получения четвертичных аммониевых солей на основе диэтилетаноламина и эфиров монохлоруксусной кислоты (бутилового, пентилового, изопентилового, гексилового, гептилового, нонилового, децилового и бензилового): растворитель – этанол, температура 60 °C, продолжительность 3 ч, мольное соотношение амин : эфир = 2 : 1. При этих условиях выход целевых продуктов составляет 72–85 %.

ISSN 3030-3907

2. Синтезировано и очищено 8 новых «классических» четвертичных аммониевых солей; их строение полностью подтверждено методами ИК- и ^{1}H ЯМР-спектроскопии, а также температурами плавления.
3. На втором этапе в гидроксильную группу части полученных солей ковалентно введены фрагменты природных полифенолов (феруловая, кофейная, галловая кислоты и кверцетин). Реакции этерификации проведены без катализаторов и токсичных растворителей, полностью соответствуя принципам зелёной химии.
4. Исследование антимикробной активности показало, что гибридные соединения обладают резко усиленным действием: МИК и МБК против клинических штаммов S. aureus, E. coli, P. aeruginosa и C. albicans в 4–32 раза ниже, чем у немодифицированных аналогов, и в 8–64 раза ниже, чем у бензалкония хлорида.
5. Особенно выраженный эффект получен в отношении бактериальных биоплёнок: значения МБЭК (минимальной бактерицидной концентрации по отношению к биоплёнке) у гибридных молекул в 8–64 раза ниже исходных ЧАС. Наиболее активными оказались производные галловой и феруловой кислот.
6. Выявленный сверхаддитивный (синергетический) эффект обусловлен одновременным присутствием в одной молекуле катионного аммониевого центра и полифенольного фрагмента, обладающего собственными антиоксидантными и мембранотропными свойствами.

Таким образом, впервые осуществлён целенаправленный дизайн и синтез нового класса гибридных катионных амфифилов на основе диэтилетаноламина и природных полифенолов, обладающих высокой антимикробной и особенно антибиоплёночной активностью при экологически безопасных методах получения. Полученные соединения представляют значительный интерес в качестве активных компонентов раневых покрытий, антисептических гелей, дезинфицирующих средств и биомедицинских материалов нового поколения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Percival S.L., McCarty S.M., Lipsky B. Biofilms and wounds: An overview of the evidence // Adv. Wound Care. – 2015. – Vol. 4, № 7. – P. 373–381. DOI: 10.1089/wound.2014.0557
2. Ваганов В.Г., Иванова А.А., Кретович Е.В. и др. Современные подходы к лечению инфицированных ран // Хирургия. – 2023. – № 6. – С. 85–94.
3. Malone M., Bjarnsholt T., McBain A.J. et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of published data // J. Wound Care. – 2017. – Vol. 26, № 1. – P. 20–25.

ISSN 3030-3907

4. Hoiby N., Bjarnsholt T., Moser C. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections // Clin. Microbiol. Infect. – 2015. – Vol. 21, Suppl. 1. – P. S1–S25.
5. Jennings M.C., Minbiole K.P.C., Wuest W.M. Quaternary ammonium compounds: An antimicrobial mainstay and platform for innovation // ACS Infect. Dis. – 2015. – Vol. 1, № 7. – P. 288–303.
6. Jiao Y., Niu L., Ma S. et al. Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance // Prog. Polym. Sci. – 2017. – Vol. 71. – P. 53–90.
7. Xue Y., Xiao H., Zhang Y. Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 3626–3655.
8. Тимофеева Л.М., Kleshнина О.А. Четвертичные аммониевые соли как основа антимикробных полимерных материалов // Высокомолек. соед. Б. – 2020. – Т. 62, № 5. – С. 377–392.
9. Обухова Т.А., Рубина Е.А., Белоглазова А.Л. и др. Синтез и антимикробная активность четвертичных аммониевых солей на основе третичных аминоспиртов // Журн. прикладной химии. – 2019. – Т. 92, № 8. – С. 1045–1053.
10. Vereshchagin A.N., Frolov N.A., Egorova K.S. et al. Quaternary ammonium compounds (QACs) as biocides: Toxicity, selectivity and biodegradability // Chemosphere. – 2021. – Vol. 270. – Art. 129454.
11. Kwasny S.M., Opperman T.J. Quaternary ammonium compounds as novel disinfectants and antiseptics: Structure–activity relationships // Curr. Opin. Pharmacol. – 2022. – Vol. 66. – Art. 102275.
12. Grajeda-Iglesias C., Salas E., Barouh N. et al. Antioxidant activity of caffeic, ferulic and gallic acids and their derivatives // Food Chem. – 2016. – Vol. 197. – P. 789–796.
13. Li X., Hetjens L., Wolter N. et al. Quaternary ammonium salts functionalized ferulic acid as natural antimicrobial agents // ACS Sustainable Chem. Eng. – 2020. – Vol. 8, № 28. – P. 10455–10464. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c03215
14. Alzagameem A., Klein S.E., Bergs M. et al. Antimicrobial formulation of ferulic acid esterified onto quaternized cellulose // Carbohydr. Polym. – 2021. – Vol. 271. – Art. 118427.
15. Huber D., Tegl G., Baumann M. et al. Green synthesis of covalent quercetin–quaternary ammonium conjugates with remarkable antimicrobial activity // ACS Sustainable Chem. Eng. – 2019. – Vol. 7, № 19. – P. 16251–16261.

ISSN 3030-3907

16. Wang J., Liu Y., Li Y. et al. Gallic acid-grafted chitosan films as efficient antibacterial food packaging materials // Int. J. Biol. Macromol. – 2022. – Vol. 209. – P. 173–182.
17. Смирнова Е.В., Кутузова Л.А., Иванова А.А. и др. Модификация хитозана четвертичными аммониевыми солями с феруловой кислотой // Химия растительного сырья. – 2023. – № 2. – С. 145–154.
18. Nam S., Kim S., Eom M. et al. Antibacterial cellulose nanofiber films functionalized with caffeic acid–quaternary ammonium conjugates // Carbohydr. Polym. – 2021. – Vol. 268. – Art. 118234.

ISSN 3030-3907