

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ФОСФАТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕХНОЛОГИИ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА

Лепехова С.А.¹, Станкевич В.К.¹, Коваль Е.В.¹, Григорьев Г.Е.¹, Иноземцев П.О.¹, Белозеров Л.Е.², Шелупаев А.П.¹

¹*Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, e-mail: p.inozemcev@rambler.ru;*

²*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск*

Гуанидинпроизводные соединения широко используются для производства дезинфицирующих средств и кожных антисептиков, применяемых в медицине, и являются перспективными средствами, однако нет единого мнения о технологии, подготовке соединений, их стандартизации. Сравнение антибактериальной активности полигексаметиленгуанидин фосфата, полученного с использованием различных технологий. Стендовые исследования *in vitro* выполнены для подбора наименьшей концентрации образцов с высокой антимикробной активностью в отношении штамма *E. coli* 10⁹ КОЕ/мл и микста *E. coli* + *Ps. aeruginosa* 10⁹ КОЕ/мл. В работе использовали две серии полигексаметиленгуанидина фосфата, полученного с использованием различных технологий производства. В качестве раствора сравнения применяли раствор хлоргексидина биклюконата различной концентрации. Культуры *E. coli* и *Ps. aeruginosa* сохраняли на твердых питательных средах с периодическим пассированием на средах обогащения в термостате при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Экспериментальные данные были статистически обработаны с использованием программы Statistica 10.0. Наилучшие результаты были достигнуты при воздействии водного раствора образца 2, который был получен из сухого водорастворимого вещества, созданного поликонденсацией гексаметилендиамина с карбонатом гуанидина в присутствии органического растворителя и последующим образованием соли фосфорной кислоты, по сравнению с антибактериальной активностью образца 1, полученного сплавлением исходных веществ. Его использование в низких концентрациях до 0,0015% при микстинфекции позволяет достоверно снизить количество *E. coli* с 10⁹ до нулевой величины, а *Ps. aeruginosa* – с 10⁹ до 10³ КОЕ/мл ($p \leq 0,05$). Полигексаметиленгуанидин фосфата, полученный путем поликонденсации гексаметилендиамина с карбонатом гуанидина в присутствии органического растворителя и последующей обработки промежуточного продукта фосфорной кислотой в среде воды, обладает более высокой антибактериальной активностью по сравнению с полигексаметиленгуанидином, полученным по технологии сплавления.

Ключевые слова: антисептики, антибактериальная активность, технология.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF POLYHEXAMETHYLENE GUANIDINE PHOSPHATE DEPENDING ON ITS PRODUCTION TECHNOLOGY

Lepekhova S.A.¹, Stankevich V.K.¹, Koval E.V.¹, Grigorev G.E.¹, Inozemtsev P.O.¹, Belozеров L.E.², Shelupaev A.P.¹

¹*Irkutsk Scientific Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, e-mail: p.inozemcev@rambler.ru;*

²*A.E. Favorsky Irkutsk Institute of the Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk*

Guanidine derivatives are widely used for the production of disinfectants and skin antiseptics used in medicine and are promising means, however, there is no consensus on the technology, preparation of compounds for their standardization. Comparison of the antibacterial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate obtained using various technologies. Bench tests *in vitro* were performed to select the lowest concentration of samples with high antimicrobial activity against *E. coli* strain 10⁹ CFU / ml and mixed *E. coli* + *Ps. Aeruginosa* 10⁹ CFU / ml. We used two series of polyhexamethylene guanidine phosphate obtained using various production technologies. A solution of chlorhexidine blicluconate of various concentrations was used as a reference solution. *E. coli* and *Ps. aeruginosa* were kept on solid nutrient media with periodic passaging on enrichment media in a thermostat at 37°C for 18–24 hours. The experimental data were statistically processed using the Statistica 10.0 software. Results. The best results were achieved when exposed to an aqueous solution of sample 2, which was obtained from a dry water-soluble substance obtained by polycondensation of hexamethylenediamine with guanidine carbonate in the presence of an organic solvent and the subsequent formation of a phosphoric acid salt in comparison with the antibacterial activity of sample 1, obtained by fusing the starting materials. Its use in low concentrations of up to 0.0015% for mixed infections can reliably reduce the number of *E. coli* from 10⁹ to zero,

and *Ps. aeruginosa* from 109 to 103 CFU / ml ($p \leq 0.05$). Polyhexamethylene guanidine phosphate obtained by polycondensation of hexamethylenediamine with guanidine carbonate in the presence of an organic solvent and subsequent treatment of the intermediate product with phosphoric acid in water, has a higher antibacterial activity compared to polyhexamethylene guanidine obtained by fusion technology.

Keywords: antiseptics, antibacterial activity, technology.

Применение антисептиков актуально в связи с широким распространением новых инфекций и ростом антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов. В настоящее время при пандемии коронавирусной инфекции эта проблема приобретает глобальный характер [1-4].

Перспективные антисептики должны быть универсальными, одновременно разрушать вирулентную грамположительную и грамотрицательную микрофлору, вирусы, дрожжеподобную, плесневую, грибковую флору. В фармакологическом смысле перспективные антисептики должны обладать избирательной токсичностью – быть ядами в отношении микроорганизмов и малотоксичными для теплокровных животных. Гуанидинпроизводные соединения широко используются для производства дезинфицирующих средств и кожных антисептиков, применяемых в медицине, различных отраслях промышленности и в быту, являются перспективными средствами для проведения текущей уборки, обработки поверхностей. Некоторые авторы отмечают усиление антимикробной активности антибактериальных препаратов при использовании их совместно с антисептиками на основе гуанидинпроизводных соединений, комплексных соединений [5-7].

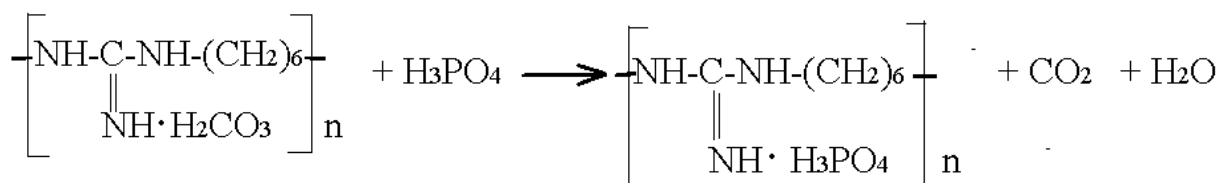
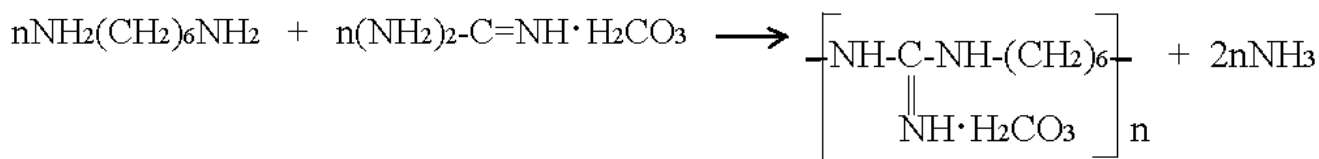
Полигексаметиленгуанидин фосфат, полученный по щадящей технологии в среде органического растворителя, рекомендован как дезинфектант. Ведутся работы по изучению возможности использования гуанидинпроизводных для лечения инфицированных ран [8, 9].

Несмотря на большой интерес к данной группе соединений, остается открытым вопрос оптимальной технологии производства, подготовки, стандартизации, формы выпуска и использования, с максимальным выходом действующего вещества с высокой антибактериальной активностью.

Целью нашего исследования было сравнение антибактериальной активности полигексаметиленгуанидин фосфата, полученного с использованием различных технологий, для подбора наименьшей концентрации образцов с высокой антимикробной активностью в отношении штамма *E. coli* 10^9 КОЕ/мл и микста *E. coli* + *Ps. aeruginosa* 10^9 КОЕ/мл.

Материалы и методы исследования. В работе использовали водные растворы гуанидинпроизводных соединений: 2 образца полигексаметиленгуанидин фосфата, полученных по разным технологиям.

Образец 2 был получен из сухого водорастворимого вещества



в качестве препарата сравнения применяли хлоргексидина биглюконат. Исследования *in vitro* в виде стендовых опытов с применением метода серийных разведений в жидких средах выполнены для подбора наименьшей концентрации образцов с высокой антимикробной активностью в отношении штамма *E. coli* 10^9 КОЕ/мл и микста *E. coli* + *Ps. aeruginosa* 10^9 КОЕ/мл. Использовали следующие концентрации водных растворов образца 1 и образца 2, а также хлоргексидина биглюконата: 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,003%, 0,0015%, 0,001%. Культуры *E. coli* и *Ps. aeruginosa* сохраняли на твердых питательных средах с периодическим пассированием на средах обогащения в термостате при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Полученную культуру смывали теплым стерильным раствором натрия хлорида и стандартизировали до 10^9 КОЕ в миллилитре (КОЕ/мл) по стандарту мутности (Методика Института стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, Москва) [10].

Все экспериментальные данные исследований были статистически обработаны с использованием программы Statistica 10.0 (лицензия № AXAR402G263414FA-V). Определение значимости различий полученных данных (*p*) в сравниваемых выборках проведено с использованием непараметрических методов (критерий Манна–Уитни (*U*), критерий Вилкоксона (*W*)) [11].

Результаты исследования и их обсуждение. Для сравнительной оценки антибактериальной активности были взяты водные растворы двух образцов, полученных по различным технологиям, и известный антисептик хлоргексидина биглюконат.

По одному из способов полигексаметиленгуанидин фосфат (образец 1) получен сплавлением карбоната гуанидина с гексаметилендиамином при температуре 135–145°C в течение 10–15 ч с последующим взаимодействием тщательно измельченного получившегося твердого полигексаметиленгуанидин карбоната с ортофосфорной кислотой [12].

По второй технологии полигексаметиленгуанидин фосфат получен взаимодействием гексаметилендиамина с карбонатом гуанидина, которое проводили при температуре 110–

145°C в присутствии органического растворителя, способного к образованию гетероазеотропных смесей с водой, с последующей обработкой промежуточного продукта (в этом же реакторе) фосфорной кислотой в среде воды. Технология позволяет нарабатывать сухую субстанцию, из которой в дальнейшем готовили водный раствор (образец 2) [8].

Далее было проведено стендовое исследование по подбору минимальной концентрации образцов с антибактериальной активностью в отношении госпитального, антибиотикорезистентного штамма *E. coli* 10⁹ КОЕ/мл *in vitro*.

Динамика уровня КОЕ/мл в зависимости от концентрации, представлена в таблице 1.

Таблица 1

Антибактериальная активность различных концентраций образцов в опытах *in vitro*

Бактерии, конц.	Концентрация антисептика	Антисептик	Бактериальный рост
<i>E. coli</i> 10 ⁹	0,1%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,05%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,02%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,01%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,005%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,003%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,0015%	Образец 1	0
		Образец 2	0
		Хлоргексидина биглюконат	0
	0,001%	Образец 1	10 ⁵
		Образец 2	10 ³
		Хлоргексидина биглюконат	10 ⁴

Концентрации 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,003%, 0,0015% водных растворов образцов 1, 2 и водного раствора хлоргексидина биглюконата снижали количество микроорганизмов с 10⁹ *E. coli* КОЕ/мл до нулевой величины, пробы становились стерильными. Концентрация образцов 0,001% переставала подавлять рост микроорганизмов. Отметим, что при добавлении образца 2 количество *E. coli* достоверно снижалось с 10⁹ до 10³

КОЕ/мл ($p \leq 0,05$); водного раствора хлоргексидина биглюконата – до 10^4 КОЕ/мл, образца 1 – до 10^5 КОЕ/мл. Следует отметить, что водный раствор 0,001% образца 2 подавлял рост микроорганизмов более эффективно, чем водный раствор 0,001% хлоргексидина биглюконата ($p = 0,003$) и образца 1 ($p = 0,002$).

Для выявления антибактериальной активности образцов в отношении микста *E. coli* + *Ps. aeruginosa* был выполнен следующий стендовый эксперимент, результаты которого представлены в таблице 2.

Таблица 2

Антибактериальная активность различных концентраций образцов в опытах *in vitro*

Бактерии, конц.	Концентрация антисептика	Антисептик	Бактериальный рост <i>E. coli</i> / <i>Ps. Aer.</i>
<i>E. coli</i> 10^9 + <i>Ps. aeruginosa</i> 10^9	0,1%	Образец 1	0 / 0
		Образец 2	0 / 0
		Хлоргексидина биглюконат	0 / 0
	0,05%	Образец 1	0 / 0
		Образец 2	0 / 0
		Хлоргексидина биглюконат	0 / 0
	0,02%	Образец 1	0 / 0
		Образец 2	0 / 0
		Хлоргексидина биглюконат	0 / 0
	0,01%	Образец 1	0 / 0
		Образец 2	0 / 0
		Хлоргексидина биглюконат	0 / 0
	0,005%	Образец 1	0 / 0
		Образец 2	0 / 0
		Хлоргексидина биглюконат	0 / 0
	0,003%	Образец 1	0 / 0
		Образец 2	0 / 0
		Хлоргексидина биглюконат	0 / 0
	0,0015%	Образец 1	10^3 / 10^3
		Образец 2	0 / 10^3
		Хлоргексидина биглюконат	10^3 / 10^4
	0,001%	Образец 1	10^5 / 10^5
		Образец 2	10^3 / 10^3
		Хлоргексидина биглюконат	10^3 / 10^5

Динамика уровня КОЕ/мл в зависимости от концентрации 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,003% водного раствора образцов 1, 2 и хлоргексидина биглюконата выявила существенное снижение количества микроорганизмов с 10^9 до нулевой величины КОЕ/мл, пробы становились стерильными.

Нами показано, что при концентрации антисептиков 0,0015% и 0,001% отмечается рост микроорганизмов. Использование водного раствора 0,0015% образца 2 позволяет достоверно снизить количество *E. coli* с 10^9 до нулевой величины, а *Ps. aeruginosa* – с 10^9 до 10^3 КОЕ/мл ($p \leq 0,05$). Водный раствор хлоргексидина биглюконата в концентрации 0,0015% снижает количество *E. coli* с 10^9 до 10^3 , а *Ps. aeruginosa* – с 10^9 до 10^4 КОЕ/мл ($p \leq 0,05$), образец 1 в концентрации 0,0015% снижает количество *E. coli* с 10^9 до 10^3 , а *Ps. aeruginosa* – с 10^9 до 10^3 КОЕ/мл ($p \leq 0,05$).

Следует отметить, что образец 2, полученный по второй технологии, подавлял рост микроорганизмов более эффективно, чем образец 1 и хлоргексидина биглюконат ($p \leq 0,05$). Дальнейшее снижение концентрации приводит к увеличению бактериальной контаминации.

На основании стендовых экспериментов нами выявлена высокая антибактериальная активность водного раствора образца 2, полученного с использованием второй технологии, где полигексаметиленгуанидина фосфат получается поликонденсацией гексаметилендиамина с карбонатом гуанидина в среде органического растворителя и последующим образованием соли фосфорной кислоты, в отношении госпитального штамма *E. coli* и микста *Ps. aeruginosa* + *E. coli* в очень низких концентрациях (до 0,0015%).

Заключение

Таким образом, сравнительная оценка антибактериальной активности водных растворов образцов гуанидинпроизводных соединений, полученных по различным технологиям, выявила, что наилучшие результаты были достигнуты при воздействии водного раствора образца 2, который был получен из сухого водорастворимого вещества, полученного поликонденсацией гексаметилендиамина с карбонатом гуанидина в присутствии органического растворителя и последующей обработкой промежуточного продукта фосфорной кислотой в среде воды. Его использование в очень низких концентрациях (до 0,0015%) позволяет достоверно снизить количество *E. coli* с 10^9 до нулевой величины, а *Ps. aeruginosa* – с 10^9 до 10^3 КОЕ/мл ($p \leq 0,05$) при использовании микст-инфекции. Образец 1, полученный сплавлением карбоната гуанидина с гексаметилендиаминном при температуре 135–145°C в течение 10–15 ч, с последующим взаимодействием измельченного получившегося твердого полигексаметиленгуанидин карбоната с ортофосфорной кислотой, и антисептик хлоргексидина биглюконат в концентрации 0,0015% снижали количество *E. coli* и *Ps. aeruginosa* в миксте, но менее эффективно, чем образец 2 ($p \leq 0,05$).

Список литературы

1. Колесникова А.Г., Нещерет Е.Н., Демкович О.О., Клишкан Д.Г., Солод Т.В., Василенко М.В. К вопросу имплементации глобальной инициативы ВОЗ по гигиене рук в здравоохранении // Вестник гигиены и эпидемиологии. 2016. Т. 20. № 1. С. 71-74.
2. Сергеев В.И., Ключкина Т.В., Волкова Э.О., Решетникова Н.И., Зуева Н.Г., Авдеева Н.С. Приобретенная устойчивость возбудителей внутрибольничных гнойно-септических инфекций к дезинфицирующим и антисептическим средствам // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013. № 1. С. 41- 46.
3. Землянюк О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. 2018. Т. 16. № 3. С. 4-17. DOI: 10.17816/ecogen1634-17.
4. Материалы совещания ВОЗ по профилактике инфекций и борьба с ними во время оказания медицинской помощи при вероятных или подтвержденных случаях инфицирования коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), обновлено 4 июня 2015 г. Женева, Всемирная организация здравоохранения; 2019 г. (WHO/MERS/IPC/15.1; [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/174652> (дата обращения: 08.11.2020).
5. Адаменко Г.В., Бурак И.И. Стандартизация антисептического средства для гигиенической обработки рук // Вестник фармации. 2016. № 1 (71). С. 61-66.
6. Исабаева М.Б. О биологической активности производных гуанидина // Альманах современной науки и образования. 2010. № 9. С. 62-64.
7. Григорьев Г.Е., Ильина О.П., Лепехова С.А., Фадеева Т.В., Шелупаев А.П., Савинова А.С. Применение антисептика «Анавидин» для профилактики и лечения инфицированных повреждений кожи в животноводстве: методические рекомендации. Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, 2011. 28 с.
8. Барков Н.П. Шелупаев А.П., Станкевич В.К., Кухарев Б.Ф. Способ получения фосфата полигексаметиленгуанидина и его водного раствора // Патент РФ № 2167167 Патентообладатель Закрытое акционерное общество "Специализированная промышленная компания Ир ИОХ". заявл. 18.01.2000, публикация патента 20.05.2001 г.
9. Григорьев Г.Е., Гольдберг О.А., Лепехова С.А., Ильина О.П., Коваль Е.В., Суворикова В.А. Влияние нового сибирского антисептика «Анавидин» на заживление кожной инфицированной раны // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2010. № 6 (76). Ч. 1. С.160-163.
10. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.

11. Спрейс И.Ф., Алферова М.А., Михалевич И.М., Рожкова Н.Ю. Основы прикладной статистики (использование Excel и Statistica в медицинских исследованиях): учеб.пособие. Иркутск: РИО ГИУВа, 2006. 71 с.
12. Гембицкий П.А., Кузнецов О.Ю., Юревич В.П., Топчиев Д.А. Способ получения дезинфицирующего средства // Патент РФ № 2039735, Патентообладатели: Гембицкий Петр Александрович, Кузнецов Олег Юрьевич, Юревич Вадим Прохорович, Топчиев Дмитрий Александрович С07С279/02 / заявлено 29.04.1993, публикация патента 20.07.1995 г.